

تشخیص مولکولی و تعیین توالی اسیدهای آمینه ناحیه شکافتگی هماگلوتینین در ویروس آنفلوانزا جدانشده از طیور گوشتی استان خراسان شمالی

پژمان بهاری^۱، سیدعلی پوربخش^{۲*}، عبدالحمید شوشتری^۱، محمد علی بهمنی نژاد^۲

۱- دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۲- بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۲۷ آذر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۴ اردیبهشت ۱۳۹۲

چکیده

بیماری آنفلوانزای پرندگان یکی از بیماری‌های ویروسی مهم در مرغداری‌های صنعتی کشور می‌باشد و هر سال خسارات عمده‌ای به صنعت پرورش طیور کشور وارد می‌کند. تشخیص سریع ویروس آنفلوانزا و تعیین حدت آنها یکی از اولویت‌های مهم پیشگیری و مبارزه علیه این بیماری در کشور محسوب می‌شود. از آزمایش RT-PCR جهت تشخیص ویروس‌های آنفلوانزا و نیز بررسی توالی محل شکافتگی پروتئین هماگلوتینین (HA) به عنوان یک شاخص مولکولی به منظور پیش‌بینی حدت سویه‌های آنفلوانزا مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق جهت پایش بیماری آنفلوانزا ۱۶۰ نمونه سوآپ نای از ۲۰ واحد پرورش مرغ گوشتی در استان خراسان شمالی که مشکوک به بیماری آنفلوانزا بودند اخذ گردید. آزمایش مولکولی RT-PCR براساس ژنوتیپ‌های شایع در ایران پایه‌ریزی گردید که در آن برای تعیین تیپ گروه A آنفلوانزا از پرایمر اختصاصی ژن ماتریکس (M) و جهت تعیین تحت تیپ‌های H₇، H₅، H₉ از پرایمرهای اختصاصی ژن هماگلوتینین (HA) استفاده شد. جهت تعیین توالی، نمونه‌های مثبت شده از نظر تیپ A به تخم مرغ جنین دار (SPF) ۹-۱۱ روزه تزریق شد، پس از سه تا پنج روز مایع آلانتوئیک با استفاده از فرمالین ۱ درصد خنثی و جهت بررسی تست هماگلوتیناسیون و استخراج RNA ویروسی استفاده گردید. سپس قطعه‌ای به طول ۴۳۷ bp دربرگیرنده محل شکافتگی ژن هماگلوتینین تکثیر و جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت MWG آلمان ارسال شد و در نهایت به توالی اسید آمینه‌ای ترجمه گردید. نتایج نشان داد که با استفاده از روش RT-PCR نمونه‌های اخذ شده از ۴ مرغداری صنعتی از نظر ویروس تیپ A آنفلوانزا مثبت بودند. تمام ویروس‌های تیپ A از نظر تحت تیپ H₅، H₇ منفی و از لحاظ H₉ مثبت تشخیص داده شدند. بررسی محل شکافتگی پروتئین هماگلوتینین نشان داد که هر ۴ سویه دارای توالی KSSR بودند، اگرچه این توالی نشان دهنده غیرحاد بودن سویه‌ها می‌باشد ولی با الگوی جدایه‌های قبلی ایران که عمدتاً RSSR می‌باشد تفاوت داشت. به طور کلی آزمایش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تحت تیپ‌های رایج در منطقه، تشخیص تفریقی سریع ویروس‌های آنفلوانزا را امکان پذیر می‌سازد. تغییر در محل شکافت پروتئین هماگلوتینین در ویروس‌های H₅N₂ را می‌توان به عنوان یک خطر بالقوه جهت تبدیل این ویروس‌ها به سویه‌های حاد در نظر گرفت. لذا پایش مستمر توالی ژنتیکی این ویروس‌ها توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: آنفلوانزای پرندگان، RT-PCR، تحت تیپ H₇-H₅-H₉، محل شکافتگی پروتئین هماگلوتینین، خراسان شمالی

* نویسنده مسئول: سیدعلی پوربخش

آدرس: بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران. تلفن: ۰۲۶۳۴۵۷۰۰۳۸

پست الکترونیک: apourbakhsh@rvsri.ac.ir

مقدمه

آنفلوانزای فوق حاد به اجرا گذاشته می‌شود و تعیین حدت این ویروس‌ها بسیار مهم تلقی می‌گردد. لذا در این مطالعه توالی ژنتیکی اسیدهای آمینه در محل شکافتگی پروتئین هماگلوتینین که نقش تعیین‌کننده‌ای در بیماری‌زایی ویروس‌های آنفلوانزا دارد، مورد بررسی قرار گرفت (۱). تاکنون روش‌های مختلف RT-PCR جهت تشخیص آنفلوانزا و تحت تیپ‌های آن توسط پژوهشگران مختلف مطرح و بکارگرفته شده است (۲۳ و ۱۵، ۵). لیکن براساس توصیه‌های سازمان بهداشت جهانی (WHO) و سازمان بهداشت دام (OIE) انتخاب هریک از این روش‌ها باید براساس ژنوتیپ سویه‌های غالب در آن منطقه جغرافیایی باشد تا از اطمینان و حساسیت مورد نظر برخوردار باشد (۳۴ و ۱۹). با در نظر گرفتن موارد فوق و انتخاب پروتکل مناسب آزمایش RT-PCR، اقدام به شناسایی و تعیین توالی ژنتیکی ویروس‌های آنفلوانزا شایع در طیور گوشتی استان خراسان شمالی که اطلاعات کافی در مورد آنها وجود نداشت، گردید.

