الكشف عن فيروس مرض الجلد الكتيل عند الأبقار في سوريا
باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل

ط. ب. وفاء العتر * أ. د. سامر ابراهيم ** أ. د. محمد فاضل***

(الإيداع: 9 آيار 2021 ، القبول: 10 آب 2021)

الملخص

هدفت هذه الدراسة إلى الكشف عن فيروس مرض الجلد الكتيل عند الأبقار في سورية بعد أن ظهرت عدة بؤر في محافظتي اللاذقية وحماة أدت إلى خسائر اقتصادية فادحة في قطعان الأبقار. فقد عانت هذه القطعان من ظهور عقيدات منتشرة على الجلد مع حمى وإفرازات دمعية وتضخم في العقد اللمفية. أخذت عينات من العقيدات والدم الكامل من هذه الحيوانات وخضعت بعد استخلاص الـ DNA لتفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام المشرعات الخاصة بالجين (RPO30). وقد بينت نتيجة الـ PCR الكشف عن فيروس الجلد الكتيل في كل العينات الجلدية وعند كل الحيوانات التي ظهرت عليها العقيدات ولم يتم الكشف عن الفيروس في دم هذه الحيوانات. في حين تم الكشف عن الفيروس في دم الحيوانات المخالطة لها والتي لم يظهر عليها سوى حمى بسيطة وإفرازات دمعية ولكن بدون ظهور عقيدات. هذه النتائج تبين بوضوح إمكانية الكشف عن فيروس الجلد الكتيل باستخدام الـ PCR وبالاعتماد على الجين (RPO30) بشكل مبكر وقبل ظهور الأعراض النوعية التي تميز مرض الجلد الكتيل وهذا قد يسمح بتقليل الخسائر الاقتصادية.

الكلمات المفتاحية: مرض الجلد الكتيل – تفاعل البلمرة المتسلسل – الجين RPO30 – محافظتي حماه واللاذقية

*معيدة وطالبة دراسات عليا – اختصاص فيروسات – قسم الأحياء الدقيقة – كلية الطب البيطري– جامعة حماه

**استاذ التشخيص المخبري – قسم الأحياء الدقيقة – كلية الطب البيطري – جامعة حماه

***استاذ أمراض الدواجن – قسم أمراض الحيوان – كلية الطب البيطري – جامعة حماه

Detection of Lumpy Skin Disease Virus in Cows in Syria using Polymerase Chain Reaction

Vet. Wafaa Al-Eter* **Dr. Samer Ibrahim**** **Dr. Mohammad Fadel*****

(Received: 9 May 2021,Accepted: 10 Auguast 2021)

Abstract:

This study was aimed to detect the lumpy skin disease in cows in Syria, after several foci appeared in Lattakia and Hama governorates, which led to heavy economic losses in cow herds. These flocks suffered from the appearance of diffuse nodules on the skin with fever, lacrimal secretions, and enlarged lymph nodes. Nodules and whole blood samples were taken from these animals, and after DNA extraction, they were subjected to polymerase chain reaction (PCR) using primers specific to the (RPO30) gene. The result of the (PCR) revealed the detection of the lumpy skin disease virus in all skin samples and in all the animals on which nodules appeared, and the virus was not detected in the blood of these animals. Whereas, the virus was detected in the blood of the animals in contact with them, which only showed a slight fever and tear secretions, but without the appearance of skin nodules. These results clearly show the possibility of detecting the (LSDv) using (PCR) and based on the (RPO30) gene early and befor the appearance of specific symptoms that characterize the disease, and this may allow to reduce economic losses.

Key words: lumpy skin disease – polymerase chain reaction- rpo30 gene – the governorates of Hama and Latakia

*Postgraduate student – Virology – Department of Microbiology – Faculty of Veterinary Medicine – Hama University

**Professor of Laboratory diagnosis - Department of Microbiology – Faculty of Veterinary Medicine – Hama University

***Professor of Poultry diseases - Department of Animal diseases - Faculty of Veterinary Medicine – Hama University

1- المقدمة Introduction:

تشكل الثروة الحيوانية وبشكل رئيس تربية الأبقار جانباً مهماً في الاقتصاد السوري الزراعي سواءً من حيث ما يضيفه هذا الجانب إلى إجمالي الناتج المحلي أو حجم القوى العاملة أو رأس المال المستثمر فيه، ورغم الاهتمام الذي توليه الحكومة وخططها الرامية إلى تحقيق الأمن الغذائي من خلال الحفاظ على صحة قطيع الأبقار في سورية إلا أن هذه القطعان تواجه الكثير من التحديات وخاصة تلك التي ترتبط بالأمراض والأوبئة، ففي عام 2020 ظهرت عدة بؤر في محافظتي اللاذقية وحماة في قطعان الأبقار وبأعراض تبدأ بالحمى مع ظهور عقيدات منتشرة في معظم أنحاء الجلد والأغشية المخاطية وقد شخصت عرضياً بالتهاب الجلد الكتيل.

