مطالعه فیلوژنتیکی اولین شیوع تحت‌تیپ H۵N۸ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در مرغداری گوشتی در استان خراسان جنوبی، ۲۰۲۰-۲۰۲۱

زهرا ضیافتی کافی[۱]، سروش سرمدی[۱]، محمد حسین فلاح مهرآبادی[۲]، محمد عبدالشاه[۲]، محسن محموزاده اخیجهانی[۲]، فهیمه جمیری[۱]، علیرضا بخشی[۱]، حسین حسینی[۳]، امید اقبالی[۱]، نازنین سرویان[۱]، آرش قلیانچی لنگرودی[۱*]

۱- گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، البرز، ایران

۳- گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد کرج، البرز، ایران

نویسنده مسئول:

آرش قلیانچی لنگرودی

گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تلفن:۰۲۱۶۱۱۱۷۱۵۴

ایمیل:arashghalyanchi@gmail.com

چکیده

شیوع تحت‌تیپ H۵ ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان علاوه بر وارد آوردن خسارات اقتصادی بر بدنه‌ی صنعت طیور، از نظر بهداشت عمومی نیز یک تهدید بزرگ محسوب می‌گردد. رخداد آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان علاوه‌بر این‌که می‌تواند سبب بروز تلفات بالایی دربین جمعیت پرندگان شود، به‌دلیل توانایی انتقال به انسان و بیماری‌زایی می‌تواند بهداشت عمومی را نیز درخطرقرار دهد. به همین سبب مطالعه‌ی شیوع و چرخش این بیماری در کشور از اهمیت بالایی برخوردار است. در مطالعه‌ی حاضر، در سال ۲۰۲۱، نمونه‌های نای از ۵۰ جوجه‌ی تلف شده در یک مرغداری گوشتی در استان خراسان جنوبی در شهر بیرجند، جمع آوری شد. نمونه‌های

جمع‌آوری شده در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان شروع آزمایش در دمای 20°C- نگهداری شدند و سپس با استفاده از روش RT-PCR از نظر آلودگی با تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان، مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آزمون RT-PCR حضور ژنوم این تحت‌تیپ از ویروس را در نمونه‌های جمع‌آوری شده تایید کرد. بر اساس نتایج آنالیز فیلوژنی این مطالعه که با استفاده از نرم افزار MMEGA ۷ و توالی‌های پیشین ثبت شده در بانک ژنی (NCBI GenBank) ، ویروس H۵N۸ جداشده در این مطالعه، دارای بیش‌ترین شباهت در نوکلئوتید (۹۹/۲٪) به ویروس H۵N۸ (۲۰۱۹)/A/DUCK/EGYPT/SMG۴) جدا شده در کشور مصر در سال ۲۰۱۹ و همچنین ۹۱/۰۸٪ شباهت با ویروس (A/Crow/Aghakhan/۲۰۱۷H۵N۸)، جداسازی شده از کشور ایران در سال ۲۰۱۷ می‌باشد. نتایج این مطالعه با تایید حضور این ویروس در ایران، بر ضرورت پایش مداوم برای مدیریت خطرات اقتصادی و بهداشتی تاکید می‌کند.(A/Crow/Aghakhan/۲۰۱۷H۵N۸)

کلمات کلیدی: آنفولانزای H۵N۸ ، رده‌ی ۴/۴/۳/۲، صنعت طیور، آنفولانزای فوق‌حاد پرندگان

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان یک بیماری عفونی حاد در ماکیان، پرندگان آبزی، پرندگان وحشی و حیوانات بوده که می‌تواند به انسان نیز منتقل شوند. این ویروس‌ها که در خانواده‌ی اورتومیکسوویریده قرار دارند (*Orthomyxoviridae*) از نظر ژنتیکی دارای RNAی قطعه قطعه مفهوم منفی (Negative sense) می‌باشند (۱). ویروس آنفلوانزای پرندگان در سطح خود دارای دو گلیکوپروتئین حیاتی هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) بوده که برپایه‌ی ویژگی‌های این گلیکوپروتئین‌ها، ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان به ۱۶ تحت‌تیپ برای پروتئین هماگلوتینین و ۹ تحت‌تیپ برای پروتئین نورآمینیداز تقسیم‌بندی می‌گردند (۲). علاوه‌بر این تحت‌تیپ‌ها، دو تحت‌تیپ H۱۷N۱۰ و H۱۸N۱۱ نیز وجود دارند با این تفاوت که تاکنون تنها در خفاش یافت شده‌اند (۳). پروتئین هماگلوتینین نقش مهمی در بیماریزایی، تعیین طیف میزبان‌ها و همچنین خواص آنتی‌ژنی ویروس داشته و توالی ژنتیکی آن تعیین‌کننده‌ی فوق‌حاد و یا تحت‌حاد بودن ویروس آنفلوانزای پرندگان می‌باشد (۱, ۲).

ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان بر اساس میزان بیماری‌زایی آن‌ها در ماکیان نیز طبقه‌بندی می‌شوند. بر این اساس بیش‌تر تحت‌تیپ-های H۱-H۱۶ این ویروس سبب بروز علائم خفیف بیماری تنفسی، گوارشی و تولیدمثلی می‌شوند که تحت عنوان آنفلوانزای پرندگان تحت‌حاد شناخته شده، درحالی که برخی از تحت‌تیپ‌های H۵ و H۷ سبب بروز یک بیماری کشنده‌ی سیستمیک می‌شوند و تحت عنوان آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان نام‌گذاری می‌گردند (۴). یکی از علل ظهور انواع فوق‌حاد ویروس آنفلوانزای پرندگان، رخداد جهش‌هایی است که سبب الحاق و یا جا به جایی آمینواسیدهای بازی در جایگاه برش پروتئین هماگلوتینین می‌شود، اگرچه علاوه‌بر این پروتئین، پروتئین‌های دیگر ویروس همانند مجموعه پلیمرازی ویروس و نوکلئوپروتئین آن می‌توانند در بیماری‌زایی نقش داشته باشند (۵). ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان فوق‌حاد سبب وارد آمدن خسارات اقتصادی قابل توجه به صنعت جهانی طیور شده و همچنین به یک خطر عمده برای بهداشت عمومی در دنیا تبدیل شده‌است (۶). بررسی میزان شیوع و همچنین وضعیت اپیدمیولوژیک آن‌ها در کشور و همچنین بررسی میزان کارآمدی واکسن‌های موجود علیه تحت‌تیپ‌های در گردش در پیشگیری از شیوع‌های آتی و همچنین به‌روز رسانی و توسعه واکسن‌های جدیدتر اهمیت فراوانی دارد.

تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس‌های آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان، اولین بار در سال ۲۰۱۰ در پرندگان بازار زنده‌فروشی در کشور چین شناسایی شدند. این ویروس‌ها در برگیرنده‌ی ژن‌هایی هستند که از ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد تحت‌تیپ NH۵، مشتق شده‌اند (۷). در سال ۲۰۱۴ تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان فوق‌حاد از دودمان GsGd و کلاد ۴/۴/۳/۲ در پرندگان صنعتی و وحشی در قاره‌های مختلف شیوع یافتند. در اوایل سال ۲۰۱۴ این ویروس در کشورهای ژاپن و کره شناسایی شد و از اوخر همین سال ویروس به سایر نقاط دنیا از جمله اروپا، آمریکای شمالی، روسیه و تایوان گسترش یافت (۸). از پاییز سال ۲۰۱۶ ویروس دیگری از همین کلاد شروع به گسترش بین قاره‌ای کرد و از آن زمان شیوع پایداری در اروپا، آفریقا و خاورمیانه دارد (۹). در سال ۲۰۲۱، **Li** و همکاران اهمیت پرندگان وحشی و مهاجر را در اپیدمیولوژی و گسترش H۵N۸ . در این مطالعه، نشان داده‌شد که قو احتمالا مسئول ورود تحت رده b۲ ویروس H۵N۸ به کشور چین بوده‌است و ممکن است از پرندگان در روسیه منشاء گرفته‌باشد. همچنین این مطالعه نشان داد که قو می‌تواند به‌عنوان پرنده‌ی شاخصی در انتشار فرامرزی و همچنین پایش ویروس H۵N۸ در نظر گرفته‌شود (۹).

اگرچه هردو تحت‌تیپ H5N1 و H5N8 از انواع فوق‌حاد ویروس آنفلوانزای پرندگان شناخته می‌شوند اما ممکن است دربیماری‌زایی و عفونت‌زایی آن‌ها تفاوت‌هایی مشاهده شود، برای مثال بر اساس مطالعه‌ای که توسط **Takadate** و همکاران انجام شد، به‌نظر می‌رسدکه تحت‌تیپ H5N8 نسبت به H5N1 عفونت‌زایی و انتقال بیش‌تری در بین جوجه‌ها دارد (۱۰) در ایران تحت‌تیپ H5N1 ویروس آنفلوانزا در سال ۲۰۰۶ در لاشه‌ی قویی وحشی شناسایی و تایید شد. همچنین در سال ۲۰۱۶، تحت‌تیپ H5N8 در گله‌های تخم‌گذار تجاری در استان تهران شناسایی شد (۱۱). در سال ۲۰۱۷ در ایران، این تحت‌تیپ از ویروس آنفلوانزای پرندگان فوق‌حاد، برای اولین بار از کلاغ ابلق در استان اصفهان جداسازی شد (۱۱).

ایران به دلیل جغرافیای خاص خود، می‌تواند به‌عنوان کانونی مهم برای بیماری آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در نظر گرفته‌شود، اما اطلاعات اندکی در مورد مشخصه‌های ژنتیکی ویروس‌های در گردش، در دسترس می‌باشد (۱۲). با توجه به اهمیت صنعت پرورش طیور در کشور و همچنین ورود و مهاجرت پرندگان وحشی که می‌توانند سبب ورود انواع سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزای پرندگان به کشور شود، مطالعه و پایش ویروس آنفلوانزای پرندگان در کشور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی مولکولی ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان جدا شده به دنبال شیوع این بیماری در یک مرغداری گوشتی در استان خراسان درکشور ایران و همچنین بررسی فیلوژنی این ویروس می‌باشد.

مواد و روش‌کار

جمع آوری نمونه

به‌دنبال شیوع بیماری با علائم آنفلوانزای فوق‌حاد در یک مرغداری پرورش‌دهنده مرغ‌گوشتی در شهر بیرجند در استان خراسان‌جنوبی در سال ۲۰۲۱، و تلف شدن ۵۰ قطعه جوجه، نمونه‌های نای از جوجه‌های تلف شده تهیه و با رعایت دستورالعمل‌های ایمنی زیستی برای انتقال نمونه، نمونه‌ها به دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال شدند و تا شروع مراحل مطالعه در فریزر ۷۰°C- نگهداری شدند.

استخراج RNA و RT-PCR

نمونه‌های نای در ۵ دسته‌ی ۱۰تایی با استفاده از تیغ اسکالپل در PBS X1 خُرد و هموژن شدند. سپس مقدار ۲۰۰µl از نمونه‌ی هموژن شده برداشته‌شد و RNAی تام آن‌ها با استفاده از کیت استخراج CinaPure ™ONE KIT ساخت شرکت سیناژن (ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شده و در ۴۵µl از Elution buffer موجود در کیت، رهاسازی شد. RNAی استخراج‌شده تا زمان انجام RT-PCR در فریزر ۷۰°C- نگهداری شدند.

