

## تالاب میقان استان مرکزی، مرکز ورود ویروس آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان H5، ایران، ۱۳۹۵

مینو مطهر<sup>۱</sup>، هادی کیوانفر<sup>۲\*</sup>، عبدالحمید شوشتری<sup>۳</sup>، محمد حسین فلاح مهرآبادی<sup>۳</sup>، غلامرضا نیکبخت بروجنی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استاد، گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- استادیار، بخش بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۴- استاد، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۲۲ تیر ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۷ تیر ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲۸ تیر ۱۴۰۱

### چکیده

طی دو دهه گذشته، ویروس آنفلوآنزای فوق حاد طیور سویه H5 به دلیل ماهیت زئونوتیک بودن و ایجاد جهش فراوان مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. هدف از مطالعه پیش رو بررسی خصوصیات فیلوژنتیک و مولکولی ژن هم‌اگلوتینین (HA) سویه H5N8 وارد شده به ایران در سال ۱۳۹۵ در تالاب میقان شهرستان اراک استان مرکزی بود. بدین منظور نمونه‌های مربوطه به تخم‌مرغ‌های ۱۴ - ۱۰ روزه تلقیح شده و پس از استخراج مایع آلانتوئیک و استخراج RNA و انجام PCR و تعیین توالی ژن‌ها، درخت‌های فیلوژنتیک توسط برنامه Mega7 رسم شده و خصوصیات مولکول شامل محل شکست (Cleavage Site) محل اتصال به گیرنده (Receptor binding Site)، محل گلیکوزیله (Glycosylation Site)، محل آنتی‌ژنیک (Antigenic Site) و جهش‌های مرتبط با ژن HA بررسی گردید. بر اساس آنالیز توالی اسید آمینه ژن HA، شامل محل شکست موتیف اسید آمینه پلی‌بازیک PLREKRRKR/GLF، که مشخصه ویروس‌های آنفلوآنزای فوق حاد بوده و جهش‌های T156A، S123P، S133A مرتبط با افزایش اتصال به اسید سیالیک پستانداران بود تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن HA، بیانگر طبقه‌بندی این ویروس در کلد (Clade) ۲،۳،۴،۴b بوده و به نظر می‌رسد که ورود این سویه به ایران احتمالاً از طریق مسیر پروازی پرندگان وحشی مهاجر، از غرب آسیا به شرق آفریقا افتاده است.

واژه‌های کلیدی: آنفلوآنزای پرندگان، ایران، فوق حاد

## مقدمه

ویروس‌های آنفوآنزای فوق حاد (HPAI) H5N1 (Highly pathogenic avian influenza) آسیایی اولین بار در سال ۱۹۹۶ در چین جدا شدند. (۱) این ویروس‌ها به اوراسیا و آفریقا گسترش پیدا کرده و باعث مرگ و میرهای زیادی در طیور و پرندگان وحشی شده‌اند (۲). ویروس HPAI H5N8 A/duck/Jiangsu/k1203/2010 از دودمان H5N1 آسیایی (ژن HA متعلق به کلد ۲,۳,۴) ابتدا در سال ۲۰۱۰ در بازار پرندگان زنده در شرق چین از اردک‌ها جدا شد (۳, ۴). در سال ۲۰۱۳، بازارهای طیور زنده در شرق چین اولین مکان برای جداسازی ویروس‌های جدید نوتریب H5N8 HPAI بود و سپس ویروس در طیور و پرندگان وحشی در جمهوری کره و ژاپن تشخیص داده شد (۵). در اواخر سال ۲۰۱۴، دوباره به کره جنوبی و ژاپن وارد شدند و سپس در اروپا و آمریکای شمالی شناسایی شدند (۶). گزارش‌های متعددی در مورد ورود HPAI به ایران از سال ۲۰۰۶ منتشر شده است: (H5N8 و H5N1). ساب تایپ H5N1 اولین بار در ۱۳ فوریه ۲۰۰۶ در قوهای وحشی در دو تالاب شمال ایران (مازندران) شناسایی و تأیید شد (۷). در سال ۲۰۱۱ مورد دیگری در روستای بالازرین کلای شهرستان جویبار استان مازندران در اردک‌های اهلی و مرغ‌ها گزارش شد (۸). در سال ۲۰۱۵ ورود مجدد ویروس از طیور بومی روستای نوگردن شهرستان آمل استان مازندران گزارش گردید (۹). همچنین، در نوامبر ۲۰۱۶، HPAI H5N8 اولین بار ورود این ویروس در یک مرغداری تخم‌گذار در استان تهران و سپس در تالاب میقان استان مرکزی شناسایی شد (۱۰).

ویروس‌های آنفلوانزا مرغی نه تنها پاتوژن‌های مهمی برای پرندگان محسوب می‌شوند بلکه در بهداشت عمومی به علت ایجاد عفونت در

جمعیت‌های انسانی نیز مهم هستند (۱۱). بنابراین، نظارت و توصیف مداوم ویروس‌های HPAI که ممکن است تهدیدی برای صنعت طیور تجاری و بهداشت عمومی باشد، برای هرگونه شیوع احتمالی قابل توجه است.

از این رو در این مطالعه برای نخستین بار ژن کامل HA ویروس آنفولانزای A/goose/Iran-meighan/180/2016 وارد شده به ایران در سال ۱۳۹۵ را از نظر مولکولار فیلوژنتیک و اپیدمیولوژیک مورد بررسی قرار دادیم تا تجزیه و تحلیل این مولکول اطلاعاتی در مورد جزئیات مولکولی، ارتباط با ویروس‌های دیگر جهان و مسیر ورود آنها به کشور و همچنین خطر بالقوه‌ای که ممکن است در برابر صنعت طیور و بهداشت عمومی داشته باشد، فراهم کند و جزء تاریخچه کشور باقی بماند.

