

# مطالعه‌ی فیلوژنتیکی اولین شیوع تحت تیپ H5N8 ویروس آنفلوانزای فوق حاد پرنندگان در مرغداری گوشتی در استان خراسان جنوبی، ۲۰۲۰-۲۰۲۱

زهرا ضیافتی کافی<sup>۱</sup>، سروش سرمدی<sup>۱</sup>، محمد حسین فلاح مهرآبادی<sup>۲</sup>، محمد عبدالشاه<sup>۲</sup>، محسن محمودزاده اخیحجانی<sup>۲</sup>،

فهیمه جمیری<sup>۱</sup>، علیرضا بخشی<sup>۱</sup>، حسین حسینی<sup>۳</sup>، امید اقبالی<sup>۱</sup>، نازنین سرویان<sup>۱</sup>، آرش قلیانچی لنگرودی<sup>۱\*</sup>

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 تحت تیپ H5 ویروس آنفلوانزای فوق حاد پرنندگان علاوه بر وارد آوردن خسارات اقتصادی بر بدنه‌ی صنعت طیور، از نظر بهداشت عمومی نیز یک تهدید بزرگ محسوب می‌گردد. رخداد آنفلوانزای فوق حاد پرنندگان علاوه بر این که می‌تواند سبب بروز تلفات بالایی در بین جمعیت پرنندگان شود، به دلیل توانایی انتقال به انسان و بیماری‌زایی می‌تواند بهداشت عمومی را نیز در خطر قرار 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، جمع‌آوری شد. نمونه‌های

جمع‌آوری شده در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان شروع آزمایش در دمای  $20^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شدند و سپس با استفاده از روش RT-PCR از نظر آلودگی با تحت‌تیپ H5N8 ویروس آنفلوآنزای 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 MEGA ۷ و توالی‌های پیشین ثبت شده در بانک ژنی (NCBI GenBank)، ویروس H5N8 جدا شده در این مطالعه، دارای بیش‌ترین شباهت در نوکلئوتید (۹۹/۲٪) به ویروس H5N8 (A/DUCK/EGYPT/SMG۴/۲۰۱۹) جدا شده در کشور مصر در سال ۲۰۱۹ و همچنین ۹۱/۰۸٪ شباهت با ویروس (A/Crow/Aghakhan/۲۰۱۷H5N8)، 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/۲۰۱۷H5N8)

**کلمات کلیدی:** آنفلوآنزای H5N8، رده‌ی ۴/۴/۳/۲، صنعت طیور، آنفلوآنزای فوق‌حاد پرندگان

## مقدمه

آنفلوآنزای پرندگان یک بیماری عفونی حاد در ماکیان، پرندگان آبی، 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 RNA قطعه قطعه مفهوم منفی (Negative sense) می‌باشند (۱). ویروس آنفلوآنزای پرندگان در سطح خود دارای دو گلیکوپروتئین حیاتی هم‌گلویتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) بوده که برپایه‌ی ویژگی‌های این گلیکوپروتئین‌ها، ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان به ۱۶ تحت‌تیپ برای پروتئین هم‌گلویتینین و ۹ تحت‌تیپ برای پروتئین نورآمینیداز تقسیم‌بندی می‌گردند (۲). علاوه بر این تحت‌تیپ‌ها، دو تحت‌تیپ H1۷N1۰ و H1۸N۱۱ نیز وجود دارند با این تفاوت که تاکنون تنها در خفاش یافت شده‌اند (۳). پروتئین هم‌گلویتینین نقش مهمی در بیماری‌زایی، تعیین طیف میزبان‌ها و همچنین خواص آنتی‌ژنی ویروس داشته و توالی ژنتیکی آن تعیین‌کننده‌ی فوق‌حاد و یا تحت‌حاد بودن ویروس آنفلوآنزای پرندگان می‌باشد (۱، ۲).

ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان بر اساس میزان بیماری‌زایی آن‌ها در ماکیان نیز طبقه‌بندی می‌شوند. بر این اساس بیش‌تر تحت‌تیپ‌های H۱-H۱۶ این ویروس سبب بروز علائم خفیف بیماری تنفسی، گوارشی و تولیدمثلی می‌شوند که تحت عنوان آنفلوآنزای پرندگان تحت‌حاد شناخته شده، در حالی که برخی از تحت‌تیپ‌های H۵ و H۷ سبب بروز یک بیماری کشنده‌ی سیستمیک می‌شوند و تحت عنوان آنفلوآنزای فوق‌حاد پرندگان نام‌گذاری می‌گردند (۴). یکی از علل ظهور انواع فوق‌حاد ویروس آنفلوآنزای پرندگان، رخداد جهش‌هایی است که سبب الحاق و یا جا به جایی آمینواسیدهای بازی در جایگاه برش پروتئین هم‌گلویتینین می‌شود، اگرچه علاوه بر این پروتئین، پروتئین‌های دیگر ویروس همانند مجموعه پلیمرازی ویروس و نوکلئوپروتئین آن می‌توانند در بیماری‌زایی نقش داشته باشند (۵). ویروس‌های آنفلوآنزای 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 آنفلوآنزای فوق‌حاد پرندگان، اولین بار در سال ۲۰۱۰ در پرندگان بازار زنده‌فروشی در کشور چین شناسایی شدند. این ویروس‌ها در برگرفته‌ی ژن‌هایی هستند که از ویروس آنفلوآنزای فوق‌حاد تحت‌تیپ NH۵، مشتق شده‌اند (۷). در سال ۲۰۱۴ تحت‌تیپ H۵N۸ ویروس‌های آنفلوآنزای 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 اواخر 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 قوا احتمالاً مسئول ورود تحت‌رده b۲ ویروس H۵N۸ به کشور چین بوده‌است و ممکن است از پرندگان در روسیه منشأ گرفته‌باشد. همچنین این مطالعه نشان داد که قوا می‌تواند به‌عنوان پرنده‌ی شاخصی در انتشار فرامرزی و همچنین پایش ویروس H۵N۸ در نظر گرفته‌شود (۹).

اگرچه هر دو تحت تیپ H5N1 و H5N8 از انواع فوق حاد ویروس آنفلوآنزای پرندگان شناخته می‌شوند اما ممکن است در بیماری‌زایی و عفونت‌زایی آن‌ها تفاوت‌هایی مشاهده شود، برای مثال بر اساس مطالعه‌ای که توسط Takadate و همکاران انجام شد، به نظر می‌رسد که تحت تیپ H5N8 نسبت به H5N1 عفونت‌زایی و انتقال بیش‌تری در بین جوجه‌ها دارد (۱۰) در ایران تحت تیپ H5N1 ویروس آنفلوآنزا در سال ۲۰۰۶ در لاشه‌ی قویی وحشی شناسایی و تایید شد. همچنین در سال ۲۰۱۶، تحت تیپ H5N8 در گله‌های تخم‌گذار تجاری در استان تهران شناسایی شد (۱۱). در سال ۲۰۱۷ در ایران، این تحت تیپ از ویروس آنفلوآنزای پرندگان فوق حاد، برای اولین بار از کلاغ ابلق در استان اصفهان جداسازی شد (۱۱).

ایران به دلیل جغرافیای خاص خود، می‌تواند به‌عنوان کانونی مهم برای بیماری آنفلوآنزای فوق حاد 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 آنفلوآنزای پرندگان به کشور شود، مطالعه و پایش ویروس آنفلوآنزای پرندگان در کشور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی مولکولی ویروس آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان جدا شده به دنبال شیوع این بیماری در یک مرغداری گوشتی در استان خراسان در کشور ایران و همچنین بررسی فیلوژنی این ویروس می‌باشد.

## مواد و روش کار

### جمع آوری نمونه

به‌دنبال شیوع بیماری با علائم آنفلوآنزای فوق حاد در یک مرغداری پرورش‌دهنده مرغ گوشتی در شهر بیرجند در استان خراسان جنوبی 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  $70^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شدند.