مواد و روش کار

۱۶۰ سوآپ نایی از تلفات ۲۰ گله طیور گوشتی مشکوک به بیماری آنفلوانزا از مرغداری‌های صنعتی استان خراسان شمالی اخذ گردید. این سوآپ‌ها در محیط انتقالی ویروس و در مجاورت یخ به بخش بیماری‌های طیور موسسه واکسن و سرم سازی رازی ارسال گردید. هر ۸ سوآپ مربوط به یک واحد مرغداری به یک سی سی محلول PBS حاوی آنتی بیوتیک مخلوط گردید این مخلوط با دور ۱۵۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی جهت استخراج RNA و نیز تزریق به داخل تخم مرغ جنین‌دار (SPF) ۹ روزه برداشت گردید.

آنفلوانزای پرندگان یکی از مهمترین بیماری‌های ویروسی است که از سراسر نقاط جهان گزارش شده است. این بیماری توسط ویروس‌های خانواده ارتومیکسوویریده ایجاد می‌شود. بعضی از ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان جزء عوامل مشترک بین انسان و حیوان می‌باشند و به عنوان یک خطر مداوم، سلامت جمعیت‌های انسانی و حیوانی را تهدید می‌کنند. بطوری که در طی ۶ سال گذشته عفونت انسان‌ها با ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان از ۳ تحت تیپ (H₅, H₇, H₉) تشخیص داده شده است (۴). این بیماری در ماکیان و بوقلمون از فرم‌های تحت بالینی یا عفونت خفیف دستگاه فوقانی تنفس تا بیماری حاد و کشنده متغیر می‌باشد. ویروس‌های آنفلوانزا تیپ A بر اساس پروتئین سطحی یعنی هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) تقسیم بندی می‌شوند. تاکنون ۱۶ تحت تیپ هماگلوتینین (H₁₋₁₆) و ۹ تحت تیپ نورآمینیداز (N₁₋₉) شناسایی شده‌است که تمامی آنها می‌توانند در پرندگان یافت شوند (۲۱ و ۲).

تاکنون تمام ویروس‌های متعلق به آنفلوانزای گروه A که باحدت بالا و علائم کلینیکی حاد در پرندگان دیده شده است متعلق به تحت تیپ‌های H₅ و H₇ بوده است (۲). ویروس‌های H₉N₂ جزء تحت تیپ‌های با بیماری‌زایی نه چندان زیاد طبقه بندی می‌شوند ولی در طول دهه اخیر گزارشات زیادی از تلفات و خسارات ناشی از این سویه‌ها در کشور ایران گزارش شده است (۳۱ و ۲۱، ۱۲، ۱۰). بدیهی است یکی از روش‌های پیشگیری و جلوگیری از انتشار بیماری در منطقه تشخیص سریع و اطلاع از تغییرات ژنتیکی تاثیرگذار بر حدت ویروس می‌باشد. زیرا در ایران سیاست ریشه-کنی و قرنطینه‌ای شدیدی در صورت رخداد

استخراج RNA

جهت جداسازی RNA ویروس از نمونه‌های نای از کیت استخراج RNA با خلوص بالا طبق دستورالعمل آن استفاده شد. کیت مزبور برای جداسازی اسید نوکلئیک ویروسی به منظور انجام RT-PCR طراحی شده است. برای انجام کار مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول کاری (Working Solution) که ترکیبی است از بافر متصل کننده (Binding Buffer) و پلی آدنیلک اسید (Poly A) در یک تیوپ ۱/۵ میلی لیتری میکروسانتریفوژ قرار گرفت. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر مایع آلانئوئیک حاوی ویروس به آن اضافه شد. سپس به منظور هضم پروتئین‌های مقدار ۵۰ میکرولیتر پروتئیناز A افزوده شد. این میکروتیوپ به میزان ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر بافر متصل کننده به محتویات افزوده شده و مخلوط شد. برای انتقال نمونه، تیوپ فیلتردار در داخل تیوپ جمع کننده قرار گرفت و تمام محتویات تیوپ ۱/۵ میکرولیتری به داخل تیوپ فیلتردار منتقل شد. برای عبور محتویات به تیوپ جمع کننده مجموعه به مدت یک دقیقه در ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ RNA به تیوپ فیلتردار چسبیده، باقی محتویات به همراه تیوپ جمع کننده خارج شد سپس تیوپ فیلتردار درون یک تیوپ جمع کننده جدید قرار داده شد و ۵۰۰ میکرو لیتر بافر حذف کننده عوامل مهار (Inhibition Removal Buffer) به تیوپ فیلتردار بالایی اضافه شده و دوباره به مدت ۱ دقیقه g ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد دوباره تیوپ جمع کننده به همراه محتویات خارج شد و برای سومین بار مجدداً تیوپ فیلتردار با تیوپ جمع کننده همراه گردید تا این مرحله ممانعت کننده‌ها مرتفع شده و ژنوم آماده‌ی شستوی بیشتر می‌شود برای این منظور مجدداً تیوپ فیلتردار

درون تیوپ جمع کننده قرار داده شد و این بار ۴۵۰ میکرولیتر بافر شستو اضافه شد و مجموعه به مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد و تیوپ جمع کننده به همراه محتویات خارج گردید مجدداً تیوپ فیلتردار درون تیوپ جمع کننده قرار داده شد دوباره ۴۵۰ میکرولیتر بافر شستو به تیوپ فیلتردار اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد به منظور خروج کامل بافر شستو مجدداً همین مجموعه به مدت ۱۰ ثانیه در ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس تیوپ جمع کننده به همراه محتویات خارج شد و این بار تیوپ فیلتردار درون یک تیوپ میکروسانتریفوژ ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شد برای جمع آوری ژنوم خالص شده ۵۰۰ میکرو لیتر بافر رقیق کننده (Elution Buffer) به تیوپ فیلتردار اضافه شده و به مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد تیوپ فیلتردار خارج گردید و میکروتیوپ حاوی ژنوم استخراج شده ویروس مورد نظر بود.