## مواد و روش‌ها

**الف) نمونه‌برداری و استخراج RNA:** در سال ۱۳۹۵ تلفات در تالاب میقان استان مرکزی اتفاق افتاد. مشاهده بالینی و نمونه‌برداری از بافت‌های طحال، نای، ریه، سکوم، مغز و کبد با رعایت پروتکل انجام شد. نمونه‌ها تحت شرایط کنترل شده به آزمایشگاه برده شد. پس از آماده کردن نمونه‌ها، به تخم‌مرغ SPF شرکت Venky هندوستان تلقیح شد. پس از تلفات مایع آلتوتویک برای تعیین سبب‌تایپینگ این ویروس‌ها مورد استفاده قرار گرفت. از نمونه‌های اصلی هموژنیزه شده برای استخراج RNA با استفاده از کیت (Roche HighPureViral NucleicAcid Germany) طبق پروتوکول انجام شد. تمام مراحل در زیر هود LEVEL 3 شرکت RADLAB ساخت ایران انجام شد. RNA الیکوت شده و تا هنگام استفاده در ۷۰- ذخیره شد.

**ب) RT-PCR و تعیین توالی ژنوم:** تکثیر قطعه

گرفت (۱۹-۱۶) شکل‌های محل‌های آنتی‌ژنیک و محل‌های اتصال به گیرنده موجود در ژن HA توسط EzMol webserver رسم شدند (۲۰).

### نتایج

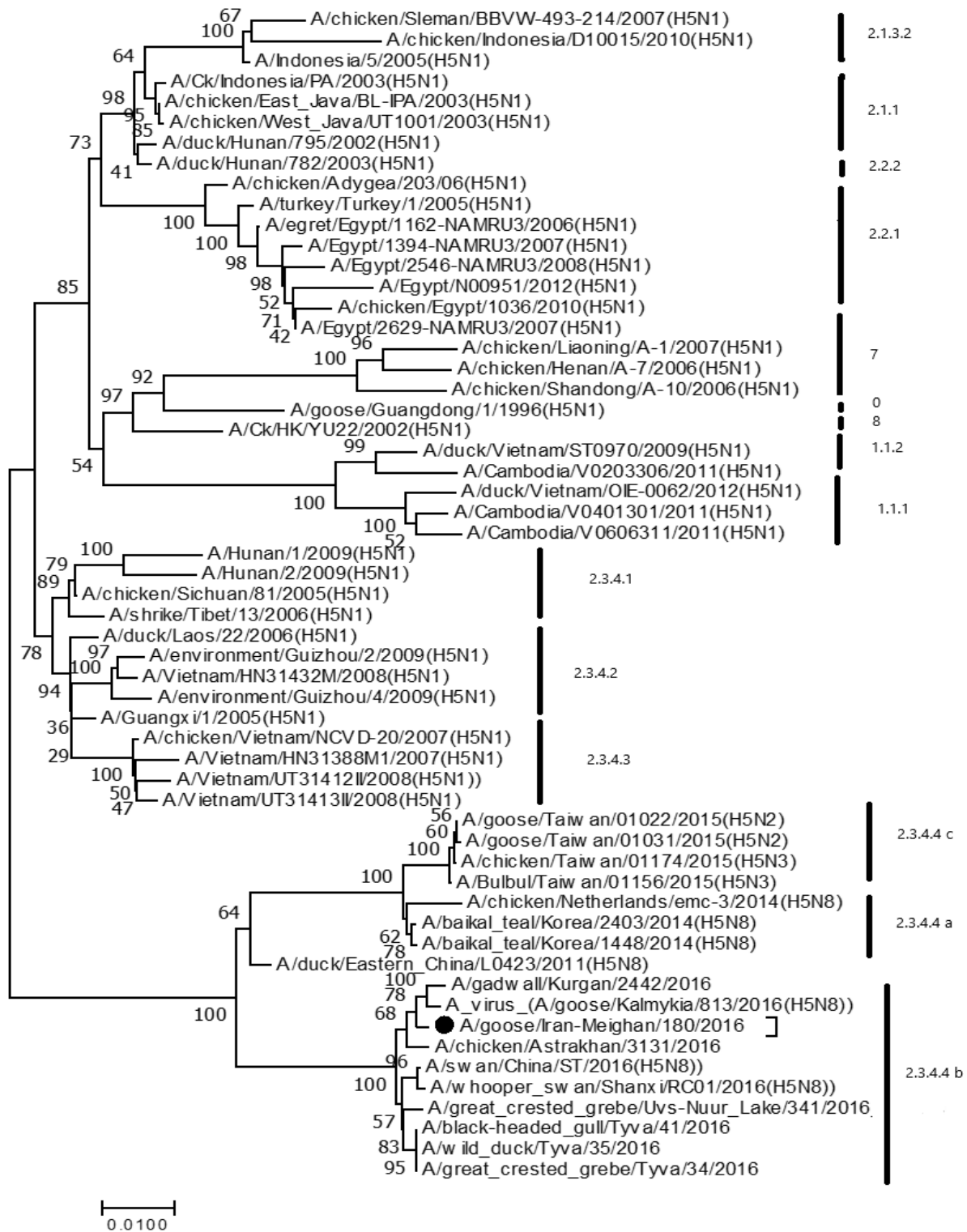
**آنالیز فیلوژنیک:** تحلیل فیلوژنیک ژن HA ویروس A/goose/Iran-meighan/180/2016 نشان داد که متعلق به کلد b ۴، ۳، ۲ بوده و بررسی درخت فیلوژنیک ژن HA این ویروس نشان داد که ایزوله متعلق به ایران همراه ایزوله‌های جدا شده از شهرهای روسیه A/gadwall/Kurgan/2442/2016، A/goose/Kalmykia/813/2016، و A/chicken/Astrakhan/3131/2016 در یک زیرشاخه قرار گرفت و طبق نتایج Blast بیشترین شباهت توالی نوکلئوتیدی را با ایزوله A/goose/Kalmykia/813/2016 Identity (شناسایی) ۹۰ درصد داشت (شکل ۱).