### استخراج RNA و RT-PCR

نمونه‌های نای در ۵ دسته‌ی ۱۰ تایی با استفاده از تیغ اسکالپل در  $\text{X1 PBS}$  خرد و هموژن شدند. سپس مقدار  $200\ \mu\text{l}$  از نمونه‌ی هموژن شده برداشته‌شد و RNAی تام آن‌ها با استفاده از کیت استخراج CINA PURE™ ONE KIT ساخت شرکت سیناژن (ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شده و در  $45\ \mu\text{l}$  از Elution buffer موجود در کیت، رهاسازی شد. RNA استخراج‌شده تا زمان انجام RT-PCR در فریزر  $70^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شدند.

برای انجام فرایند RT-PCR، در ابتدا ساخت cDNAی مکمل با استفاده از کیت ساخت cDNAی شرکت Fremontas 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  $25\ \mu\text{l}$  انجام شده که شامل  $12/5\ \mu\text{l}$  مسترمیکس آماده‌ی مصرف،  $1\ \mu\text{l}$  از هر کدام از پرایمرها،  $8\ \mu\text{l}$  آب مقطر استریل و  $2/5\ \mu\text{l}$  از cDNAی ساخته‌شده، می‌باشد. برای انجام واکنش PCR در مرحله‌ی اول جهت جداسازی اولیه ابتدا دمای  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳ دقیقه اعمال شد. سپس واکنش

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

### توالی یابی و آنالیز فیلوژنی

پس از خالص‌سازی محصولات PCR با استفاده از کیت AccuPrep PCR (کمپانی Bioneer، کره) یک نمونه‌ی مثبت جهت توالی‌یابی با استفاده از روش سنجر به شرکت Bioneer کشور کره ارسال شد. خوانش توالی به صورت دو طرفه با استفاده از پرایمرهای (Forward and Reverse) و با استفاده از دستگاه آنالیزور ژنتیک ABI ۳۱۰۰ شرکت آمریکایی Applied Biosystems انجام شد. تایید نتایج خوانش با استفاده از ابزار BLAST انجام شد.

برای رسم درخت فیلوژنی، توالی‌های مربوط به تحت‌تیپ H5N8 ویروس آنفلوانزا از پایگاه داده‌های NCBI و GSIAD دریافت شد و درخت فیلوژنی با نرم افزار MEGA7 و با استفاده از روش Neighbor-Joining (۱۴)، با مقدار Bootstrap ۱۰۰۰ جهت ارزیابی جایگاه قرارگیری توالی‌ها در درخت فیلوژنی، رسم شد. توالی مربوط به این مطالعه با شناسه یکتا MT225015 در بانک ژنی قابل دسترسی است.

### نتایج

آنالیز فیلوژنی نشان داد که ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان H5N8 استان خراسان جنوبی که در این مطالعه جدا شد (A/Chicken/Khorasan/2021H5N8) شباهت بالایی به میزان ۹۹/۲۲ درصد، با جدایه‌ی H5N8 (A/DUCK/EGYPT/SMG4/(2019)) با شناسه‌ی یکتا MN1658766، دارد (جدول ۱). آنالیز توالی‌ها همچنین نشان داد که جدایه‌ی A/Chicken/Khorasan/2021H5N8 اگرچه کاملاً با مشابه ویروس پیشین جداسازی‌شده در ایران H5N8 A/Crow/Aghakhan/2017 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/1721Fao-SI/2017H5N8 با کد یکتا MN0688422 و شباهت ۹۷/۶۴٪ با جدایه‌های A/Piogeon/Egypt/A15052/2018H5N8 و H5N8 (A/Chicken/EGYPT/FML2/(2018))، به ترتیب با شناسه‌های یکتای MN038184 و MN658692 می‌باشد. همچنین نتایج همولوژی بیانگر شباهت ۹۷/۲۴٪ با ویروس A/swan/China/ST/2016H5N8 با شناسه‌ی MK616085 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 H5 (شبهه گوچانگ) قرار می‌گیرد (۱۵).