انجام RT-PCR

برای این منظور از کیت RT-PCR دو مرحله‌ای ویوا (Viva two step RT-PCR Kit) استفاده شد. جهت انجام واکنش RT (Reverse Transcriptase) پنج میکرولیتر RNA استخراج شده را با ۲ میکرولیتر پرایمر جلویی (Forward) با غلظت ۱۰ pmol مخلوط و حجم آنرا با استفاده از آب عاری از نوکلئاز به ۱۰ میکرولیتر رسانده و به مدت ۵ دقیقه در ۶۵°C انکوبه گردید و سپس ۲ دقیقه در روی یخ سرد گردید. بدنبال آن ترکیبات مورد نیاز ساخت ۱۰ میکرولیتر cDNA شامل یک میکرولیتر از ۱۰ mM dNTP mix، نیم میکرولیتر آنزیم نسخه برداری معکوس M-unit، دو میکرولیتر ۱۰۰ MuLV Reverse Transcriptase، دو میکرولیتر بافر (۱۰ X Buffer M-MuLV) و ۶/۵ میکرولیتر آب

استفاده قرار گرفت. قسمتی از ژنوم هم‌گلویتینین به طول ۴۳۰ bp که دربرگیرنده محل شکافت پروتئین هم‌گلویتینین است، توسط واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای HA تکثیر گردید (جدول ۱). شرایط واکنش و محدوده‌ی دمایی مشابه سویه H₉ می‌باشد و محصول PCR همراه با همان پرایمرهایی که جهت تکثیر بکار گرفته شده بود به منظور تعیین توالی به شرکت MWG کشور آلمان ارسال گردید و در انتها توالی ژنومی بدست آمده با استفاده از نرم افزار Bio edit Vertion 7 به توالی اسید آمینه‌ای ترجمه گردید.

نتایج

از ۱۶۰ سوآپ‌های بدست آمده از ۲۰ مرغداری دارای علائم تنفسی ۴ مرغداری (هر مرغداری شامل هشت نمونه سوآپ) در واکنش RT-PCR از لحاظ تیپ A مثبت بودند شکل (۱). در مرحله بعد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تحت تیپ‌های H₅، H₇ و H₉ مورد آزمایش قرار گرفتند که هر چهار نمونه از نظر H₉ مثبت و از لحاظ H₅ و H₇ منفی بودند شکل (۲). توالی اسید آمینه‌ای محل شکافت پروتئین هم‌گلویتینین در هر چهار ویروس الگوی KSSR را نشان می‌دادند.

عاری از نوکلئاز اضافه گردید تا حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسید. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

در واکنش PCR ۲ میکرولیتر پرایمر جلویی و عقبی با غلظت ۱۰ pmol و حجم نهایی 0.4 mM، ۵ میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر mix dNTP ۱۰ mM و حجم نهایی ۰/۲ mM، ۵ میکرولیتر بافر پلی مراز، ۰/۴ میکرولیتر Taq DNA پلیمرز با غلظت نهایی دو واحد مخلوط کرده و حجم نهایی را با استفاده از آب عاری از نوکلئاز به ۵۰ میکرولیتر می‌رسانیم. برنامه دمایی لازم جهت شناسایی تیپ A آنفلوانزا شامل ۹۴ درجه سانتیگراد واسرشت اولیه، ۴۰ سیکل تکثیر شامل ۹۴ درجه واسرشت، مرحله چسبیدن پرایمر به الگو ۵۲ درجه برای تیپ A، H₅ و H₇ و ۵۰°C برای H₉ به مدت یک دقیقه، مرحله گسترش ۷۲°C به مدت یک دقیقه و گسترش نهایی ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه می‌باشد. پرایمرهای استفاده شده مطابق جدول (۱) می‌باشند. از آنتی ژن H₉N₂، H₅N₁ و H₇N₂ خریداری شده توسط سازمان دامپزشکی کشور به عنوان کنترل مثبت و از آب عاری از نوکلئاز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

تعیین توالی محل شکافت پروتئین

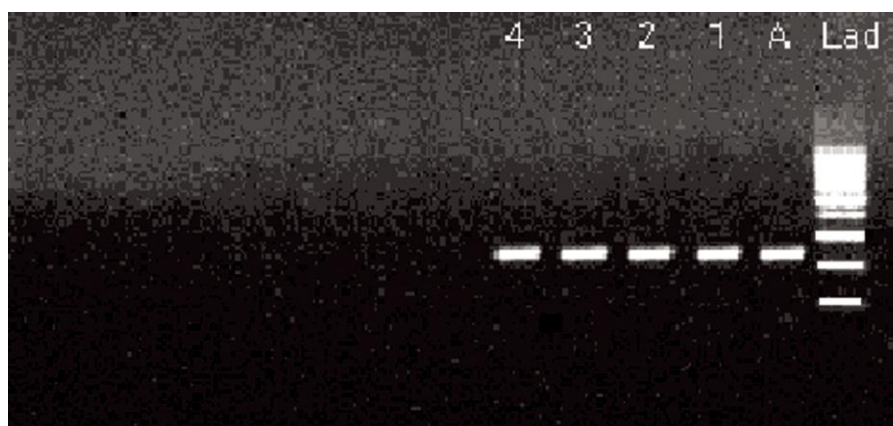
هم‌گلویتینین

نمونه‌هایی که در واکنش RT-PCR از نظر تیپ A مثبت بودند به داخل تخم مرغ جنین دار ۱۰ روزه SPF تزریق گردید. پس از ۳-۵ روز ۲۰ میکرولیتر از مایع حاصل از کیسه آلانئوتیک را با RBC ۱۰٪ درصد مخلوط و در صورت داشتن واکنش هم‌گلویتیناسیون، با فرمالین یک در هزار مخلوط گردید تا ویروس‌ها غیرفعال گردند و سپس جهت استخراج RNA مورد