**خصوصیات مولکولی:** بر اساس آنالیز توالی اسید آمینه، ویروس A/goose/Iran-meighan/180/2016 دارای یک موتیف اسید آمینه polybasic (PLREKRRKR/GLF) در محل شکست ژن HA در موقعیت اسید آمینه ۳۴۵-۳۳۷ بود. هفت محل گلیکوزیله با موتیف N-X-T/S در موقعیت‌های ۲۷، ۳۹، ۱۸۱، ۲۰۹، ۳۰۲ در قسمت HA1 سر پروتئین‌ها و ۴۹۹ و ۵۵۸ در قسمت HA2 ساقه پروتئین HA شناسایی شد. پروتئین HA دارای اسید آمینه گلوتامین در موقعیت ۲۲۲ و گلايسين در موقعیت ۲۲۴ بوده که از خصوصیات ویروس‌های آنفلوآنزای طیور است. سه جهش S133A، S123P، T156A مرتبط با امکان افزایش اتصال ویروس به گیرنده‌های اسید سیالیک انسان یعنی Gal-6، a2 (SA) در پروتئین HA ویروس مشاهده شد.

کامل ژن HA با استفاده از سیستم تک مرحله RT-PCR با استفاده از کیت RT-PCR titan one step tube شرکت (Roche) آلمان با استفاده از پرایمرهای Forward و Reverse عمومی Hoffmane انجام شد (۱۲). قطعه DNA توسط کیت Product Purification (Roche, Germany) High Pure PCR kit خالص و تعیین توالی به روش سنگر انجام شد و به ژن بانک ارسال شد (شماره دسترسی: OM980739). همه نمونه‌ها با روش‌های مولکولی توصیه شده توسط سیستم اطلاعات بهداشت جهانی حیوانات (OIE) تست شدند (۱۳).

**ج) آنالیز فیلوژنیک:** بعد از دریافت جواب سکانس‌ها با استفاده از برنامه BLAST مربوط به NCBI جایگاه هر کدام از ژن‌ها از لحاظ نوع subtype مشخص شد. برنامه Editseq 5.0 (DNASTAR, Madison, WI, USA) برای مونتاژ و ترجمه توالی نوکلئوتید به توالی پروتئین استفاده شد. توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از برنامه MEGA7.0 تراز چندگانه (multiple sequence alignment) شدند و با استفاده از روش Neighbor joining با ۵۰۰ bootstrap درخت‌های فیلوژنیک رسم شدند. برای اطمینان بیشتر از لحاظ نوع کلدها و شماره‌گذاری رزیدوهای (Residues) توالی HA (H5 numbering) با اطلاعات موجود در وبسایت Influenza Resaerch Database (IRD) بررسی شد.

**د) آنالیز مولکولی:** برای شناسایی محل‌های گلیکوزیله موجود در ژن HA از سیستم NetNGlyc 1.0 server استفاده شد (۱۴). برای شناسایی محل‌های اتصال به گیرنده (Receptor Binding Site) موجود در ژن HA (H3 numbering) (۱۵) و همچنین محل‌های آنتی‌ژنیک (Antigenic Site) موجود در ژن HA (H3 numbering) مورد مطالعه، بر اساس پژوهش‌های انجام شده مورد بررسی قرار



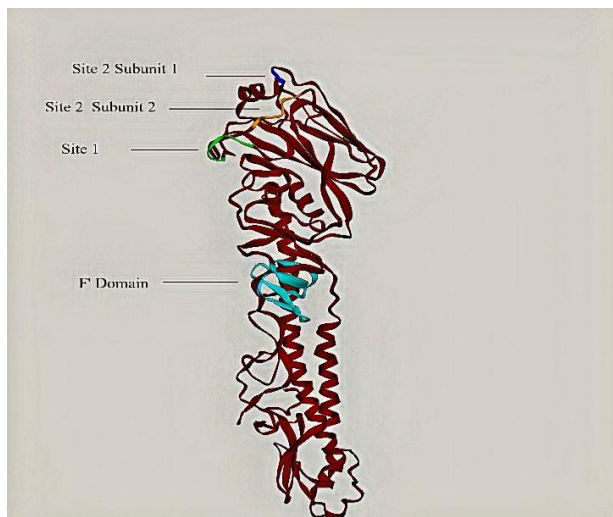
شکل ۱- درخت فیلوژنیک بر اساس ژن HA ویروس GS/Iran-meighan/180/16. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 روش Neighbor Joining و Bootstarp 500 کشیده شده است.