برای انجام فرایند RT-PCR، در ابتدا ساخت DNAی مکمل با استفاده از کیت ساخت cDNAی شرکت Frementas کشور کانادا بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، انجام شد. شناسایی ژنوم ویروس H5 با استفاده از کیت Qiagen بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از پرایمرهای تعریف‌شده توسط **Slomka** و همکاران انجام شد (۱۳). واکنش PCR در حجم ۲۵µl انجام شده که شامل ۱۲/۵ µl مسترمیکس آماده‌ی مصرف، ۱µl از هرکدام از پرایمرها، ۸µl آب مقطر استریل و۲/۵ µl از cDNAی ساخته‌شده، می‌باشد. برای انجام واکنش PCR در مرحله‌ی اول جهت جداسازی اولیه ابتدا دمای ۹۵°cبه‌مدت ۳ دقیقه اعمال شد. سپس واکنش

در ۳۵ چرخه شامل جداسازی در دمای ۹۵°c به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۲°c به‌مدت ۳۰ثانیه و گسترش در دمای ۶۸°c به‌مدت ۳۰ثانیه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۶۸°c به‌مدت ۱۰ دقیقه ادامه یافت. پس از انجام واکنش PCR، فراورده‌های این واکنش در ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند.

توالی یابی و آنالیز فیلوژنی

پس از خالص‌سازی مجصولات PCR با استفاده از کیت AccuPrep PCR (کمپانی Bioneer، کره) یک نمونه‌ی مثبت جهت توالی‌یابی با استفاده از روش سنگر به شرکت Bioneer کشور کره ارسال شد. خوانش توالی به‌صورت دو طرفه با استفاده از پرایمرهای (Forward and Reverse) و با استفاده از دستگاه آنالیزور ژنتیک ABI۳۱۰۰ شرکت آمریکایی Applied Biosystems انجام شد. تایید نتایج خوانش با استفاده از ابزار BLAST انجام شد.

برای رسم درخت فیلوژنی، توالی‌های مربوط به تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس آنفلوانزا از پایگاه داده‌های NCBI و GISIAD دریافت شد و درخت فیلوژنی با نرم افزار MEGA۷ و با استفاده از روش Neighbor-Joining (۱۴)، با مقدار ۱۰۰۰ Bootstrap به جهت ارزیابی جایگاه قرارگیری توالی‌ها در درخت فیلوژنی، رسم شد. توالی مربوط به این مطالعه با شناسه یکتا MT۲۲۵۰۱۵ در بانک ژنی قابل دسترسی است.

نتایج

آنالیز فیلوژنی نشان‌داد که ویروس آنفولانزای فوق‌حاد پرندگان H۵N۸ استان خراسان‌جنوبی که در این مطالعه جدا شد (A/Chicken/Khorasan/۲۰۲۱H۵N۸) شباهت بالایی به میزان ۹۹/۲۲درصد، با جدایه‌ی H۵N۸ (A/DUCK/EGYPT/SMG۴/(۲۰۱۹) با شناسه‌ی یکتا MN۱۶۵۸۷۶۶ ، دارد (جدول ۱). آنالیز توالی‌ها همچنین نشان‌داد که جدایه‌ی A/Chicken/Khorasan/۲۰۲۱H۵N۸ اگرچه کاملا با مشابه ویروس پیشین جداسازی‌شده در ایران H۵N۸ A/Crow/Aghakhan/۲۰۱۷ نیست اما واجد شباهت بالایی (۹۱/۰۸٪) می‌باشد (جدول ۱). بررسی همولوژی توالی‌ها همچنین نشان داد که جدایه‌ی این مطالعه دارای شباهت بسیار بالایی (۹۸/۰۴٪) با جدایه‌ی A/Duck/Ismalia/۱۷۲۱Fao-SI/ ۲۰۱۷H۵N۸ با کد یکتا MN۰۶۸۸۴۲۲ و شباهت ۹۷/۶۴٪ با جدایه‌های A/Piogeon/Egypt/A۱۵۰۵۲/۲۰۱۸H۵N۸ و (A/Chiken/EGYPT/FML۲/(۲۰۱۸)H۵N۸)، به ترتیب با شناسه‌های یکتای MN۰۳۸۱۸۴ و MN۶۵۸۶۹۲ می‌باشد. همچنین نتایج همولوژی بیانگر شباهت ۹۷/۲۴٪ با ویروس A/swan/China/ST/۲۰۱۶H۵N۸ با شناسه‌ی MK۶۱۶۰۸۵ می‌باشد (جدول ۱). همچنین آنالیز فیلوژنی بیانگر این است که جدایه‌ی این مطالعه در زیرگروه روسیه ۲۰۱۶، رده ۴/۴/۳/۲ در گروه B ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان H۵ (شبیه گوچانگ) قرار می‌گیرد (۱۵).

بحث

انواع مختلفی از تحت‌تیپ‌های ویروس‌آنفلوانزای پرندگان در حال گردش در بین پرندگان وحشی و اهلی است. مسیر پروازی پرندگان وحشی مناطقی از جمله آسیا، سیبری، دریای خزر، خلیج فارس، کشورهای سابق اتحاد جماهیر شوروی، آلاسکا، استرالیا و جزایری

در اقیانوس آرام را در بر می‌گیرد. همچنین در ایران نیز هرسال در فصل پاییز، پرندگان وحشی از روسیه به ایران مهاجرت می‌کنند که این مسئله می‌تواند سبب گسترش ویروس آنفلوانزا در بین جمعیت پرندگان اهلی و وحشی در کشور شود (۶، ۱۱، ۱۶، ۱۷). علاوه‌بر پرندگان مهاجر، پرندگان بومی نیز می‌توانند نقش مهمی در اپیدمیولوژی و انتقال ویرس آفلوانزای فوق‌حاد پرندگان به پرندگان صنعتی و انسان‌ها داشته باشند. همچنین می‌توانند شرایط مناسبی را برای اختلاط ژنتیکی این ویروس‌ها و متعاقباً انتقال آن به سایر گونه‌ها فراهم کنند (۱). نگهداری پرندگان بومی در محیط آزاد و در تماس با پرندگان مهاجر و همچنین وجود بازارهای زنده فروشی که در آن‌ها پرندگان مهاجرِ شکار شده نیز عرضه می‌شوند، از جمله مواردی هستند که سبب افزایش تماس بین پرندگان مهاجر و پرندگان بومی می‌شوند. انتقال ویروس بین پرندگان مهاجر و پرندگان صنعتی به دنبال تماس مستقیم و یا غیرمستقیم، تماس با مواد آلوده و یا توسط کارگران و سایر افرادی که وارد مرغداری می‌شوند صورت بگیرد (۶). به‌دلیل قرار گرفتن ایران در مسیر مهاجرت پرندگان مهاجر، بررسی تحت‌تیپ‌های جدید آنفلوانزای پرندگان که در حال گردش هستند، به‌منظور تعیین یک برنامه نظارتی مناسب برای پیشگیری از شیوع و همه‌گیری این ویروس، امری ضروری است.