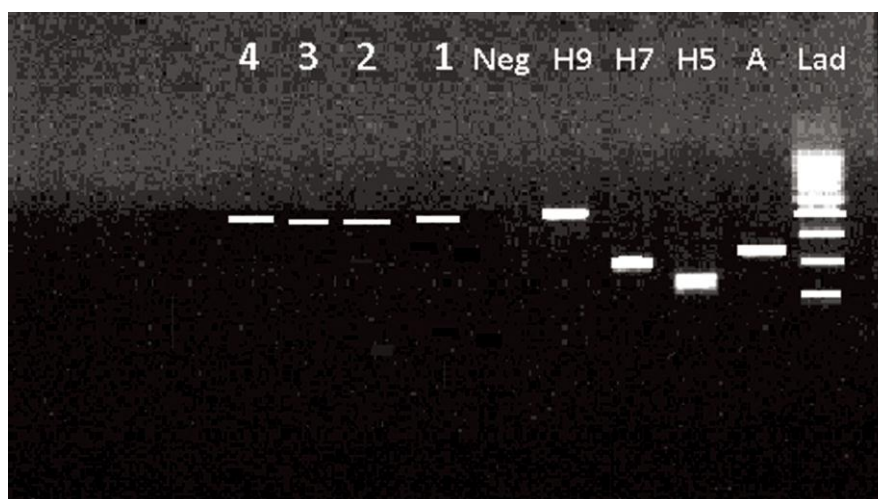
تشخیص مولکولی و تعیین توالی اسیدهای آمینه... ۶۵

جدول - ۱: پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص آنفلوآنزای تیپ A و تحت تیپ های H₉, H₅, H₇ و پرایمر مورد استفاده جهت تعیین توالی ژن HA

منبع	اختصاصی	اندازه محصول	توالی پرایمر
(۲۳)	M	۲۳۲	TTC TAA CCG AGG TCG AAA CG ACA AAG CGT CTA CGC TGC AG
(۲۰)	H ₉	۴۲۸	TTGCACCACACAGAGCACAAT TGATGTATGCCCCACATGAA
(۹)	H ₅	۱۴۹	GGG GAA TGC CCC AAA TAT GT TCT ACC ATT CCC TGC CAT CC
(۱۳)	H ₇	۲۰۰	ATGTCCGAGATATGTTAAGCA TTTGTAAATCTGCAGCAGTTC
(۱۱)	H _A	۴۳۰	GCATACATCATCCACCCAC TTGATCTAGCAGGCAGTTC



شکل - ۱: نتایج RT-PCR بر روی ژن ماتریکس در نمونه های اخذ شده از طیور صنعتی
A: Ladder 100 bp, کنترل مثبت ژن ماتریکس ۲۳۲bp
۱، ۲، ۳، ۴: نمونه های کلینیکی مثبت شده آنفلوآنزا تیپ A با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ماتریکس



شکل ۲: نتایج RT-PCR بر روی ژن همگلوئینین نمونه های بدست آمده از طیور صنعتی خراسان شمالی
Type A influenza: A⁺Ladder 100bp.Lad
H₅: آنتی ژن استاندارد (کنترل مثبت) H₇; H₅N₁: آنتی ژن استاندارد H₇ (کنترل مثبت)
H₉: آنتی ژن استاندارد (کنترل مثبت); Neg: کنترل منفی
۱، ۲، ۳، ۴: نمونه های کلینیکی مثبت شده تحت تیپ H₉N₂ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن همگلوئینین

بحث

در این مطالعه از آزمایش مولکولی RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سویه‌های رایج در منطقه به عنوان یک روش سریع و مطمئن جهت تشخیص آنفلوانزا و تحت تیپ‌های آن بهره گرفته شد. همچنین بررسی توالی اسیدهای آمینه محل شکافتگی پروتئین هم‌گلویتینین الگوی متفاوتی را نسبت به گزارشات قبلی ایران نشان می‌دادند.

تاکنون انواع مختلفی از تکنیک‌های تشخیص مولکولی براساس RT-PCR جهت شناسایی ویروس‌های آنفلوانزا گزارش شده است. ولی یکی از مشکلات عمده این آزمایشات تعیین میزان اعتبار آنهاست. بنابراین توصیه شده است که این آزمایشات ابتدا براساس استانداردهای OIE مورد تایید واقع شده و پس از آن در سطح مزرعه بکار گرفته شوند (۱۹). نکته مهم این است که تکنیک‌های RT-PCR بر روی نمونه‌های کلینیکی در صورتی می‌تواند تشخیص سریع و شناسایی تحت-تیپ‌ها را میسر سازند که پرایمر آنها به طور صحیحی طراحی و انتخاب شده باشد (۳۰). پایه و اساس انواع رهیافت‌های تشخیصی با روش RT-PCR به طور اولیه شناسایی ژن ماتریکس می‌باشد. زیرا این ژن در بین انواع ویروس‌های آنفلوانزا تیپ A بسیار حفاظت شده می‌باشد، بدنبال آن شناسایی تحت تیپ‌های H₅ و H₇ صورت می‌گیرد (۲۸). اسپاکمن و همکاران (۲۰۰۲) ویژگی آزمایشات RT-PCR را مورد تایید قرار دادند ولی هشدار دادند که پرایمر/پروب‌های اختصاصی جهت شناسایی ایزوله‌های H₅ و H₇ مختص آمریکای شمالی طراحی شده‌اند و ممکن است برای سایر تحت-تیپ‌ها مناسب نباشند (۲۸). واقعیت این است که در طی ۱۵ سال گذشته تغییرات ژنتیکی گسترده‌ای در سراسر جهان در ویروس‌های H₅N₁ رخ داده است و ۱۲ شاخه

