التنوع الجيني لفيروس متلازمة الشرق الأوسط التنفسية كورونا في الإبل المستوردة الى المملكة العربية السعودية

أحمد مجدي خالد طوله

اشراف

د. سعد بركي المسعودي

أ.د. عصام إبراهيم أزهر

المستخلص

متلازمة الشرق الأوسط التنفسية–الفيروس التاجي هو فيروس مستوطن في الإبل العربية لدول الشرق الأوسط وأفريقيا. بشكل مستمر تستورد المملكة العربية السعودية سنوياً آلاف الإبل من الدول الإفريقية، لكن وبائية الفيروس في هذه الحيوانات غير معروفة إلى حد كبير. في هذه الدراسة، تم مقارنة معدل انتشار فيروس كورونا في الإبل الأفريقية المستوردة ونظيراتها من الإبل المحلية. تم جمع ١،٣٩٩ مسحة من أنف الإبل المستوردة والمحلية وأيضا عينات مصلية بين عامي ٢٠١٦ و٢٠١٨ من السودان (عدد = ٨٢٩) وجيبوتي (عدد = ٣٢٨) وجدة (اعدد = ٢٤٢). تم أخذ عينات من الإبل المستوردة على السفن القادمة في ميناء جدة الإسلامي قبل التفريغ. تم اختبار الأمصال عن طريق تحييد الأجسام المضادة وتم تأكيد النتائج بتقنية الاليزا تم اختبار المسحات بواسطة البلمرة الجزئية بي سي ار. بشكل عام كانت نسبة الانتشار المصلي الكلي ٩٢,٧ ٪ وكان معدل اكتشاف الحمض النووي الريبي ١٧,٢ ٪. الانتشار المصلي في الإبل المستوردة أعلى من الإبل المحلية بنسبة (٩٣,٨% مقابل ٨٧,٦%) على عكس الكشف عن الحمض النووي الريبي (١٣,٣% مقابل ٣٥,٥%). وكانت هناك زيادة في الانتشار المصلي مع تقدم العمر وكان معدل اكتشاف الحمض النووي الريبي الفيروسي يبلغ ضعفين في الإبل في عمر أقل من عامين مقارنة بالإبل الأكبر عمرا. وكان الكشف عن الحمض النووي الريبي أعلى في الذكور مقابل الإناث (٢٤,٢% مقابل ١٢,٦%) ولكن في الأمصال كانت متماثلة بين الجنسين. تم العثور على عينات إيجابية متزامنة بين الحمض النووي الريبي والمصلي بأكثر من ٨٧%، زاد مع تقدم العمر وكان يعتمد على الجنس. الأهم من ذلك، كان انخفاض الحمض النووي الريبي يرتبط بشكل إيجابي مع قوة تحييد الأجسام المضادة. تم استخلاص الحمض النووي الريبي من عينات الجهاز التنفسي وثلاثة مناطق جينية من فيروس كورونا (أورف ١ أ، سبايك، وأورف ٤ ب) تم تضخيمها لتوليد البيانات الجينومية قبل وبعد نقاط توقف إعادة التركيب المعروفة في فيروس كورونا وتم محاذاتها مع سلالات فيروس كورونا المتاحة في بنك الجينات. تم إجراء المحاذاة باستخدام (م أ ف ف ت). تم إجراء إعادة بناء باستخدام بيست ١,١٠,٤ بافتراض نموذج استبدال النيكولوتيدات. أعيد بناء المواقع الجغرافية في جميع العقد الشجرية. استند تحليل الشبكة الاجتماعية على اختيار متغير البحث العشوائي في بايزين، وربط المسافة بين السلالات الوراثية والجغرافية التي تم إجراؤها لتحديد مدى مساهمة انتقال الفيروس بين البلدان بعد إنشاء النسب الوراثية في التوزيع الجغرافي الحالي. جميع الفيروسات من الإبل المستوردة تنتمي إلى كليد سي. سلالات فيروس كورونا الأفريقية في الإبل المستوردة الى السعودية لم تلاحظ في الإبل المحلية الموجودة في السعودية. جميع الفيروسات من الإبل المحلية تنتمي إلى السلالة المتراكبة المكتشفة لأول مرة في عام ٢٠١٤. تشير تقديرات ار صفر الى استيطان مستديم للسلالة المتراكبة الجديدة دون ادخال فيروسات جديدة من افريقيا. يوضح تحليل الديناميات السكانية أنه يمكن للفيروسات العربية الحفاظ على الاستيطان دون إدخال سلالات إضافية. سلالات فيروس كورونا الأفريقية لم تظهر في الإبل المحلية في السعودية. يشير ارتفاع معدل اكتشاف فيروس كورونا في الإبل من شبه الجزيرة العربية إلى الاختلافات في ديناميكية الإرسال وضغط الاختيار. ينبغي أن تركز الدراسات الإضافية على فهم التغييرات المحتملة في الضراوة والانتقالية. تؤكد بياناتنا انتشار فيروس كورونا على نطاق واسع في الإبل المستوردة والمحلية في المملكة العربية السعودية وتسلط الضوء على الحاجة إلى المراقبة النشطة المستمرة وإجراءات الوقاية. هناك ما يبرر إجراء مزيد من الدراسات لفهم ارتباط الحماية في الجمال لتطوير لقاح مناسب لها.