در ارتباط با شیوع و گسترش تحت‌تیپ H۵N۸ در مناطق مختلف گزارش‌های متعددی وجود دارد. **Abolnic** و همکاران در سال ۲۰۱۹ گزارش کردند که در سال ۲۰۱۷ در دره‌ی ریفت در دریاچه ویکتوریا، در کشور اوگاندا در بین درناهای بال سفید (*Chlidonias leucopterus*) عفونت با ویروس H۵N۸ از رده ۴/۴/۳/۲ رخ داده. همچنین موارد دیگری از شیوع این ویروس در جوجه‌های مولد تجاری در نزدیکی حراره در زیمبابوه و در جوجه‌های گوشتی واقع در نزدیکی ویلئرز، استان امپولامانگا آفریقای‌جنوبی اتفاق افتاده‌است (۱۸). این ویروس به‌سرعت در آفریقای جنوبی گسترش یافت به نحوی که صنعت پرورش جوجه‌ی تخم‌گذار در استان کیپ (Cape) غربی تقریبا نابود شد (۱۸).

رده‌ی ۴/۴/۳/۲ تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان به‌راحتی می‌تواند از پرندگان آبزی وحشی مهاجر به ماکیان سانان تجاری منتقل شود (۱۹). در طول زمستان ۲۰۱۶-۲۰۱۷، شیوع رده‌ی ۴/۴/۳/۲b از تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در مقیاس بزرگتری از شیوع رده ۴/۴/۳/۲a در زمستان ۲۰۱۴-۲۰۱۵، به‌دنبال مهاجرت پاییزی پرندگان وحشی، تکرار شد. سپس این رده از ویروس به مناطق آفریقای جنوب صحرا (Sub Saharan Africa) گسترش و به‌شکل ویرانگری شیوع یافت (۱۹).

در زمینه‌ی انتقال این ویروس به انسان و خطرات بهداشت عمومی نیز مطالعاتی صورت گرفته‌است. در مطالعه‌ای **Valley-Omar** و همکاران صورت گرفت، انتقال تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس آنفلوانزا به انسان در طی شیوع این ویروس در آفریقای‌جنوبی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۷۴ نمونه از افرادی که سابقه مواجه با پرندگان بالقوه آلوده را داشته و همچنین دارای علائمی همچون سرفه، تب، گلودرد، آب‌ریزش بینی، سختی تنفس و همچنین التهاب ملتحمه داشتند با استفاده از روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت. از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده تقریبا ۳ درصد برای آنفلوانزای فصلی انسانی (H۳N۲) مثبت بودند و هیچکدام از نمونه‌ها برای تحت‌تیپ H۵ مثبت نبودند (۲۰). مطالعه‌ی دیگری توسط **Adloch** و همکاران با هدف درک بهتر رهیافت‌های ملی برای مدیریت تهدیدات بهداشت عمومی در طی شیوع تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در بین ۲۳ کشور عضو اتحادیه‌ی اروپا و فلسطین اشغالی انجام شد. در این مطالعه، ارزیابی مخاطرات ملی در ارتباط با این ویروس در ۱۹ کشور صورت گرفت که بر اساس نتایج این مطالعه، مخاطرات عمومی برای انسان در ۱۸ کشور کم و در یک کشور متوسط بود. در بین نمونه‌های

انسانی بررسی‌شده در این مطالعه، هیچ نمونه‌ی مثبتی از نظر وجود H۵N۸ شناسایی نشد. داروهای ضد ویروسی و واکسیناسیون در کشورهای مختلف متفاوت بود. اگرچه این مطالعه خطرکمی را برای انتقال این تحت‌تیپ به انسان نشان‌داد، اما سطح بالای حفاظت فردی در این مطالعه پیشنهاد شده‌است (۲۱).

مطالعات دیگری نیز برای بررسی اپیدمیولوژی ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در سایر کشورها انجام شده‌است. در کامرون، **Kaum** و همکاران در مطالعه‌ای رخداد آنفلوانزای حاد پرندگان ناشی از دو تحت‌تیپ H۵N۸ و H۵N۱ را نشان دادند. پرندگانی همچون طاووس هندی (Pavo cristatus) ، کبوتر، اردک، مرغ بومی و مرغ هندی با تحت‌تیپ H۵N۸ درگیر شده بودند اما هیچ مورد عفونت انسانی گزارش نشد. اقدامات امنیت زیستی ضعیف در مزارع پرورش و بازارهای فروش پرنده‌ی زنده در کنار جا به جایی فروشندگان مرغ و تخم‌مرغ بین مزارع، بازارها و شهرها بدون رعایت اقدامات محافظتی از عوامل خطر اصلی در انتشار این بیماری به حساب می‌آیند (۲۲). درسال‌های ۲۰۱۴-۲۰۱۵ در ایالات متحده‌ی آمریکا، رده ۴/۴/۳/۲a تحت‌تیپ H۵ ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در بین گله‌های روستایی و صنعتی (مرغ و بوقلمون) شیوع یافت. شیوع تحت‌تیپ‌های H۵N۸ و H۵N۱ سبب مرگ‌ومیر ۱۰۰-۸۰ درصدی در بین میزبانانی همچون ماکیان، بلدرچین ژاپنی، بلدرچین Bobwhite، مرغ هندی (Pearl guinea fowl)، کبک معمولی و قرقاول شد (۲۳).