همراه با زیرشاخه‌های آن براساس آنالیز فیلوژنتیک ژن HA گزارش شده است (۶). شاخه ۱ در ویتنام، شاخه 2.1.3 در اندونزی، شاخه 2.2.1 در مصر و شاخه‌های 2.3.2 و 2.3.4 و 7 در آسیا گسترش یافتند. علاوه بر این هرکدام از آنها به زیرشاخه‌هایی تقسیم شده‌اند (۶). در سال ۲۰۰۶ ویروس‌هایی از شاخه 2.2 در جمهوری آذربایجان، عراق، ترکیه، مصر و ایران گزارش شد (۳۵). در ایران در سال ۲۰۰۶ ویروس H₅N₁ از قوهای وحشی در دو تالاب شمالی توسط موسسه رازی جداسازی گردید (۲۴). با توجه به موارد فوق شاخه‌های مختلفی از تحت تیپ‌های H₅ در جهان شایع می‌باشند واضح است که پرایمرها و پروتکل‌های این آزمایشات نیز باید متناسب با رده‌های ژنتیکی شایع در آن منطقه باشد (۳۴). براین اساس سازمان بهداشت جهانی روشی را پیشنهاد کرده است که کلیه رده‌های ویروس H₅N₁ قابل سرایت به انسان از جمله شاخه‌های 1، 2 و 3 را شناسایی می‌کند و از آنجایی که طراحی پرایمرها براساس تغییرات ژنتیکی ویروس‌های H₅ در حال گردش صورت می‌گیرد لازم است که میزان این تغییرات در مناطق مختلف جهان مدنظر قرار گرفته و پرایمرها مطابق روز تغییر کنند (۳۳).

باتوجه به مطالب فوق، در این مطالعه جهت تشخیص آنفلوانزای تیپ A از پرایمرهای پیشنهادی سازمان بهداشت جهانی استفاده شد و همانطور که گفته شد این پرایمرها طیف وسیعی از ویروس‌های آنفلوانزای رده-های 1، 2 و 3 شناسایی می‌نماید (۳۳). از آنجایی که تشخیص تیپ A آنفلوانزا براساس توالی ژن ماتریکس صورت می‌گیرد و این توالی در تحت تیپ‌های مختلف حفاظت شده می‌باشد احتمال اتصال ناجور در این نوع پرایمرها حداقل می‌باشد (۲۸) و باند مشخص و واضحی

سویه‌های H₉N₂ جدا شده از ایران دارای یک دودمان مشترک بوده و در زیرشاخه ویروس A/Quail/Hong Kong/G1/97 قرار می‌گیرند (۲۷ و ۱۰، ۳). لذا انتخاب پرایمرهای تشخیص این تحت‌تیپ به این زیرشاخه معطوف شده است، از جمله پیریس و همکاران (۱۹۹۹) یک جفت پرایمر جهت شناسایی تحت تیپ H₉N₂ شایع در پرندگان در کشور هنگ کنگ را پیشنهاد نمودند (۲۰). کمی بعد این سویه از موارد انسانی در هنگ کنگ جدا شد و با مقایسه آن با سویه‌های پرندگان مشخص شد جهش‌هایی در توالی ژن هماگلوتینین رخ داده است و نیاز به تغییر پرایمر جهت تشخیص این سویه‌ها را ضروری می‌ساخت. این تغییرات شامل جایگزینی نوکلئوتیدی T به جای C در موقعیت 18 پرایمر جلویی و نیز نوکلئوتید C به جای T در موقعیت 17 پرایمر عقبی انجام گرفت ولی حساسیت پرایمرهای جدید ساخته شده به منظور تشخیص سویه‌های طيور کاهش چشمگیری یافت، بطوری که پرایمرهای اولیه 3 تا 100 برابر حساس تر از پرایمرهای جدید ارزیابی شدند و در نتیجه محققین مذکور پرایمرهای اولیه را جهت شناسایی سویه‌های پرندگان انتخاب نمودند. در ایران نیز بعضی از محققین از پرایمرهای فوق جهت آزمایشات تشخیصی استفاده نمودند (۲۲ و ۷). در مطالعه حاضر نیز از پرایمرهای اولیه پیریس استفاده گردید که تا حدودی با کاهش تراکم باندهای مورد نظر همراه بود شکل (۲). نظر به اینکه گزارشات متعددی مبنی بر وقوع تغییرات ژنتیکی در ژن هماگلوتینین سویه‌های H₉N₂ ایران ارائه شده است (۲۷ و ۱۷، ۱۰) و مدت زیادی از ابداع پرایمر فوق می‌گذرد، ممکن است این پرایمرها متناسب با سویه‌های جدید ایران نباشند و در این زمینه بررسی بیشتری مورد نیاز می‌باشد.

در الکتروفورز انتظار می‌رود و نتایج بدست آمده نیز گویای این مطلب می‌باشد (شکل ۱).

به منظور تشخیص تحت تیپ H₅ از پروتکل توصیه شده توسط هوفمن و همکاران استفاده گردید زیرا این روش براساس شناسایی ویروس‌های آسیایی شاخه Qinghai-like clade 2.2 طراحی شده است (۹) و ویروس جدا شده در ایران و کشورهای همسایه (خاورمیانه) عمدتاً متعلق به شاخه 2.2 بوده‌اند (۳۵). همچنین این روش به عنوان یکی از آزمایشات لیست شده در فهرست مورد تایید OIE است (۱۹).