مطابق با محل Ca در HA H1 و محل A در HA H3 و Site 2 مطابق با محل Sa در HA H1 و محل

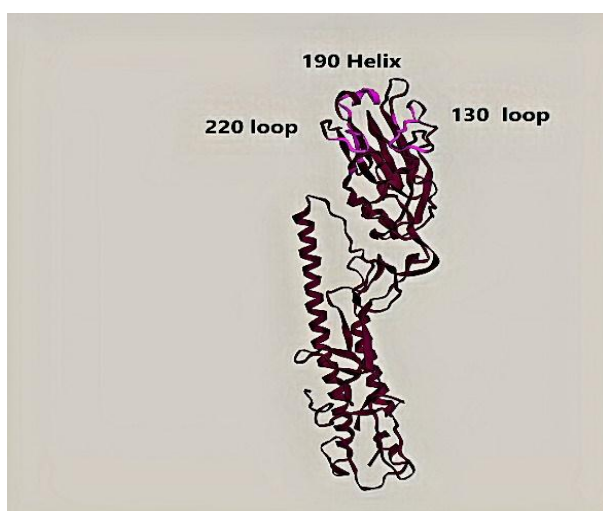
محل‌های آنتی‌ژنیک موجود در قسمت HA1 پروتئین HA ویروس مورد مطالعه شامل Site 1

ویروس مورد مطالعه شامل سه فاکتور 130-loop، 190- Helix و 220-Loop قسمت کناره و رزیدوهای محافظت شده Y98, W153, H183 Y195 (H3numbering) پایه را تشکیل می‌دهد. این دو قسمت یک حفره کم عمق برای اسید سیالیک تشکیل می‌دهند (شکل ۳ و جدول ۲).

B در HA H3 می‌باشد. علاوه بر این، تحت دامنه ادغام F' (Fusion Subdomain) (ساب دومین  $\beta$ -sheet دو لایه در ناحیه ساقه، رزیدوهای ۲۷۵-۳۰۷) یکی از محل‌های آنتی‌ژنی در HA H5 است. (شکل ۲ و جدول ۱). محل‌های اتصال به گیرنده موجود در قسمت HA1 پروتئین HA



شکل ۲- محل‌های آنتی‌ژنیک موجود در پروتئین مونومر نواری HA ویروس GS/Iran-meighan/180/16 که با استفاده از برنامه EzMol webserver رسم شده است



شکل ۳- محل اتصال گیرنده موجود در پروتئین مونومر نواری HA ویروس GS/Iran-meighan/180/16 که با استفاده از برنامه EzMol webserver رسم شده است

جدول ۱ - محل‌های آنتی‌ژنیک موجود در پروتئین HA (H3 numbering) ویروس GS/Iran-meighan/180/16

محل‌های آنتی‌ژنیک	( HA1 Head ) Site 1	( HA1 Head ) Site 2	F' Domain
	(رزیدو ۱۴۵-۱۴۰)	(رزیدو ۱۵۷-۱۵۶) Subunit 1	(HA1 stem) (رزیدو ۳۰۷-۲۷۵)
		Subunit 2	
توالی محل‌های آنتی‌ژنیک	PYQGTP	KK	NHETS

جدول ۲ - محل‌های اتصال گیرنده موجود در پروتئین HA ویروس GS/Iran-meighan/180/16

محل‌های اتصال گیرنده	130- loop	190- Helix	220- Loop
	(رزیدو ۱۳۰-۱۴۰) (H3numbering)	(رزیدو ۱۹۰-۱۹۹) (H3numbering)	(رزیدو ۲۲۰-۲۳۰) (H3numbering)
توالی محل‌های اتصال گیرنده	HETSGVSAACP	EQTNLYKNPT	RSQVNGQRGRM

### بحث و نتیجه‌گیری

توصیف صفات اختصاصی ویروس‌های شناسایی شده در هنگام شیوع یک بخش اساسی نظارت بر آنفلوانزا است. از زمان ورود و شناسایی اولین ویروس‌های آنفلوانزای فوق حاد به کشور (۱۳۸۴) تاکنون حدود ۱۶ سال گذشته است. ویروس آنفلوانزای طیور فوق حاد H5 آسیایی اولین بار در سال ۱۹۹۶ در Guangdong چین از غازها جدا شد و در سال ۱۹۹۷ در هنگ‌کنگ دوباره ظاهر شد. (۲۱) نگرانی عمده‌ای به جامعه علمی و بهداشتی جهان تحمیل شد، نگرانی به دلیل این واقعیت بود که ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان پس از سال‌ها گردش در بین میزبان‌های معمول خود، سد گونه‌ای را شکسته و قدرت سازگاری با میزبان جدید یعنی انسان را پیدا کرده‌اند. از هنگام حرکت امواج این ویروس‌های نو ظهور توسط پرندگان مهاجر که نقش کلیدی در گسترش ویروس‌های HPAI ایفا می‌کنند از آسیای جنوب شرقی به طرف غرب (شامل آسیای مرکزی، خاورمیانه، آفریقا و اروپا)، کشور ما نیز ورود این ویروس‌ها (بنا به نوع ویروس غالب در هر موج) را تجربه کرده است. ویروس‌های ایجادکننده شیوع

سال ۲۰۰۶ در ایران متعلق به کلد ۲، ۲ بودند (۷). سال‌های ۲۰۱۱ و ۲۰۱۵ توسط سویه‌های زیرگروه C ۴،۳،۲،۱ جایگزین شدند (۸، ۹). شناسایی ویروس‌های HPAI H5 در سه مرحله‌ی مذکور در این منطقه گویای این مطلب است که شمال ایران می‌تواند به‌عنوان دروازه‌ی ورودی این ویروس‌ها به کشور مطرح باشد. در سال ۲۰۱۶ گزارش تلفات در یک مرغداری تخم‌گذار شهرستان ملارد استان تهران بر اثر HPAI H5N8 دریافت شد و همزمان طغیان دیگری از ویروس‌های HPAI H5N8 کلد b ۴، ۴، ۳، ۲ در تالاب میقان شهرستان اراک استان مرکزی گزارش شد که باعث تلفات غازهای وحشی شد. و همچنین به دنبال آن در سال ۲۰۱۶ مواردی از مشاهده این ویروس در استان‌های قم، کرمانشاه، آذربایجان شرقی، قزوین، گیلان، مازندران و گلستان گزارش شده است (۱۰). کلد ۲،۳،۴ که یکی از ژنوتیپ‌های اصلی در آسیا است همچنان به‌عنوان تحت کلد تغییر و تحول می‌یابد و منجر به تولید کلدهای ۲،۳،۴،۱ و ۲،۳،۴،۲ و ۲،۳،۴،۳ و ۲،۳،۴،۴ می‌شود (۲۲). علاوه بر این، کلد ۲،۳،۴ در ساب‌تایپ‌های مختلف NA (Neuraminidase) مانند