در الاحساء در شرق عربستان سعودی، در سال ۲۰۱۹، شیوع آنفولانزای فوق‌حاد پرندگان H۵N۸ در ده گله‌ی روستایی توسط **Hemida** و همکاران مورد بررسی قرارگرفت. پرندگانی که از نظر بالینی درگیر شده بوند، شامل مرغ، شترمرغ، اردک، کبوتر و بوقلمون بودند. علائم در پرندگان مبتلا شامل کاهش مصرف غذا و آب، تظاهرات تنفسی و عصبی مانند فلج بال‌ها و پاها، سیانوز شدن تاج و ریش بود و همچنین سرفه، تنفس با دهان باز، اسهال و اکیموز ساق و پا نیز گاهاً مشاهده شد. در بعضی موارد عفونت فوق‌حاد در پرندگان به‌ویژه در جوجه‌ها و بوقلمون‌ها دیده شد. در برخی از بوقلمون‌های مبتلا نیز احتقان و خون‌ریزی در پانکراس و عروق خونی دئودنوم مشاهده شد. بررسی فیلوژنی جدایه‌ی این مطالعه نشان‌داد که این جدایه با ویروس‌های H۵N۷ پیشین در عربستان مرتبط بوده و شباهتی بین ۹۹/۸۷ تا ۹۹/۹۸ درصد را نشان دادند. تجزیه و تحلیل ژن HA جدایه‌ی این مطالعه نشان‌داد که این جدایه در یک خوشه در رده‌ی ۴/۴/۳/۲ و گروه B تحت‌تیپ H۵ قرار می‌گیرد (۲۴). در مصر بین ژانویه ۲۰۱۶ تا دسامبر ۲۰۱۸، به‌منظور بررسی بیماری‌های ویروسی، ۶۱۳۷ نمونه سواپ از کلواک و ۵۰۷۳ نمونه سواپ دهانی حلق از پرندگان در ۳۹ مرغداری تجاری، ۲۲ گله‌ی روستایی، ۲ کشتارگاه و ۲۲ بازار فروش پرندگان زنده در مصر جمع‌آوری شد. در این بین از مجموع ۳۲۹ نمونه بررسی‌شده ۳۷,۱٪ به H۵N۸ ، ۷/۶٪ به H۵N۱ ، ۴۸٪ به H۹N۲ و ۷/۳٪ از نمونه‌ها به‌طور همزمان به ۲ مورد از ۳ تحت‌تیپ ذکرشده آلوده بودند. بر اساس توالی‌یابی ژن HA، ویروس‌های H۵N۸ به زیر رده‌ی ۲/۳/۴/۴ تعلق داشتند. در این مطالعه، شیوع H۵N۸ در اردک‌ها (۲/۴٪) بیش‌تر از مرغ‌ها (۰/۹۴٪) بود (۲۵). (A/Chiken/Kagawa/C۱۱/(۲۰۲۰)

در سال ۲۰۲۰، در استان کاگاوا در غرب ژاپن آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان، به‌دنبال شیوع تحت‌تیپ H۵N۸ این ویروس در یک مزرعه مرغ تخم‌گذار رخ داد. بررسی فیلوژنی ویروس (A/Chiken/Kagawa/C۱۱/(۲۰۲۰)، نشان‌داد که این ویروس متعلق به رده‌ی۲,۳,۴,۴B از دودمان Goose/Guangdong تحت‌تیپ H۵ می‌باشد (۲۶). پس از شیوع تحت‌تیپ H۵N۱ ویروس آنفلوانزای پرندگان در سال‌های ۲۰۰۶، ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶، در سال ۲۰۱۸ تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس آنفلوانزای پرندگان در بین غازهای اهلی بومی که به شیوه‌ی روستایی نگهداری می‌شدند شناسایی شد. آنالیز فیلوژنی دو ژن هماگلوتینین و نورآمینیداز ویروس نشان‌داد که