ويعرف مرض الجلد الكتيل (Lumpy Skin Disease (LSD: بأنه مرض جلدي فيروسي معدي يصيب الأبقار وينتقل بشكل أساسي عن طريق لدغ الحشرات، يتميز المرض بالحمى والظهور المفاجئ للعقيدات على معظم أنحاء الجلد والأغشية المخاطية بالإضافة إلى توذم الأرجل ومقدمة الصدر، كما يلاحظ على الحيوانات المصابة الهزال وانخفاض في الإنتاج وتلف الجلود (OIE, 2016).

يسبب مرض الجلد الكتيل فيروس ينتمي إلى عائلة فيروسات الجدري (poxviridae) والذي يتبع جنس فيروسات (Capripoxvirus) ويضم هذا الجنس ثلاثة أنواع فيروسية:

Lumpy skin disease virus (LSDv) فيروس مرض الجلد الكتيل

Goat pox virus (GTPv) فيروس جدري الماعز

Sheep pox virus (SPPv) فيروس جدري الأغنام

يتراوح حجم فيروس مرض الجلد الكتيل بين (260–320) نانومتر وله شكل بيضاوي إلى مستطيل مغلف ويحوي الفيروس على الحمض النووي DNA ثنائي السلسلة، ويبلغ عدد القواعد الآزوتية حوالي 150Kilobase Pairs. يشبه هذا الفيروس كلاً من فيروس جدري الماعز وفيروس جدري الأغنام بنسبة 96% من حيث القرابة الجينية وتطابق القواعد الآزوتية (Tulman et al., 2001).

تتراوح فترة حضانة المرض بين (6–9) أيام، وبعدها تبدأ الأعراض السريرية بالظهور حيث يلاحظ:

ارتفاع حرارة الحيوان للدرجة 41مْ وتستمر لمدة أسبوع وانخفاض ملحوظ في إنتاج الحليب نتيجة قلة الشهية مع سيلانات أنفية ولعابية ثم ظهور عُقيدات على الجلد يتراوح حجمها بين (0.5– 5 سم) وتمتد هذه العقيدات للطبقة تحت الجلدية وتصل للعضلات وقد تتطور للأغشية المخاطية للفم والجهاز الهضمي والقصبة والرئتين وفي الحالات المتقدمة يلاحظ نخر في مركز العقيدات، كما يلاحظ على الحيوانات تضخم بالعقد اللمفية وظهور وذمات في القوائم ومقدمة الصدر، ربما تجهض الإناث الحوامل وتصبح الثيران عقيمة بشكل مؤقت.

(Prozesky & Barnard,1982 ; Carn & Kitching,1995 ; Coetzer,2004 ; Rouby & Aboulsoudb,2016).

عادة ما تكون نسبة النفوق منخفضة (1–3%) بينما يصل معدل الإصابة إلى (20%). ويلاحظ أن الابقار في فترة الإدرار أكثر عرضة للإصابة (Carter et al., 2005). وتعد الحشرات الوسيلة الرئيسة للانتقال حيث تم عزل الفيروس من البعوض والذباب والقراد، كما يمكن أن ينتقل عن طريق الدم والإفرازات الدمعية والأنفية وينتقل عن طريق الحليب إلى العجول الرضيعة (Tuppurainen et al., 2015).

تتشابه الأعراض لهذا المرض مع بعض الأمراض الأخرى مثل: (مرض الجلد العقدي الكاذب – فيروس جدري البقر – مرض الفم والقدم – الشرى – الطاعون البقري وغيرها من الأمراض) لكن يبقى ظهور العقيدات والحمى والعقد اللمفاوية

المتضخمة هي عرض أساسي في مرض الجلد الكتيل (LSD). ويتم تشخيص المرض حقلياً من الأعراض السريرية الواضحة والصفة التشريحية. أما مخبرياً لا يمكن التمييز بين فيروس الجلد الكتيل وفيروس جدري الأغنام والماعز مصلياً، حيث كشفت المقارنات الجينية الارتباط الوثيق بين جينات هذه الفيروسات (Tulman et al., 2002).