کنند (۲۶). یک مطالعه در مورد تغییر و تحول ژن‌های هم‌گلوپتینین و نورآمینیداز در استان Quebec کانادا طی سه فصل آنفلوآنزا (۲۰۰۰-۱۹۹۷) نشان داد که جایگزینی اسیدهای آمینه در (۱-۴۵/۰ درصد) NA با سرعت کمتری نسبت به (۲-۱ درصد) HA رخ می‌دهد (۲۷). Sandbulte و همکاران نشان دادند که دریافت آنتی‌ژنیک در NA کندتر و متفاوت از دریافت آنتی‌ژنیک HA در میان ویروس‌های واکسن آنفلوآنزای فصلی H1N1 و H3N2 است (۲۸). یک مطالعه در مورد سکانس‌های کامل ژنوم ویروس‌های آنفلوآنزای (H3N2) A که بین سال‌های ۱۹۶۸ تا ۲۰۱۱ در گردش بودند ثابت کرده است که تعویض اسید آمینه در زیرواحد HA1 با حداکثر میزان ۳-۱۰ × ۱۴/۹ سایت / سال در مقایسه با ۳-۱۰ × ۹/۱ سایت / سال میزان جایگزینی در NA رخ داده است (۲۹).

محل شکست (Fusion Peptide) دارای بیش از دو اسید آمینه بازی (Polybasic) مشخصه سویه‌های فوق حاد، در ژن HA ویروس شناسایی شده ما چنین موتیفی داشت (PLREKRRKR/GLF) اما با ایزوله‌های فوق حاد سال‌های قبل ایرانی ۲۰۱۵ و ۲۰۱۱ (PQRERRRK-R/GLF) (۸، ۹) و ۲۰۰۶ (PQGERRRKKR G) (۷) متفاوت بود. پیش از این در طیور از جمله مرغابی، مرغ، قرقاول، حواصیل، غاز و بلدرچین میزبان ویروس‌های حاوی موتیف RERRR-KR نشان داده شده است، اما اثر حذف یک رزیدو در موتیف پلی‌بازیک بر روی محدوده میزبان ناشناخته است (۳۰، ۳۱). همچنین این نتایج با یافته‌های هیستوپاتولوژیک و مشاهده ضایعات گسترده به‌ویژه در اندام‌های حیاتی مانند مغز و قلب پرندگان مرده که ویروس‌ها از آنها شناسایی شد مطابقت داشت. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ گزارش شد که ویروس‌های کلد ۱،۱ و

H5N2، H5N5 و H5N8 ظاهر می‌شود (۲۳). مطالعه فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که ویروس‌های جدید HPAI H5N8 ممکن است در چین منشأ گرفته و در نتیجه انتشار جغرافیایی جهانی ویروس از طریق مهاجرت پرندگان وحشی به سمت غرب گسترش یافته باشند (۲۴). آزمایش نمونه‌های جمع‌آوری شده در اواخر ماه می و اوایل ژوئن ۲۰۱۶ طی یک بررسی برای ویروس‌های بیماری آنفلوآنزای طیور و نیوکاسل در Ubsu-Nur، در مرز بین مغولستان غربی و جمهوری Tyva در روسیه، منجر به شناسایی ویروس HPAI H5N8 متعلق به کلد ۲،۳،۴،۴ شد (۲۵). طبق یافته‌های فیلوژنتیک ویروس‌های وارد شده به ایران در سال ۲۰۱۶ در کلد ۲،۳،۴،۴ گروه b قرار گرفتند محل ورود اولیه ویروس A/goose/Iran-Meighan /180/2016 تالاب میقان استان مرکزی بوده است و شباهت ژن HA ویروس مد نظر ما با ایزوله‌های A/gadwall/Kurgan/2442/2016 و A/goose/Kalmykia/813/2016 و A/chicken/Astrakhan/3131/2016 روسیه نشان می‌دهد که این ویروس‌ها توسط پرندگان مهاجر از مسیر هوایی شرق آسیا به سمت آفریقا، در مسیر احتمالاً وارد کشور شده‌اند (شکل ۱). جالب است که از سال ۲۰۱۶، بیشتر ویروس‌های آنفلوآنزای مرغی H5 که در کشور کشف شده است دیگر با N1 همراه نیست (۱۰) توضیح علمی این است که H5 و N1 به‌طور مساوی جهش نکرده‌اند و هم‌گلوپتینین‌های جدید H5 نمی‌توانند تعادل عملکردی با نورآمینیداز N1 داشته باشند، بنابراین، ساب‌تایپ‌های تازه ظهور یافته مانند H5N6 و H5N8 به واریانت‌های غالب تبدیل شده‌اند. تغییرات در پروتئین‌های غشایی HA و NA باعث می‌شود که سویه‌های واکسن به‌طور مداوم به روز شوند و چالش‌هایی برای طراحی واکسن‌های مؤثر ایجاد