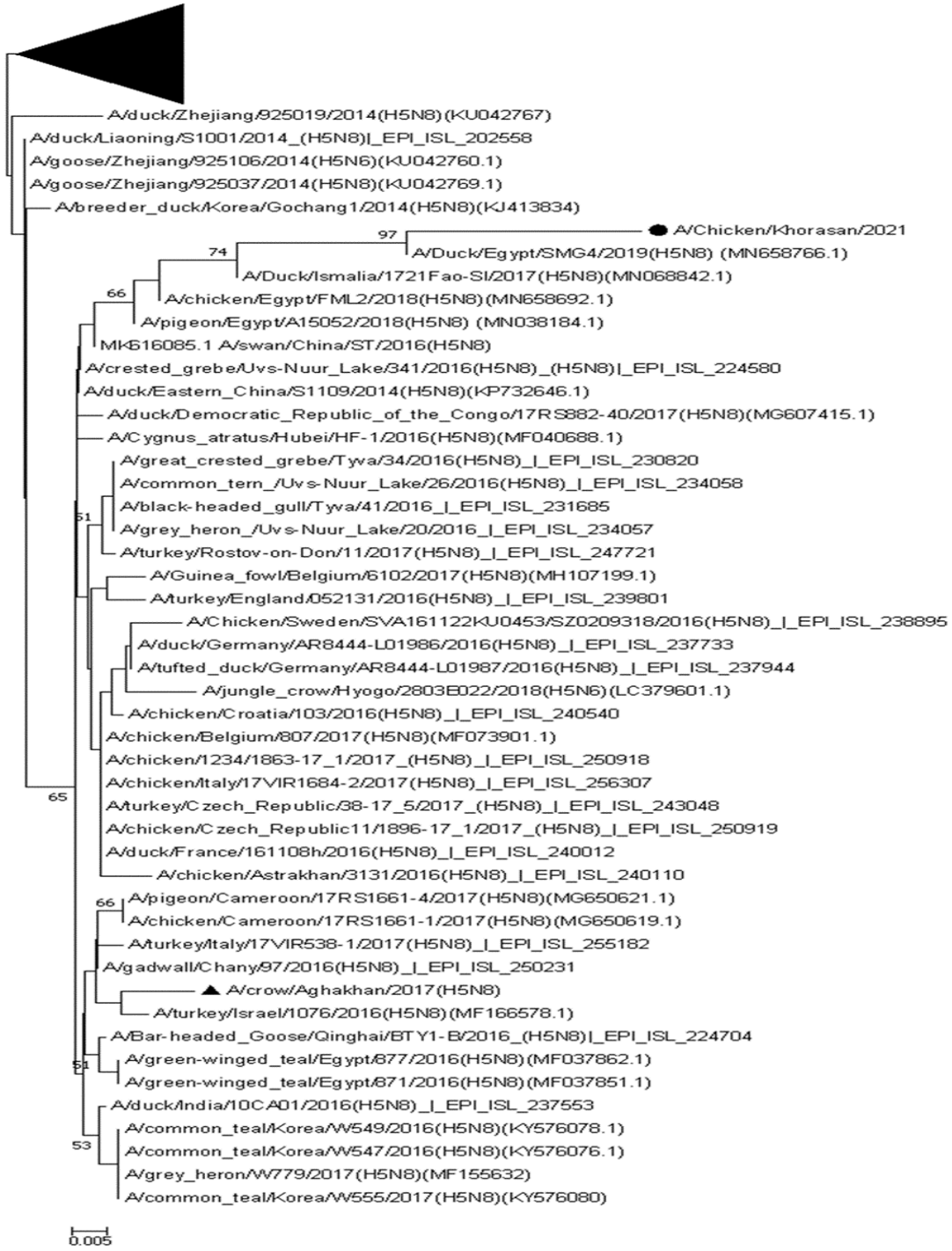
این جدایه متعلق به رده‌ی ۲,۳,۴,۴ گروه b بوده و با جدایه‌هایی از ایران، فلسطین اشغالی و بلژیک در یک خوشه قرار می‌گیرد (۲۷). در سال‌های ۲۰۱۷ تا ۲۰۱۹، تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در عراق شناسایی شد. **Mahmood** و **Allawe** در مطالعه‌ای نشان دادند که آنفولانزای فوق‌حاد پرندگان H۵N۸ جداشده از جوجه‌های گوشتی در بغداد و نواحی اطراف آن در کشور عراق متعلق به رده ۲,۳,۴,۴ بوده و بسیار شبیه به ویروس (A/DUCK/EGYPT/F۴۴۶/(۲۰۱۷) H۵N۸) با شناسه‌ی یکتا MH۸۹۳۷۳۷/۱ است (۳). A/Crow/Aghakhan/۲۰۱۷) H۵N۸

در ایران، اولین گزارش مربوط به شیوع تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس آتفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در گله‌های تخمگذار تجاری در استان تهران در سال ۲۰۱۶ می‌باشد که ویروس‌های جدا شده در این مطالعه متعلق به رده ۲,۳,۴,۴ از گروه B بودند. همچنین این مطالعه نشان داد که دو ویروس جدا شده در این مطالعه مشابه ویروس‌های روسی (A/great-crested grebe/Ubsu-NurLake/۳۴۱/(۲۰۱۶) و (A/great-crested grebe/Tyva/۳۴/(۲۰۱۶) بودند (۶، ۱۱). در سال ۲۰۱۷ این تحت‌تیپ از کلاغ ابلق در استان اصفهان جداسازی شد که دومین گزارش از شناسایی این ویروس در ایران بود. بررسی فیلوژنی ویروس جداسازی‌شده دراین مطالعه، این ویروس را (A/Crow/Aghakhan/۲۰۱۷) به همراه جدایه‌هایی از کره، مصر و کامرون در تحت گروه ۲,۳,۴,۴b Russia۲۰۱۶ و گروه b رده ۲,۳,۴,۴ تحت‌تیپ H۵ ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان قرار داد (۱۱). در مطالعه‌ی حاضر به بررسی فیلوژنی تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان جدا شده از یک مرغداری گوشتی در استان خراسان در کشور ایران در سال‌های ۲۰۲۰-۲۰۲۱ پرداخته‌ایم. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ویروس جدا شده ۹۹/۲٪ با ویروس H۵N۸ (۲۰۱۹)/(A/DUCK/EGYPT/SMG۴ جداساز ی شده از کشور مصر در سال ۲۰۱۹ و ۹۱,۰۸٪ با ویروس H۵N۸ (A/Crow/Aghakhan/۲۰۱۷)، جداسازی شده در ایران در سال ۲۰۱۷ مشابهت دارد. در تحلیل فیلوژنی ایزوله جدا شده در این مطالعه از مدل فیلوژنی Neighbor-Joining و مقدار ۱۰۰۰ Bootstrap استفاده شد. بر اساس درخت فیلوژنی رسم شده، ایزوله‌ی مطالعه‌ی حاضر با مقدار Bootstrap شاخه‌ی ۹۷۰ در رده‌ی ۲,۳,۴,۴گروه B (مشابه گوچانگ) قرار می‌گیرد.