ویروس‌های تحت تیپ H₇ براساس آنالیز فیلوژنتیک تکاملی به چهارشاخه اصلی تقسیم می‌شوند شاخه آمریکای جنوبی، شاخه آمریکای شمالی، شاخه استرالیا و ویروس‌های اروپا آسیایی توام با آفریقا شاخه چهارم را تشکیل می‌دهند (۱۴). علاوه بر این ارتباط نزدیکی که بین ساختار ژنتیکی و منطقه جغرافیایی ویروس‌های جدا شده از این تحت تیپ مشاهده گردیده است (۱۴). در مطالعه حاضر به منظور شناسایی تحت تیپ H₇ با توجه به ارتباط نزدیک سویه‌های آسیا با اروپا در آنالیز فوق، از پرایمر و پروتکل پیشنهادی آزمایشگاه مرجع اتحادیه اروپا استفاده گردید (۲۵ و ۱۳).

براساس مطالعات فیلوژنتیک ویروس‌های H₉N₂ به دو شاخه اصلی تقسیم می‌شوند شاخه آمریکایی و شاخه اروپایی-آسیایی^۱. شاخه اروپایی و آسیایی به نوبه خود حداقل به سه زیرشاخه تقسیم می‌شود: زیرشاخه G1 که نماینده آن A/Quail/Hong Kong/G1/97، زیرشاخه Y280 که نماینده آن پروتوتایپ A/Duck/Hong Kong/Y280/97 و زیر شاخه کره که نماینده آن A/chicken/Korea/38349/p96323/96 می‌باشد (۱۶). بررسی درخت فیلوژنتیک نشان می‌دهد که تمام

¹ - Eurasian

به طور کلی با توجه به تشکیل باندهای مورد نظر مختص آنفلوآنزای تیپ A و تحت تیپ‌های H₉ و با همترازی توالی بدست آمده از محل شکافت پروتئین هماگلوترینین در بانک ژن، سویه‌های مذکور H₉N₂ تشخیص داده شدند. شناخت تحت تیپ‌های رایج در منطقه با استفاده از RT-PCR یک دیدگاه کلی از ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان را ترسیم می‌نماید، اولویت بعدی بررسی توالی آمینواسیدی در محل شکافت پروتئین هماگلوترینین است که نقش تعیین کننده‌ای در پیش‌بینی حدت ویروس‌ها و خطر تبدیل سویه‌های با بیماری‌زایی پایین به سویه‌های با بیماری‌زایی بالا دارد (۱). محل شکافتگی در ویروس‌های کم حدت دارای یک اسید آمینه آرژنین در موقعیت‌های 1 و 3 می‌باشد. این نوع گلیکوپروتئین‌ها فقط توسط پروتئازهای خاصی مثل شبه تریپسین‌ها شکافته می‌شوند که در قسمت‌های خاصی از بدن میزبان یافت می‌شوند، لذا عفونت‌زایی این ویروس‌ها به نقاط محدودی از بدن به عنوان مثال دستگاه تنفس و گوارش که دارای این نوع آنزیم‌ها هستند محدود می‌شود ولی پروتئین HA0 در ویروس‌های با بیماری‌زایی بالا حاوی چندین اسید آمینه بازی آرژنین یا لیزین در منطقه شکافت می‌باشند و این الگو توسط پروتئازهای موجود در تمام نقاط بدن شکافته می‌شوند، لذا ویروس‌های مذکور قادر هستند در تمام بافت‌ها و اندام‌های حیاتی بدن تکثیر پیدا نمایند (۱). یکی از الگوهای ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد سکانس R-X-R/K-R در محل شکافت HA0 می‌باشد (۳۶). بنابراین جایگزینی فقط یک نوکلئوتید C به A یا G در موقعیت 3 لازم است تا ویروس‌های جدا شده در این مطالعه با سکانس KSSR/GLF تبدیل به ویروس‌های بالقوه حاد گردند. این الگو با موارد قبلی گزارش شده از طیور صنعتی ایران که عمدتاً

RSSR/GLF می‌باشد تفاوت دارد. سایر مطالعاتی که در ایران انجام شده است از جمله: وصفی مرندی (۲۰۰۲)، کریمی و همکاران (۲۰۰۴)، کیانی‌زاده و همکاران (۲۰۰۶)، همایونی مهر و همکاران (۲۰۱۰)، سلطانی الوار و همکاران (۲۰۱۰)، الگوی RSSR/GLF را گزارش کرده‌اند (۳۲ و ۱۷، ۱۲، ۱۱، ۱۰). برخی از پژوهشگران از جمله قلیانچی و همکاران (۲۰۰۷) الگوی RSSR و RSNR و قادی و همکاران در سال ۲۰۰۷ الگوی RSNRRLF و RSNKRLF را از بازار فروش پرندگان زنده گزارش نموده و خطر تبدیل جدایه‌های فوق به سویه‌های با حدت بالا را اعلام نمودند (۳۸ و ۸). در مطالعه دیگر توسط بزرگی و همکاران (۲۰۱۲) از ویروس‌های جدا شده از طیور صنعتی ایران در سال ۲۰۰۹ هر دو الگوی KSSRGLF و RSSR/GLF را گزارش نمودند (۳). این طور به نظر می‌رسد که وقوع ویروس‌های آنفلوآنزا H₉N₂ با الگوی KSSR در کشور از سال ۲۰۰۹ شروع شده باشد. اگرچه این الگو همچنان به عنوان ویروس با حدت پایین شناخته شده است ولی دلالت می‌کند که تغییرات ژنتیکی مداومی در این جایگاه ژنومی مرتبط با حدت ویروس به مرور زمان در سویه‌های ایران رخ داده است و ممکن است در صورت فراهم شدن زمینه مناسب به ویروس‌هایی با حدت بالا در آینده تبدیل شوند.