يمكن الكشف عن الفيروس من خلال استخدام المجهر الإلكتروني وملاحظة شكل الفيروس البيضاوي المحتوي على أجسام جانبية كبيرة الحجم. واختبار تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) وهو طريقة حساسة وسريعة للكشف عن جينوم الفيروس من خلال استهداف جينات نوعية من أجل تشخيص مرض الجلد الكتيل بناءً عن المورثة RNA Polymerase 30 (RPO30) حيث تساعد هذه المورثة في الكشف السريع عن المرض . عزل الفيروس على مزارع نسيجية مثل خلايا الأدمة البقرية أو خلايا الخصية كما يمكن إجراء الاختبارات المصلية مثل اختبار (ELISA). (Lamien et al., 2011).

لا يوجد علاج سببي للمرض وإنما تعطى الصادات ومركبات السلفا لدرء العدوى الجرثومية، وتعطى أيضاً رافعات مناعة كالفيتامينات والمقويات . أما من حيث اللقاحات فقد تم استخدام أربع سلالات حية من جنس Capripoxvirus المخففة للسيطرة على تفشي مرض الجلد الكتيل: ذرية فيروس جدري الأغنام وجدري الماعز الكينية، الذرية اليوغسلافية RM65 من جدري الأغنام، ذرية جدري الأغنام الرومانية، ذرية فيروس مرض الجلد الكتيل LSDv من جنوب أفريقيا (Brenner et al., 2006)

2- أهداف الدراسة Objectives of Study:

نظراً لأهمية المرض وللخسائر الاقتصادية التي منيت بها الثروة الحيوانية في سورية خلال السنتين الماضيتين ونظراً لعدم وجود دراسة مخبرية أكاديمية حول هذا المرض في سورية فقد هدفت هذه الدراسة إلى: الكشف عن فيروس مرض الجلد الكتيل عند قطعان الأبقار المصابة والمشخصة سريرياً أو مشتبه بإصابتها باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

3- مواد وطرائق البحث Material and methods:

3-1-جمع العينات Samples Collection:

تم جمع العينات (خزعات من الجلد، الدم الكامل) وذلك من أبقار مصابة وتظهر عليها أعراض المرض بوضوح وأهمها العقيدات الجلدية، ومن أبقار كانت مخالطة للأبقار المصابة وتعاني من أعراض بدائية كارتفاع درجة الحرارة وقلة الشهية بدون عقيدات جلدية. وذلك خلال الفترة الممتدة من شهر نيسان وحتى شهر آب لعام 2020 من عدة مناطق من محافظتي حماه واللاذقية، حيث تم أخذ الخزعات الجلدية بعد تعقيم الجلد مكان الخزعة باليود ثم بوساطة مشرط معقم تم اقتطاع جزء من العقيدة تشمل طبقة الجلد وتحت الجلد ثم وضعت العينات في عبوات بلاستيكية عقيمة محكمة الإغلاق وسجلت على كل عبوة البيانات الخاصة بها. أما عينات الدم تم جمعها من الوريد الوداجي بعد التعقيم حيث تم أخذ 5مل من الدم الكامل باستخدام أنابيب مفرغة من الهواء تحوي مانع التخثر E.D.T.A، ونقلت العينات جميعها إلى مختبر الأحياء الدقيقة في كلية الطب البيطري بحماة بوساطة حافظة ثلجية باردة مناسبة، وحفظت على الدرجة -20 لحين متابعة العمل عليها ويبين الجدول رقم (1) أعداد الحيوانات وأماكن ونوع العينات.

الجدول رقم (1): يبين عدد الحيوانات التي أخذت منها العينات والمنطقة الجغرافية وعدد العينات النسيجية والدموية

المحافظة	المنطقة	عدد الحيوانات	عينات النسيج	عينات الدم
اللاذقية	الحويز	3	2	3
	حوران البودي	2	2	2
	البرجان	10	7	6
حماه	ديمو	7	6	7
	سريحين	1	1	_
	مصياف	5	5	2
المجموع الكلي	_	28	23	20

3استخلاص الدنا الفيروسي Viral DNA Extraction:

3-2-1-استخلاص الـ DNA الفيروسي من عينات الدم:

تم استخلاص الـ DNA من عينات الدم الكامل باستخدام عتيدة تجارية Blood DNA Extraction-GF1 / vivantis) (Kit lot:12390C وحسب تعليمات الشركة المصنعة أخذت كمية (200) µl من عينة الدم الكامل وأضيف اليها (200) µl من المحلول Blood Lysis Buffer (BB) وتم المزج بالرج الشديد باستخدام جهاز vortex، ثم أضيف للعينة البروتيناز K وحضنت على الدرجة 65 مئوية مدة عشر دقائق. بعد إضافة (200) µl من الايتانول المطلق والمزج، نقلت الى الأعمدة الخاصة بالعتيدة وتم تثفيل الأعمدة بقوة 5000g لمدة دقيقة واحدة ثم نقلت الأعمدة إلى أنابيب جديدة لإجراء خطوتي الغسيل، وأخيراً تم إضافة (100) µl من الدارئة Elution Buffer (EB) إلى الأعمدة وثفلت للحصول على السائل الحاوي على الـ DNA وحفظت العينة عند الدرجة -20 لحين إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل.

3-2-2-استخلاص الـ DNA من عينات النسيج:

استخدم لهذا الغرض عتيدة تجارية (PeQlab/ peq Gold Tissue DNA Mini Kit lot:08076)

تم أخذ كمية (30-35)mg من عينة الجلد وأضيف اليها (200) µl من المحلول (TL) وتم المزج بجهاز الـــ vortex، ثم حضنت العينة مع أنزيم البروتيناز K مدة 3 ساعات على الدرجة 60مئوية، وبعدها أضيف (220) µl من المحلول (BL) ووضعت العينة على الدرجة 70 مئوية مدة عشرة دقائق، ثم أضيف (220) µl من الإيتانول المطلق ومزجت جيداً ونقلت للأعمدة المخصصـــة بالعتيدة، ثم ثفلت الأعمدة بقوة 8000g لمدة دقيقة واحدة وتم التخلص من الســائل. ثم طبقت على الأعمدة خطوتي الغسيل باستخدام المحلول (WB) وأخيراً أضيفت (150) µl من الدارئة Elution Buffer (EB) وثفلت للحصول على الـ DNA الذي حفظ عند الدرجة -20 لحين إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل.

4-2-تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR):

خضعت مستخلصات الـــ DNA للدم والنسيج لتفاعل البوليميراز المتسلسل للكشف عن المورثة (RPO30) والتي يبلغ طولها 172 pb باستخدام زوج من المرئسات (مشرعات) Primers وكانت التسلسلات المستخدمة:

'F\ 5'- TCTATGTCTTGATATGTGGTGGTAG-3'

'R\ 5'- AGTGATTAGGTGGTGTATTATTTTCC-3'

تم الحصـول عليها من شـركة (Macrogen.Korea) وذلك حسـب طريقة العمل المتبعة من قبل (Lamien et al., 2011)

أضيف (5µl) من مستخلص الـ DNA، إلى مزيج التفاعل المؤلف من:

(1µl) من تسـلسـلي البادئات (10pmol/µl)، (1µl) من dNTPs قواعد آزوتية (10mM)، (4µl) من كلوريد المغنزيوم (50mM)، (5µl) من دارئة الاختبار PCR Buffer (10x)،

(1µl) من أنزيم (*Taq* DNA Polymerase) (vivantis/Malaysia) (5U/µl) ، وتم إكمال المزيج بماء مقطر حتى (50µl).

وتم التضخيم في جهاز المدور الحراري: Thermal cycler (Techne/512) وفق البرنامج الآتي:

مرحلة التمسخ الأولي: Initial denaturation على 95 درجة مئوية لمدة 5 دقائق / دورة واحدة.

مرحلة التضخيم وعددها 35 دورة على الشكل التالي: 94 درجة مئوية مدة 50 ثانية و55 درجة مئوية مدة 40 ثانية و72 درجة مئوية مدة دقيقة و20ثانية.

مرحلة الاستطالة النهائية: Final extension على 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق / دورة واحدة.

تم ترحيل نواتج الترحيل باسـتخدام هلامة الأغاروز ذات التركيز 1.5% المضـاف إليها بروميد الإيثيديوم، وبعد فترة كافية من الرحلان، تم فحص الهلامة على جهاز تظهير الهلامة بالأشـعة فوق البنفسـجية UVIPRO/ Gel Documenter لتحري وجود أنطقة الـ DNA المطلوبة (172قاعدة آزوتية) حيث تم الاستدلال عليها مقارنة مع معلم الوزن الجزيئي 100 bp DNA Ladder.