جدول ۱. اطلاعات نوکلئوتیدی بخشی از ژن HA آنفولانزا فوق‌حاد پرندگان H۵N۸ جداشده در استان خراسان جنوبی در سال ۲۰۲۱ در مقایسه با برخی دیگر از ویروس‌های H۵N۸

		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
1	A/Chicken/Khorasan/2021							
2	A/crow/Aghakhan/2017(H5N8)	۹۱/۰۸						
3	A/Duck/Egypt/SMG4/2019(H5N8) (MN658766)	۹۹/۲۲	۹۷/۲۵					
4	A/Duck/Ismalia/1721Fao-SI/2017(H5N8) (MN068842)	۹۸/۰۴	۹۸/۴۴	۹۸/۸۴				
5	A/pigeon/Egypt/A15052/2018(H5N8) (MN038184)	۹۷/۶۴	۹۸/۸۴	۹۸/۴۴	۹۹/۶۱			
6	A/chicken/Egypt/FML2/2018(H5N8) (MN658692)	۹۷/۶۴	۹۸/۸۴	۹۸/۴۴	۹۹/۶۱	۱۰۰		

7	A/swan/China/ST/2016(H5N8) (MK616085)	۹۷/۲۴	۹۹/۲۲	۹۸/۰۵	۹۹/۲۳	۹۹/۶۱	۹۹/۶۱	



شکل ۱. درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس ژن HA تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان. این درخت با استفاده از ورژن ۷ نرم افزار MEGA با مدل Neighbor-Joining رسم شده است. اعداد موجود در هر گره بیانگر میزان Boot strap هر گره

می‌باشد. جدایه مطالعه‌ی حاضر به دایره توپر مشکی مشخص شده است. مثلث مشکی نشان دهنده‌ی جدایه پیشین (۲۰۱۷) در ایران می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه تاکنون گزارش‌هایی در ارتباط با جداسازی و فیلوژنی ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در ایران منتشر شده‌است، اما به‌نظر می‌رسد که اطلاعات اندکی درارتباط با اپیدمیولوژی و ویژگی‌های ژنتیکی و بیماری‌زایی این ویروس‌های در گردش در دسترس است. بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، جدایه‌ی این مطالعه مشابه جدایه‌هایی از مصر و ایران بوده و در رده ۲,۳,۴,۴ گروه B تحت‌تیپ H۵ ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان قرار می‌گیرد. این مطالعه نشان می‌دهد که این ویروس همچنان در صنعت طیور کشور در حال گردش بوده که شیوع و گسترش آن می‌تواند سبب وارد آمدن خسارات اقتصادی و بهداشتی گردد. مطالعات گسترده اپیدمیولوژیک و همچنین پایش مداوم سویه‌ها و تحت‌تیپ‌های در گردش می‌تواند به روشن‌تر شدن وضعیت آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در کشور کمک کند. همچنین افزایش نظارت بر بازار فروش پرندگان زنده و همچنین تقویت روش‌های امنیت زیستی در مرغداری‌ها به جهت کاهش احتمال شیوع‌های بعدی بیماری و مطالعات بیشتر برای بررسی فیلوژنی و ویژگی‌های ژنتیکی ویروس‌های آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در گردش در ایران پیشنهاد می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که در این مطالعه هیچگونه تعارض منافعی ندارند.

منابع

1.Ghafouri SA, Langeroudi AG, Maghsoudloo H, Tehrani F, Khaltabadifarahani R, Abdollahi H, ***et al***. Phylogenetic study-based hemagglutinin (HA) gene of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) detected from backyard chickens in Iran, 2015. Virus Genes. 2017;53(1):117-20.

2.**ElBakrey RM, El Sisi MA, Mansour SMG, Ahmed HH, Rajput M, Eid AAM**. Cleavage site stability of Egyptian highly pathogenic avian influenza viruses in backyard chickens during 2009–2011. J Microbiol Immunol Infect. 2015;48(1):28-35.

3.**Mahmood AN, Allawe AB**. Molecular Characterizations of a High Pathogenic Avian Influenza H5N8 in Iraq. Indian J. Forensic Med. Toxicol. 2021;15(1):2134-40.

4.**Lee D-H, Criado MF, Swayne DE**. Pathobiological origins and evolutionary history of highly pathogenic avian influenza viruses. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2021;11(2):a038679.

5.**Monne I, Fusaro A, Nelson MI, Bonfanti L, Mulatti P, Hughes J, *et al***. Emergence of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus from a Low-Pathogenic Progenitor. J Virol. 2014;88(8):4375-88.

6.**Ghafouri SA, GhalyanchiLangeroudi A, Maghsoudloo H, Kh Farahani R, Abdollahi H, Tehrani F, *et al***. Clade 2.3.4.4 avian influenza A (H5N8) outbreak in commercial poultry ,Iran, 2016: the first report and update data. Trop Anim Health Prod. 2017;49(5):1089-93.

7.**Verhagen JH, Van der Jeugd H, Nolet BA, Slaterus R, Kharitonov S, De Vries P**, ***et al***. Wild bird surveillance around outbreaks of highly pathogenic avian influenza A (H5N8) virus in the Netherlands, 2014, within the context of global flyways. Eurosurveillance. 2015;20(12):21069.

8.**Poen MJ, Verhagen JH, Manvell RJ, Brown I, Bestebroer TM, van der Vliet S**, ***et al***. Lack of virological and serological evidence for continued circulation of highly pathogenic avian influenza H5N8 virus in wild birds in the Netherlands, 14 November 2014 to 31 January 2016. Eurosurveillance. 2016;21(38):30349.

9.**Li X, Lv X, Li Y, Xie L, Peng P, An Q**, ***et al***. Emergence, prevalence, and evolution of H5N8 avian influenza viruses in central China, 2020. Emerg. Microbes Infect. 2022;11(1):73-82.

10.Takadate Y, Tsunekuni R, Kumagai A, Mine J, Kikutani Y, Sakuma S, *et al*. Different infectivity and transmissibility of H5N8 and H5N1 high pathogenicity avian influenza viruses isolated from chickens in Japan in the 2021/2022 season. Viruses. 2023 Jan 17;15(2):265.

11.**Ghafouri SA, Fallah Mehrabadi MH, Talakesh SF, Hosseini H, Ziafati Z, Malekan M, *et al***. Full genome characterization of Iranian H5N8 highly pathogenic avian influenza virus from Hooded Crow (Corvus cornix), 2017: The first report. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2019;64:73-80.