بنابراین روش RT-PCR به عنوان یک روش سریع جهت تشخیص ویروس‌های آنفلوآنزا محسوب می‌گردد ولی با توجه به تغییرات ژنتیکی گسترده‌ای که در این ویروس‌ها رخ می‌دهد لازم است که این آزمایشات بروزرسانی شده و پرایمرها و پروتکل‌های تشخیصی را بر مبنای توالی ژنتیکی ویروس‌های شایع در محدوده جغرافیایی که بر اساس رسم درخت فیلوژنتیک در یک شاخه قرار می‌گیرند، انتخاب نمود. ضمناً با توجه به

6. Gavin, J.D.S. (2012). Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature, in *Influenza Other Respi Viruses*, WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group: Influenza Division, Centers for Disease Control and Prevention, MS G16, Atlanta, Georgia, 1-5.
7. Ghadi, S., Bozorgmehri-Fard, M., Karimi, V., Tavassoti-Kheiri, M., Rafiei, M. (2009). Genetic analysis of hemagglutinin protein of H9N2 isolated from live bird markets in Tehran province in 2007-2008. *Iranian Journal of Virology* 3: 7-15.
8. Ghalyanchi, L.A., Karimi, V., tavassoti-Kheiri, M., Bozorgmehri-Fard, M.H. (2008). Nucleotide and aminoacid sequence analysis of hemagglutinin protein in cleavage site region of H9N2 isolated from broilers in Tehran province during 1998-2007. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 7: 529-34.
9. Hoffmann, B., Harder, T., Starick, E., Depner, K., Werner, O., Beer, M. (2007). Rapid and highly sensitive pathotyping of avian influenza A H5N1 virus by using real-time reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 600-3.
10. Homayounimehr, A.R., Dadras, H., Shoushtari, A., Pournakhsh, S.A. (2010). Sequence and phylogenetic analysis of the haemagglutinin genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commercial chickens in Iran. *Tropical Animal Health Production* 42: 1291-7.
11. Karimi, V., Bozorgmehrifard, M., shabazzadeh, D., Esmaelizad, M., Pournakhsh, S.A. (2004). Sequence analysis and phylogenetic study of hemagglutinin gene of H9N2 subtype of avian influenza virus isolated during 1998-2002 in Iran. *Iranian Biomedical Journal* 8: 167-72.

اینکه توالی اسید آمینه‌ای محل شکافتگی پروتئین هم‌آگلوتینین سویه‌های H₉N₂ در این استان نسبت به موارد قبلی گزارش شده در ایران تغییر کرده است لذا پایش مداوم تغییرات ژنتیکی این ویروس‌ها به منظور آگاهی از خطر تبدیل شدن آنها به سویه‌های حاد پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی که تسهیلات لازم این پروژه را فراهم نموده است تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از همکاری صمیمانه سرکار خانم اشرف آبادی و آقای دکتر اشتری و کلیه همکاران آزمایشگاه رفرانس آنفلوآنزای پرندگان مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

1. Alexander, D.J. (2008). Avian influenza - diagnosis. *Zoonoses Public Health* 55: 16-23.
2. Alexander, D.J. (2007). An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 25: 5637-44.
3. Bozorgi, A., Keyvanfar, H., Shushtari, H., Bahmaninejad, M., Eshratbadi, F. (2012). Molecular characterization and phylogenetic analysis of hemagglutinin and neuraminidase genes of H9N2 avian influenza viruses isolated in Iran in 1999 and 2009. *African Journal of Microbiology Research* 6: 4550-6.,
4. Capua, I., Alexander, D.J. (2006). The challenge of avian influenza to the veterinary community. *Avian Pathology* 35: 189-205.
5. Chaharaein, B., Omar, A.R., Aini, I., Yusoff, K., Hassan, S.S. (2009). Detection of H5, H7 and H9 subtypes of avian influenza viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Microbiol Reserch* 164: 174-9.

- H9N2: Aspects of Laboratory Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 3426-7.
21. Pourbakhsh, S.A., Khodashenas, M., Kianizadeh, M., Goodarzi, H. (2000). Isolation and identification of avian influenza virus H9N2 subtype. *Archive Razi Institute* **51**: 27-34.
 22. Saberfar, E., Najafi, A., Goodarzi, Z., Lashini, H. (2009). Multiplex Reverse Transcription-PCR assay for detection of type A influenza virus plus differentiation of avian H7 and H9 hemagglutinin subtypes in Iran. *Iranian Journal of Public Health* **38**: 29-34.
 23. Saberfar, E., Najafi, A., Lashini, H. (2008). A Reverse transcription-PCR assay for detection of type A influenza virus and differentiation of avian H7 subtype. *Iranian Journal of Virology* **2**: 23-6.
 24. Shoushtari, A., Hablolvarid, M.H., Vascellari, M., Hedayati, A. (2007). Mortality of wild swans associated with naturally infection with highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in Iran. *Archives of Razi Institute* **62**: 207-13.
 25. Slomka, M.J., Coward, V.J., Banks, J., Londt, B.Z., Brown, I.H., Voermans, J., Koch, G., Handberg, K.J., Jorgensen, P.H., Cherbonnel-Pansart, M., Jestin, V., Cattoli, G., Capua, I., Ejdersund, A., Thoren, P., Czifra, G. (2007). Identification of sensitive and specific avian influenza polymerase chain reaction methods through blind ring trials organized in the European Union. *Avian Diseases* **51**: 227-34.
 26. Slomka, M.J., Pavlidis, T., Banks, J., Shell, W., McNally, A., Essen, S., Brown, I.H. (2007). Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. *Avian Diseases* **51**: 373-7.
 27. Soltanialvar, M., Shoushtari, H., Bozorgmehrifard, M., Charkhkar, S., Eshratyabadi, F. (2010). Molecular
 12. Kianizadeh, M., Pourbakhsh, S.A., Toroghi, R., Momayez, R. (2006). Pathogenicity and haemagglutinin gene sequence analysis of Iranian influenza H9N2 virus isolated during 1998-2001. *Iranian Journal of Veterinary Research, University of Shiraz* **3**: 37-41.
 13. Laboratory, A.I.C.R. (2007). One Step RT PCR for detection of H5 & H7 avian influenza & cleavage site sequencing, in *the standard operating procedure used by the avian influenza CRL at the Veterinary Laboratories Agency*, 1-10.
 14. Lebarbenchon, C., Stallknecht, D.E. (2011). Host shifts and molecular evolution of H7 avian influenza virus hemagglutinin. *Virology Journal* **8**: 328-30.
 15. Lee Ms Fau-Chang, P.C., Chang P.C., Fau-Shien, J.H., Shien Jh., Fau-Cheng, M.C., Cheng Mc., Fau-Shieh, H.K., Shieh, H.K. (2001). Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods* **97**: 13-27.
 16. Matrosovich, M.N., Krauss, S., Webster, R.G. (2001). H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* **281**: 156-62.
 17. Moosakhani, F., Shoshtari, A.H., Pourbakhsh, S.A., Keyvanfar, H., Ghorbani, A. (2010). Phylogenetic analysis of the hemagglutinin genes of 12 H9N2 influenza viruses isolated from chickens in Iran from 2003 to 2005. *Avian Diseases* **54**: 870-4.
 18. Nagarajan, S., Tosh, C., Smith, D.K., Peiris, J.S., Murugkar, H.V., Sridevi, R., Kumar, M., Katore, M., Jain, R., Syed, Z., Behera, P., Cheung, C.L., Khandia, R., Tripathi, S., Guan, Y., Dubey, S.C. (2012). Avian influenza (H5N1) virus of clade 2.3.2 in domestic poultry in India. *PLoS One* **7**: 1-8.
 19. OIE, (2009). *Avian influenza*, in OIE Terrestrial Manual, 1-20.
 20. Peiris, M., Yam, W.C., CHAN, K.H., Shortridge, K. (1999). Influenza A