4-النتائج والمناقشة Results and Discussion :

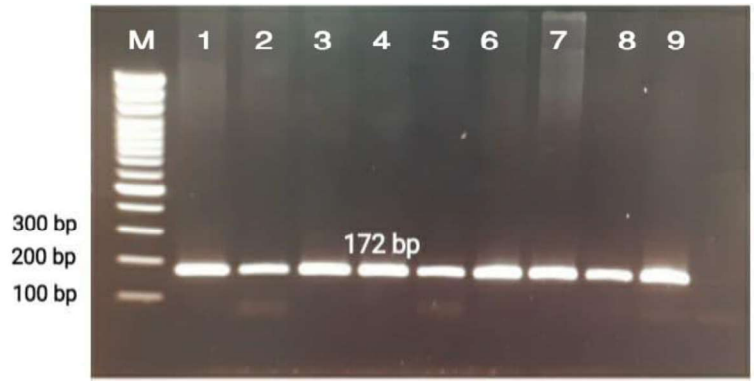
عند الفحص السـريري للأبقار المصـابة في بؤر الإصـابة لوحظ عقيدات منتشـرة على كامل جسـم الحيوانات كما أظهرت الحيوانات المصـــابة عدة علامات أخرى كقلة شـــهية مع إفرازات أنفية ودمعية وعتامة بالقرنية وحمى وظهور وذمات في الأرجل ومقدمة الصـدر وتضـخم بالعقد اللمفية. في حين أظهرت الأبقار المخالطة لها أعراض عامة تتمثل بحمى العرض الأساسي مع إفرازات أنفية ودمعية لكن بدون ظهور عقيدات.

نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل للعينات النسيجية:

أظهرت نتائج تضخيم الـ DNA لمستخلصات العينات النسيجية عن وجود المورثة RPO30 التي تساعد في الكشف السريع والنوعي عن وجود الفيروس والبالغ طولها bp172 عند جميع العينات المأخوذة من الأبقار التي أظهرت عقيدات جلدية وهذا ما توافق مع دراسة (Lamien et al., 2011) بأنه يمكن استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل في تحديد وجود المرض في عينات الجلد.

ذكرت العديد من المصادر الأخرى أنه يمكن الكشف عن الفيروس من عينات (دم، حليب، سائل منوي) باختبارها بوساطة الـ (PCR) ولكن تبقى خزعات الجلد هي الأفضل حيث تحوي على الكثير من الجسيمات الفيروسية أعلى مما هو عليه في

العينات الدموية وهذا ما أكدته هذه الدراسة حيث توافقت مع ما توصل إليه (Tuppurainen et al., 2005). ويوضح الشكل رقم (1) هذه النتائج.



الشكل رقم (1): نتائج العينات النسيجية

الشكل رقم (1): يشير العمود (M) إلى معلم الوزن الجزيئي 100 bp DNA ladder وتشير باقي الأعمدة (من 1إلى 9) الى النتائج الايجابية لوجود المورثة (RPO30) ذات الوزن 172bp.

نتائج تفاعل البوليميراز للعينات الدموية:

تباينت نتائج العينات الدموية حيث لم تظهر بعض العينات النطاق النوعي للمورثة (RPO30) بالرغم من وجود العقيدات الجلدية على الحيوانات الذي أخذت منها العينة بينما ظهر النطاق النوعي للمورثة (RPO30) في العينات المأخوذة من حيوانات تعاني من أعراض عامة مثل ارتفاع بدرجة حرارة الجسم وقلة شهية وإفرازات دمعية وأنفية ولكن بدون عقيدات جلدية مميزة للمرض ولكنها كانت من حيوانات مخالطة، ويفسر هذا التباين أن الفيروس يوجد في الدم لفترة قصيرة وعند ظهور العقيدات على الحيوان يتم تركيز الفيروس في العقيدات الجلدية وهذه النتيجة توافقت مع التقارير السابقة من قبل (Zegnalova et al., 2016).

أفادت هذه النتيجة عن التشخيص المبكر للمرض للقيام بإجراءات الحجر والوقاية قبل انتشاره لباقي الحيوانات المخالطة في الحظيرة أو في المنطقة المجاورة.

إن إمكانية الكشف عن تواجد الفيروس في الدم عند حيوانات تعاني من أعراض عامة ومجاورة لحيوانات أظهرت العقيدات الجلدية يسمح بالتشخيص المبكر للمرض وبالتالي تطبيق الاجراءات الصحية والوقائية...