۲،۳،۲،۱ و ۲،۳،۴ و ۲،۳،۴،۴، و ۲،۳،۴،۴ الگوهای واکنش متفاوتی به پنل آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (Monoclonal Antibodies) داشتند و آنتی‌ژنیسیته ویروس‌های کلد ۲،۳،۴،۴ مشابه بوده اما با کلد‌های دیگر به‌ویژه، آنتی‌ژنیسیته ویروس‌های کلد ۲،۳،۴،۴ با ویروس‌های کلد ۲،۳،۴ و ۲،۳،۲،۱ متفاوت بود، که نشان می‌دهد H5HPAIV اخیر از نظر تفاوت آنتی‌ژنیکی تغییر و تحول یافته‌اند. علاوه بر این، واکنش آنتی‌سرم نشان داد که آنتی‌ژنیسیته ویروس‌های کلد ۲،۳،۴،۴ اندکی بین گروه‌های A، B و C تفاوت داشت (16). مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷ در مورد نقشه‌برداری اپی‌توپ مولکول HA یک ویروس آنفلوآنزا فوق حاد H5N1 با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تغییرات آمینو اسید سه گروه آنتی‌بادی مونوکلونال را نشان داد چهار آنتی‌بادی مونوکلونال با مجموعه اپی‌توپ مطابق با محل آنتی‌ژنیک H3 B و محل H1 Sa، دو آنتی‌بادی مونوکلونال با مجموعه اپی‌توپ مطابق با محل آنتی‌ژنیک H3 A و دو آنتی‌بادی مونوکلونال با دو محل آنتی‌ژنیک کاملاً متمایز واکنش نشان دادند (۱۷). همچنین مطالعه دیگری بر روی ساختار محل‌های آنتی‌ژنیک در مولکول هم‌گلوتینین ویروس آنفلوآنزای مرغی H5 و تنوع فنوتیپی موتانت‌های فراری انجام گرفت، تعیین توالی نشان داد که تغییرات آمینو اسید به دو محل آنتی‌ژنیک تقسیم شدند. همچنین مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۲ بر روی ساختار محل‌های آنتی‌ژنیک در مولکول هم‌گلوتینین ویروس آنفلوآنزای مرغی H5 و تنوع فنوتیپی موتانت‌های فراری انجام گرفت، تعیین توالی نشان داد که تغییرات آمینو اسید به دو محل آنتی‌ژنیک تقسیم شدند، یکی با محل A در H3 HA مطابقت داشت و دیگری شامل مناطقی بود که در توالی اسیدهای آمینه از هم جدا شده‌اند اما از نظر توپوگرافی در ساختار سه بعدی نزدیک هستند و تا حدی در واکنش با mAbs همپوشانی داشتند. این

سایت تا حدی با سایت B در ساختار H3 مطابقت داشت. همچنین شامل منطقه ای بود که در محل B دخیل نبوده و تا حدی با محل Sa در HA H1 و یک منطقه آنتی‌ژنی در HA H2 هم‌پوشانی داشت (۱۸). بنا به استناد مطالعات انجام شده توالی محل‌های آنتی‌ژنیک ژن HA در جدول ۱ نشان داده شده است. در مطالعه مروری که در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت، گزارش شده است که اگرچه توالی بخش‌های 190-helix loop و 130-loop و 220-loop قسمت کناره و رزیوهای محافظت شده 98-Tyr، 183-His، 153-Trp و 195-Tyr قسمت مرکز در محل‌های اتصال به گیرنده در رأس دیستال غشاء هر مونوم در بین ساب‌تایپ‌ها و میزبان‌های مختلف، متفاوت است اما ساختار هر یک از این سه قسمت مشابه هستند (۱۵) بنا به استناد مطالعات انجام شده توالی محل‌های اتصال به گیرنده ژن HA در جدول ۲ نشان داده شده است طبق گزارشات برخی جهش‌ها مانند Q222L، T156A G224S در ژن HA که امکان اتصال ویروس به گیرنده‌های اسیدسیالیک مربوط به انسان SA-a-2,6، Gal را افزایش می‌دهند (۳۹-۳۲). ویروس وارد شده به ایران در سال ۲۰۱۱ دارای جهش D94N (۸) و ویروس وارد شده ۲۰۱۵ دارای جهش‌های S133A و T156A بودند (۹) بررسی ما نشان داد که ویروس شامل سه جهش S133A، S123P و T156A که باعث تغییر میل اتصال HA به گیرنده‌های پستانداران می‌شود بوده، ترجیحاً به اسیدسیالیک متصل به 2,3- $\alpha$  متصل شده و جزء ویروس‌های آنفلوآنزای طیور می‌باشد.

کرد و همکاران شش محل گلیکوزیله با موتیف N-X-T/S (۸) و یگانی و همکاران هفت محل گلیکوزیله در موقعیت‌های ۳۰۲، ۱۸۱، ۱۵۶، ۳۹، ۲۶ و ۵۵۸ در ژن HA گزارش کردند (۹). ویروس شناسایی شده ما دارای هفت



شده با کاهش میل اتصال گیرنده HA جبران می‌شود که پروتئین HA ما در این موقعیت دارای گلیکوزیلاسیون نبود.

در نتیجه بررسی فیلوژنیک نشان داد ویروس A/goose/Iran-meighan/180/2016 جزو کلد b ۲،۳،۴،۴ H5N8 بوده و این ویروس توسط پرندگان مهاجر از مسیر هوایی شرق آسیا به سمت آفریقا، در مسیر احتمالاً وارد کشور شده‌اند. بررسی جهش‌ها نشان می‌دهد که این ویروس‌ها هنوز هم میزبان طیور را ترجیح داده و احتمالاً تا حدی در برابر داروهای ضد ویروسی مقاوم هستند. نظارت مستمر هم در طیور و هم در پرندگان وحشی به ویژه در شمال ایران برای جلوگیری از شیوع بیشتر لازم است. علاوه بر این، بررسی الگوهای موجود که قبل از وقوع آنها در ایران قابل پیش‌بینی است، پیشنهاد می‌شود.