35. WHO (2011). Programmes and projects, influenza, Updated unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses, Technical Resources and Current Trees/Alignments, H5 full tree pdf.
36. Wood, G.W., McCauley, J.W., Bashiruddin, J.B., Alexander, D.J. (1993). Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Archive of Virology* **130**: 209-17.
- characterization of hemagglutinin and neuramidase genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commercial broiler chicken in Iran. *Journal of Biological Sciences* **10**: 145-50.
28. Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., Suarez, D.L. (2002). Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 3256-60.
29. Spackman, E., Suarez, D.L. (2008). Detection and identification of the H5 hemagglutinin subtype by real-time RT-PCR. *Methods in Molecular Biol* **436**: 27-33.
30. Starick, E., Romer-Oberdorfer, A., Werner, O. (2000). Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses (AIV). *Journal of Veterinary Medicine* **47**: 295-301.
31. Toroghi, R., Momayez, R., Pourbakhsh, S.A. (2003). Amino acid sequence of cleavage site of hamagglutinin protein in three avian influenza virus (H9N2). *Pajouhesh and Sazandegi* **60**: 95-103.
32. Vasfi Marandi, M., Bozorgmehri-Fard, M.H. (2002). Isolation of H9N2 subtypes of avian influenza viruses during an outbreak in chickens in Iran. *Iranian Biomed Journal* **61**: 13-7.
33. WHO (2007). Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases: Geneva, 1-28.
34. WHO (2011). The use of PCR in the surveillance and diagnosis of influenza, in Report of the 4th meeting of the WHO working group on polymerase chain reaction protocols for detecting subtype influenza A viruses, Geneva, Switzerland, 1-10.

Molecular Diagnosis and Determination of Amino Acid Sequence of Hemagglutinin Cleavage Site of Avian Influenza Viruses Isolated from Broilers in North Khorasan Province

Bahari, P.¹, Pourbakhsh, S.A.^{2*}, Shoushtari, H.², Bahmaninejad, M.A.²

1- Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Research and Diagnosis of Poultry Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

Received Date: 17 December 2012 Accepted Date: 24 April 2013

Abstract

Avian influenza virus has been recognized as one of the most important pathogen in poultry that caused economic losses to the poultry industry of Iran. Rapid detection and pathotyping is the important priority in order to prevent extension of disease in Iran. RT-PCR method was used for the rapid detection of influenza viruses. The amino acid sequence of cleavage site of hemagglutinin was considered as a molecular determinant for the prediction of pathogenicity influenza viruses. In this study, 160 tracheal swabs samples were taken from 20 poultry farm to monitor influenza infection in North Khorasan province. RT-PCR assay was developed based on the most common genotype in Iran detecting type A and H9, H5 and H7 subtypes by specific primers targeting Matrix (M) and Hemagglutinin(HA) genes, respectively. The samples which were positive as type A influenza inoculated to embryonated eggs of 9-10 days. After 3-5 days, the allantoic fluids were tested with Hemagglutinin assay. The samples that contained HA activity were inactivated with formalin 0.1%. These fluids were used for RNA extraction. A segment of 432bp was amplified by RT-PCR and nucleotide sequencing. The results showed that four poultry farms were positive for type A of influenza virus. All of them were negative for H5 or H7 but positive for H9 virus. The sequence analysis of hemagglutinin revealed that four isolates shared a KSSR motif at the cleavage site of HA. Although this motif represented low pathogenicity in poultry, it was different from previous Iranian isolates. As a result RT-PCR assay based on common genotype in region was considered as a rapid test for the detection of influenza viruses. The cleavage site sequence analyses indicated that these viruses have the potential for emerging highly pathogen influenza viruses. Therefore, continuous monitoring of viruses is being recommended.

Keywords: Avian influenza, RT-PCR, H9-H7-H5 subtype, Cleavage site of hemagglutinin, North Khorasan

*Corresponding author: Pourbakhsh, S.A.

Address: Department of Research and Diagnosis of Poultry Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran. Tel: 02634570038

Email: apourbakhsh@rvsri.ac.ir