كما أفادت هذه الدراسة أن عينات الجلد هي الأنسب للكشف عن المرض في مرحلة ظهور العقيدات بينما عينات الدم لا ينصح بها إلا في المراحل المبكرة للمرض وقبل ظهور العقيدات. ويوضح الشكل رقم (2) هذه النتائج.

الشكل رقم (2): نتائج العينات الدموية

تشـير الأعمدة رقم (2,3,4,5,7) لوجود المورثة RPO30 حيث أُخذت من حيوانات تعاني من أعراض عامة وبدون وجود للعقيدات الجلدية المميزة للمرض. بينما الأعمدة رقم (1,6) ظهرت سـلبية للمورثة RPO30 بالرغم من وجود العقيدات المنتشرة بشدة على جسم الحيوان والحالة المتقدمة للمرض.

5-الاستنتاجات Conclusions:

يمكن أن نستخلص من هذه الدراسة مجموعة من النقاط أهمها:

1- التأكيد الدقيق على وجود مرض الجلد الكتيل في سورية باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل في كل من محافظتي حماه واللاذقية.

2- يمكن الكشف المبكر عن المرض عن طريق العينات الدموية قبل ظهور العقيدات الجلدية باختبار الـ PCR

6-التوصيات Suggestions:

توصي الدراسة بمتابعة العمل من أجل:

1- التوصيف الجيني لمرض الجلد الكتيل من خلال دراسة أهم جيناته.

2- محاولة عزل الفيروس في المختبر على أجنة بيض الدجاج.

3- دراسة القرابة الجينية من الأوبئة المنتشرة في سورية بين جينات فيروس مرض الجلد الكتيل مع ذراري أخرى من مختلف أنحاء العالم وكذلك محاولة فهم عمليات فشل التحصين ضد المرض.

7-المراجع References:

1- BRENNER J., HAIMOVITZ M., ORON E., STRAM Y., FRIDGUT O., BUMBAROV V., KUZNETZOVA L., OVED Z., WASERMAN A., GARAZZI S., PERL S., LAHAV D., EDERY N. & YADIN H. (2006). Lumpy skin sease (LSD) in a large dairy herd in Israel. Isr. J. Vet. Med., 61, 73–77

2- CARN V.M. & KITCHING, R.P. (1995). The clinical response of cattle following infection. with lumpy skin disease (Neethling) virus. Arch. Virol., 140, 503–513

3- CARTER, G.R., WISE, D.J., & FLORES, E.F. (2005). Aconcise review of veterinary virology. Retrieved from http://www.ivis.org/home.asp.

4- COETZER J.A.W. (2004). Lumpy skin disease. In: Infectious Diseases of Livestock, Second Edition Coetzer J.A.W. & Justin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, 1268–1276

5- LAMIEN C.E., LELENTA M., GOGER W., SILBER R., TUPPURAINEN E., MATIJEVIC M., LUCKINS A.G. & DIALLO A. (2011). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses J. Virol. Methods, 171, 134–140.

6- PROZESKY L. & BARNARD B.J.H (1982). A study of the pathology of lumpy skin disease in cattle. Onderstepoort j. vet. Res., 49, 167-175.

7- Rouby S. & Aboulsoudb E. (2016). Evidence of intrauterine transmission of lumpy skin disease virus. Vet. J., 209, 193–195.

8- TUPPURAINEN E.S., VENTER E.H., COETZER J.A. & BELL-SAKYI L. (2015). Lumpy skin disease: attempted propagation in tick cell lines and presence of viral DNA in field ticks collected from naturally-infected cattle. Ticks Tick Borne Dis., 6, 134–140.

9- TUPPURAINEN E.S., VENTER E.H., COETZER J.A..(2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. Onder J Vet Res, 72(2): 153-64.

10- TULMAN, E.R., AFONSO, C.L,. ZSAK, LU.Z., KUTISH, G.F &. ROCK, D.L,.(2001) genome of lumpy skin disease virus. Journal of virology, 75(15): 7122-7130.

11- TULMAN, E.R., AFONSO, C.L,. ZSAK, LU.Z., SANDYBAEV, N.T., KEREMBEKOVA, U.Z., ., KUTISH, G.F &. ROCK, D.L,. (2002). The genomes of sheeppox and goatpox viruses. J. virol. 76, 6054-6061.

12- WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). (2016). Lumpy skin disease. Terrestrial manual. Retrieved from www.oie.net.

13- ZEYNALOVA, S., ASADOV, K., GULIYEV, F., VATANI, M.(2016). Epizootology and molecular diagnosis of lumpy skin disease among livestock in azerbaijan. Front microbial.7: 1-7