محل glycosylation در موقعیت‌های ۲۷، ۳۹، ۱۸۱، ۲۰۹، ۳۰۲ (HA1) و همچنین ۴۹۹ و ۵۵۸ (HA2) بود. مشخص شده است که کربوهیدرات اضافی می‌تواند اثرات مثبت و منفی بر روی ویروس داشته باشد (۴۰). وابستگی متقابل بین گلیکوزیلاسیون HA و طول ساقه NA وجود دارد (۴۱) یک ویروس دارای HA با کربوهیدرات کم می‌تواند محکم به گیرنده‌ای که برای انتشار ذرات نیاز به فعالیت NA بیشتر دارد، متصل شود. متقابلاً، HA با گلیکوزیلاسیون گسترده تر، به‌طور ضعیف با گیرنده‌ها اثر متقابل دارد و به فعالیت NA کمتری نیاز دارد. مطالعات قبلی نشان داده است که ویروس‌های آنفلوآنزا H5N1 با حذف ۲۰ اسید آمینه در منطقه ساقه دارای گلیکوزیلاسیون در ۱۷۰aa یا ۱۶۹aa هستند که میل اتصال HA را برای اسیدهای سیالیک کاهش می‌دهد (۴۲). بنابراین، کمبود فعالیت NA اعطا شده توسط ساقه پروتئین کوتاه

## References

- 1- Xu X, Subbarao K, Cox NJ, Guo Y. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology*. 1999; 261(1): 15-9.
- 2- Cattoli G, Fusaro A, Monne I, Capua I. H5N1 virus evolution in Europe—an updated overview. *Viruses*. 2009; 1(3): 1351-63.
- 3- Zhao K, Gu M, Zhong L, Duan Z, Zhang Y, Zhu Y, et al. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Veterinary microbiology*. 2013; 163(3-4): 351-7.
- 4- Li J, Gu M, Liu D, Liu B, Jiang K, Zhong L, et al. Phylogenetic and biological characterization of three K1203 (H5N8)-like avian influenza A virus reassortants in China in 2014. *Archives of virology*. 2016; 161(2): 289-302.
- 5- Wu H, Peng X, Xu L, Jin C, Cheng L, Lu X, et al. Novel reassortant influenza A (H5N8) viruses in domestic ducks, eastern China. *Emerging infectious diseases*. 2014; 20(8): 1315.
- 6- Lee EK, Lee YN, Song BM, Heo GB, Lee HS, Lee YJ. Pathogenesis of Multiple Subgroups of Clade 2.3. 4.4. *Influenza A (H5N8) Virus in Mice and Ferrets*. 2016: 274-5.
- 7- Vascellari M, Hablolvarid M, Shoushtari A, Hedayati A. Mortality of wild swans associated with naturally infection with highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in Iran. *Archives of Razi Institute*. 2007; 62(4): 207-13.
- 8- Kord E, Kaffashi A, Ghadakchi H, Eshratbadi F, Bameri Z, Shoushtari A. Molecular characterization of the surface glycoprotein genes of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses detected in Iran in 2011. *Tropical animal health and production*. 2014; 46(3): 549-54.
- 9- Yegani S, Shoushtari A-H, Eshratbadi F, Molouki A. Full sequence analysis of hemagglutinin and neuraminidase genes and proteins of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus detected in Iran, 2015. *Tropical animal health and production*. 2019; 51(3): 605-12.
- 10- OIE. World Organisation for Animal

**Health, 2018.** OIE Situation Report for Avian Influenza. 2018

**11- Qi X, Li X, Rider P, Fan W, Gu H, Xu L, et al.** Molecular characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from raccoon dogs in China. *PloS one*. 2009; 4(3): e4682.

**12- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster R, Perez D.** Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*. 2001; 146(2275): 89.

**13- Stear MJ.** OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) 5th Edn. Volumes 1 & 2. World Organization for Animal Health 2004. ISBN 92 9044 622 6. € 140. *Parasitology*. 2005;130(6): 727.

**14- Gupta R, Brunak S, editors.** Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput*. 2001.

**15- de Graaf M, Fouchier RA.** Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *The EMBO journal*. 2014; 33(8): 823-41.

**16- Ohkawara A, Okamoto M, Ozawa M, Chu DH, Nguyen LT, Hiono T, et al.** Antigenic diversity of H5 highly pathogenic avian influenza viruses of clade 2.3. 4.4 isolated in Asia. *Microbiology and immunology*. 2017; 61(5): 149-58.

**17- Kaverin NV, Rudneva IA, Govorkova EA, Timofeeva TA, Shilov AA, Kochergin-Nikitsky KS, et al.** Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of a highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies. *Journal of virology*. 2007; 81(23): 12911-7.

**18- Kaverin NV, Rudneva IA, Ilyushina NA, Varich NL, Lipatov AS, Smirnov YA, et al.** Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *Journal of General Virology*. 2002; 83(10): 2497-505.

**19- Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC.** H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes. *Embo j*. 2002; 21(5): 865-75.

**20- Reynolds CR, Islam SA, Sternberg MJ.** EzMol: a web server wizard for the rapid visualization and image production of protein and nucleic acid structures. *Journal of molecular biology*. 2018; 430(15): 2244-8.

**21- Sonnberg S, Webby RJ, Webster RG.** Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1. *Virus research*. 2013; 178(1): 63-77.

**22- WHO/OIE/FAO.** Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): Updated nomenclature. Influenza and Other Respiratory Viruses 6,1-5. H5N1 Evolution Working Group (2012)

**23- Smith GJ, Donis RO.** Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013-2014. *Influenza Other Respir Viruses*. 2015; 9(5): 271-6.

**24- Lee D-H, Torchetti MK, Winker K, Ip HS, Song C-S, Swayne DE.** Intercontinental spread of Asian-origin H5N8 to North America through Beringia by migratory birds. *Journal of virology*. 2015; 89(12): 6521-4.