12.**Abdollahi H, Maken Ali AS, Monne I, Milani A, Habibi M, Zamperin G ,*et al***. Spatial spread and emergence of reassortant H5 highly pathogenic avian influenza viruses in Iran. Infect. Genet. Evol. 2020;83:104342 [In Persian].

13.**Slomka M, Coward V, Banks J, Löndt B, Brown I, Voermans J, *et al***. Identification of sensitive and specific avian influenza polymerase chain reaction methods through blind ring trials organized in the European Union. Avian Dis. 2007;51(s1):227-34.

14.**Kumar S, Stecher G, Tamura K**. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. MBE. 2016;33(7):1870-4.

15.**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. J Virol.۴-۶۵۲۱:(۱۲)۸۹;۲۰۱۵ .

16.**Kanehira K, Uchida Y, Takemae N, Hikono H, Tsunekuni R, Saito T**. Characterization of an H5N8 influenza A virus isolated from chickens during an outbreak of severe avian influenza in Japan in April 2014. Arch. Virol. 2015;1.60-43.

17.**Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y**. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. Biodiversity. 2006;7(1):51-5.

18.**Abolnik C, Pieterse R, Peyrot B, Choma P, Phiri TP, Ebersohn K, *et al***. The incursion and spread of highly pathogenic avian influenza H5N8 clade 2.3. 4.4 within South Africa. Avian Dis. 2019;63(1s):149-56.

19.**Puranik A, Slomka MJ, Warren CJ, Thomas SS, Mahmood S, Byrne AMP**, ***et al***. Transmission dynamics between infected waterfowl and terrestrial poultry: Differences between the transmission and tropism of H5N8 highly pathogenic avian influenza virus (clade 2.3.4.4a) among ducks, chickens and turkeys. Virology. 2020;541:113-23.

20.Valley-Omar Z, Cloete A, Pieterse R, Walaza S, Salie-Bassier Y, Smith M, *et al*. Human surveillance and phylogeny of highly pathogenic avian influenza A (H5N8) during an outbreak in poultry in South Africa, 2017. Influenza Other Respir Viruses. 2020;14(3):266-73.

21.Adlhoch C, Dabrera G, Penttinen P, Pebody R. Protective measures for humans against avian influenza A (H5N8) outbreaks in 22 European Union/European Economic Area Countries and Israel, 2016–17. Emerg. Infect. Dis. 2018;24(10)

22.Kouam MK, Tchouankui HN, Ngapagna AN. Epidemiological features of highly pathogenic avian influenza in Cameroon. Vet. Med. Int. 2019;2019(1):3796369.

23.Bertran K, Pantin-Jackwood MJ, Criado MF, Lee D-H, Balzli CL, Spackman E, ***et al***. Pathobiology and innate immune responses of gallinaceous poultry to clade 2.3.4.4A H5Nx highly pathogenic avian influenza virus infection. Vet. Res. 2019;50(1):89.

24.Hemida MG, Chu D, Abdelaziz A, Alnaeem A, Chan SMS, Peiris M. Molecular characterisation of an avian influenza (H5N8) outbreak in backyard flocks in Al Ahsa, Eastern Saudi Arabia, 2017–2018. Vet. Rec. Open. 2019;6(1):e000362.

25.Kandeil A, Hicks JT, Young SG, El Taweel AN, Kayed AS, Moatasim Y, *et al*. Active surveillance and genetic evolution of avian influenza viruses in Egypt, 2016–2018. Emerg. Microbes Infect. 2019;8(1):1370-82.

26.Sakuma S, Uchida Y, Kajita M, Tanikawa T, Mine J, Tsunekuni R, *et al*. First Outbreak of an H5N8 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus on a Chicken Farm in Japan in 2020. Viruses. 2021;13(3):489.

27.Saeed NM, Rashid PMA, Dyary HO. Genetic characterization of highly pathogenic avian influenza A (H5N8) virus isolated from domestic geese in Iraq, 2018. BMC Vet. Res. 2021;17(1):124.

Phylogenetic Study of First Outbreak of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus in Broiler Chicken Farm in South Khorasan Province, 2020-2021

Zahra Ziafati Kafi[1], Soroush Sarmadi[1], Mohammad Hossein Fallah Mehrabadi[2], Mohammad Abdoshah[2], Mohsen Mahmoudzadeh Akhijahani[2], Fahimeh Jamiri[1], Alireza Bakhshi[1], Hossein Hosseini[3], Omid Eghbali[1], Nazanin Sarvian[1], Arash Ghalyanchilangeroudi[1*]

1- Department of microbiology and immunology, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organization, Karaj, Alborz, Iran
3- Department of clinical science, Faculty of veterinary medicine, Karaj Islamic Azad university, Alborz, Iran

* Corresponding author:

Arash Ghalyanchilangeroudi

Department of microbiology and immunology, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Phone: 02161117154

Abstract

In addition to economic losses to poultry industry, outbreaks of H5 subtype of highly pathogenic avian influenza virus are considered as a major threat for public health. H5N8 subtype of highly pathogenic avian influenza virus was detected for the first time in China in 2010. In present study in 2021, 50 tracheal samples were collected from 30075 susceptible chicken in a broiler chicken farm located in Birjand city, south Khorasan province and the infection with H5N8 subtype in them was evaluated using RT-PCR method and partial sequencing of hemagglutinin encoding gene. Molecular assay confirmed presence of the

genome of this subtype in collected samples. According to the phylogenetic analysis, H5N8 virus isolated in present study have the most nucleotide similarity (99.2%) with (A/Duck/Egypt/SMG4/2019/(H5N8)), isolated in Egypt in 2019 and 91.0% similarity with (A/crow/Aghakhan/2017(H5N8)) isolated in Iran in 2017. Results of current study confirm presence of this virus in Iran and highlighting the critical need to constant monitoring to manage economic and health risk.

Keywords: H5N8 Influenza, clade 2.3.4.4, poultry industry, Highly Pathogenic Avian Influenza