Genetic Diversity of MERS-CoV in Camels Imported to Saudi Arabia

Ahmed Majdi Khaled Tolah

Supervised By

Dr. Saad Berki AL Masaudi

Prof. Esam Ibraheem Azhar

Abstract

The Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus (MERS-CoV) is an endemic virus in Middle Eastern and African dromedaries. Annually, Saudi Arabia imports thousands of camels from the Horn of Africa, yet the epidemiology of the virus in these animals is largely unknown. Here, MERS-CoV prevalence was compared in imported African camels and their local counterparts. A total of 1399 paired sera and nasal swabs were collected between 2016 and 2018 from camels from Sudan (n=829), Djibouti (n=328) and Jeddah (n=242). Imported animals were sampled on incoming ships at Jeddah Islamic seaport before unloading. Samples were screened for neutralizing antibodies (nAbs), confirmed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and MERS-CoV viral RNA by RT-PCR. The overall seroprevalence was 92.7% and RNA detection rate was 17.2%. Imported camels had higher seroprevalence compared to resident herds (93.8% vs 87.6%, $p < 0.01$) in contrast to RNA detection (13.3% vs 35.5%, $p < 0.0001$). Seroprevalence significantly increased with age ($p<0.0001$) and viral RNA detection rate was ~2-folds in camels <2-year-old compared to older camels. RNA detection was higher in males verses females (24.3% vs 12.6%, $p<0.0001$) but seroprevalence was similar. Concurrent positivity for viral RNA and nAbs was found in >87% of the RNA positive animals, increased with age and was sex dependent. Importantly, reduced viral RNA load was positively correlated with nAb titers. Viral RNA extracted from respiratory samples and three MERS-CoV genome regions (ORF1a, Spike, and ORF4b) were amplified to generate genomic data before and after known Coronavirus recombination break-points and these were aligned with available MERS-CoV strains and clades A, B and C in GenBank. Alignments were made using MAFFT. Bayesian phylogeographic reconstructions were made using Beast 1.10.4 under assumption of a HKY nucleotide substitution model. Geographic locations were reconstructed at all tree nodes. Recombination analyses were made using SimPlot V3.5 and RDP V4.95. Social network analysis was based on Bayesian stochastic search variable selection, and correlation of genetic and geographic distance of strains performed to determine the extent to which virus transmission between countries after genetic lineage establishment has contributed to the present geographic distribution. All viruses from imported camels belonged to clade C. African MERS-CoV lineages in camels imported into KSA were not observed in camels in KSA. All KSA viruses belonged to a novel recombinant clade (NRC) first detected in 2014. R_0 estimates informed by the sequences suggest sustained endemicity of NRC without introduction of new viruses from Africa. Analysis of population dynamics shows that Arabian viruses can maintain endemicity without introduction of additional lineages. African MERS-CoV lineages do not appear to establish themselves in camels in KSA. The higher detection rate of MERS-

CoV RNA in camels from the Arabian Peninsula points toward differences in transmission dynamics and selection pressure. Further studies should focus on understanding potential changes in virulence and transmissibility. Our data confirm MERS-CoV widespread in imported and domestic camels in Saudi Arabia and highlight the need for continuous active surveillance and better prevention measures. Further studies are also warranted to understand the correlates of protection in camels for proper vaccine development.