**25- FAO.** Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations 2016. H5N8 highly pathogenic avian influenza (HPAI) of clade 2.3.4.4 detected through surveillance of wild migratory birds in the Tyva Republic, the Russian Federation – potential for international spread 2016. Rome: FAO. pdf. Accessed 11 Nov 2016 2016.

**26- Shil P, Chavan SS, Cherian SS.** Antigenic variability in Neuraminidase protein of Influenza A/H3N2 vaccine strains (1968–2009). *Bioinformatics*. 2011; 7(2): 76.

**27- Abed Y, Hardy I, Li Y, Boivin G.** Divergent evolution of hemagglutinin and neuraminidase genes in recent influenza A: H3N2 viruses isolated in Canada. *Journal of medical virology*. 2002; 67(4): 589-95.

**28- Sandbulte MR, Westgeest KB, Gao J, Xu X, Klimov AI, Russell CA, et al.** Discordant antigenic drift of neuraminidase and hemagglutinin in H1N1 and H3N2 influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(51): 20748-53.

**29- Westgeest KB, Russell CA, Lin X, Spronken MI, Bestebroer TM, Bahl J, et al.** Genomewide analysis of reassortment and evolution of human influenza A (H3N2) viruses circulating between 1968 and 2011. *Journal of virology*. 2014; 88(5): 2844-57.

**30- Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R.** The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *Journal of virology*. 1999; 73(2): 1146-

55.

**31- Li K, Guan Y, Wang J, Smith G, Xu K, Duan L, et al.** Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 2004; 430(6996): 209-13.

**32- Su Y, Yang H-Y, Zhang B-J, Jia H-L, Tien P.** Analysis of a point mutation in H5N1 avian influenza virus hemagglutinin in relation to virus entry into live mammalian cells. *Archives of virology*. 2008; 153(12): 2253-61.

**33- Burke DF, Smith DJ.** A recommended numbering scheme for influenza A HA subtypes. *PLoS one*. 2014; 9(11): e112302.

**34- Gohrbandt S, Veits J, Hundt J, Bogs J, Breithaupt A, Teifke JP, et al.** Amino acids adjacent to the haemagglutinin cleavage site are relevant for virulence of avian influenza viruses of subtype H5. *Journal of General Virology*. 2011; 92(1): 51-9.

**35- Ibrahim E, Sirawan A, El-Bazzal B, El Hage J, Abi Said M, Zaraket H, et al.** Complete genome sequence of the first H5N1 avian influenza virus isolated from chickens in Lebanon in 2016. *Genome announcements*. 2016;4(5):e01062-16.

**36- Linster M, van Boheemen S, de Graaf M, Schrauwen EJ, Lexmond P, Mänz B, et al.** Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell*. 2014; 157(2): 329-39.

**37- Lee C-W, Suarez DL, Tumpey TM, Sung**

**H-W, Kwon Y-K, Lee Y-J, et al.** Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea. *Journal of virology*. 2005; 79(6): 3692-702.

**38- Yang H, Carney PJ, Mishin VP, Guo Z, Chang JC, Wentworth DE, et al.** Molecular characterizations of surface proteins hemagglutinin and neuraminidase from recent H5Nx avian influenza viruses. *Journal of virology*. 2016; 90(12): 5770-84.

**39- Nguyen HT, Nguyen T, Mishin VP, Sleeman K, Balish A, Jones J, et al.** Antiviral susceptibility of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses isolated from poultry, Vietnam, 2009–2011. *Emerging infectious diseases*. 2013; 19(12): 1963.

**40- Vigerust DJ, Shepherd VL.** Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends in microbiology*. 2007; 15(5): 211-8.

**41- Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk H-D.** Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *Journal of virology*. 2000; 74(14): 6316-23.

**42- Zhou H, Yu Z, Hu Y, Tu J, Zou W, Peng Y, et al.** The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. *PLoS one*. 2009; 4(7): e6277.

## Meighan Wetland of Markazi Province, Entrance Center of Avian Influenza Highly pathogenic virus H5, Iran, 2016

Minoo Motahhar<sup>1</sup>, Hadi Keyvanfar<sup>2\*</sup>, Abdolhamid Shoushtari<sup>3</sup>, Mohammad Hossein Fallah Mehrabadi<sup>3</sup>, Gholamreza Nikbakht Brujeni<sup>4</sup>

1- PhD Student in Virology, Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Professor, Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Avian Diseases Research and Diagnostics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

4- Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Receive: July 13, 2022; Revise: July 18, 2022; Accept: July 19, 2022

### Summary

During the past two decades, the highly pathogenic avian influenza H5N1 virus has received considerable attention due to its zoonotic and mutative features. Purpose of the leading study is molecular and phylogenetic characteristics of hemagglutinin (HA) gene of H5N8 strain identified in Meighan wetland of Arak city, Markazi province were investigated. For this purpose, samples were inoculated with embryonic eggs of 14-10 days and after extraction of allantoic fluid and RNA extraction and PCR and sequencing of genes, phylogenetic trees were drawn by Mega7 program and molecular properties including Cleavage site, Glycosylation site, Antigenic site, Receptor Binding site and HA gene-related mutations were investigated. Based on the analysis of the amino acid sequence of the HA genes, the cleavage site of the gene includes the PLREKRRKR / GLF polybasic amino acid motif, which is a characteristic of highly pathogenic influenza viruses. The HA gene of two viruses had T156A, S123P, S133A mutations associated with the increased mammalian sialic acid binding. Phylogenetic analysis of the HA gene of the virus studied in this study indicated the classification of this virus in the 2.3.4.4 b Clade. It seems that the introduction of these H5N8 HPAI strains in Iran probably occurred through the West Asia-East African flyway by wild migratory aquatic birds.

**Key words:** Avian influenza, Highly pathogenic, Iran