### بحث

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

در اقیانوس آرام را در بر می‌گیرد. همچنین در ایران نیز هر سال 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). علاوه بر پرندگان مهاجر، پرندگان بومی نیز می‌توانند نقش مهمی در اپیدمیولوژی و انتقال ویروس آنفلوانزای 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 مهاجر 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 یا غیرمستقیم، تماس با مواد آلوده و یا توسط کارگران و سایر افرادی که وارد مرغداری می‌شوند صورت بگیرد (۶). به دلیل قرار گرفتن ایران در مسیر مهاجرت پرندگان مهاجر، بررسی تحت‌تیپ‌های جدید آنفلوانزای پرندگان که در حال گردش هستند، به منظور تعیین یک برنامه نظارتی مناسب برای پیشگیری از شیوع و همه‌گیری این ویروس، امری ضروری است.

در ارتباط با شیوع و گسترش تحت‌تیپ H5N8 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 H5N8 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 ویلنرز، استان امپولامانگا آفریقای جنوبی اتفاق افتاده است (۱۸). این ویروس به سرعت در آفریقای جنوبی گسترش یافت به نحوی که صنعت پرورش جوجه‌ی تخم‌گذار در استان کیپ (Cape) غربی تقریباً نابود شد (۱۸).

رده‌ی ۴/۴/۳/۲ تحت‌تیپ H5N8 ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان به راحتی می‌تواند از پرندگان آبی وحشی مهاجر به ماکیان سانان تجاری منتقل شود (۱۹). در طول زمستان ۲۰۱۶-۲۰۱۷، شیوع رده‌ی ۴/۴/۳/۲b از تحت‌تیپ H5N8 ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در مقیاس بزرگتری از شیوع رده ۴/۴/۳/۲a در زمستان ۲۰۱۴-۲۰۱۵، به دنبال مهاجرت پاییزی پرندگان وحشی، تکرار شد. سپس این رده از ویروس به مناطق آفریقای جنوب صحرا (Sub Saharan Africa) گسترش و به شکل ویرانگری شیوع یافت (۱۹).

در زمینه‌ی انتقال این ویروس به انسان و خطرات بهداشت عمومی نیز مطالعاتی صورت گرفته است. در مطالعه‌ی **Valley-Omar** و همکاران صورت گرفت، انتقال تحت‌تیپ H5N8 ویروس آنفلوانزا به انسان در طی شیوع این ویروس در آفریقای جنوبی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۷۴ نمونه از افرادی که سابقه مواجهه 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 تقریباً ۳ درصد برای آنفلوانزای فصلی انسانی (H3N2) مثبت بودند و هیچکدام از نمونه‌ها برای تحت‌تیپ H5 مثبت نبودند (۲۰). مطالعه‌ی دیگری توسط **Adloch** و همکاران با هدف درک بهتر رهیافت‌های ملی برای مدیریت تهدیدات بهداشت عمومی در طی شیوع تحت‌تیپ H5N8 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 بررسی شده در این مطالعه، هیچ نمونه‌ی مثبتی از نظر وجود H5N8 شناسایی نشد. داروهای ضد ویروسی و واکسیناسیون در کشورهای مختلف متفاوت بود. اگرچه این مطالعه خطر کمی را برای انتقال این تحت تیپ به انسان نشان داد، اما سطح بالای حفاظت فردی در این مطالعه پیشنهاد شده است (۲۱).

مطالعات دیگری نیز برای بررسی اپیدمیولوژی ویروس آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان در سایر کشورها انجام شده است. در کامرون، **Kaum** و همکاران در مطالعه‌ای رخداد آنفلوآنزای حاد پرندگان ناشی از دو تحت تیپ H5N8 و H5N1 را نشان دادند. پرندگانی همچون طاووس هندی (*Pavo cristatus*)، کبوتر، اردک، مرغ بومی و مرغ هندی با تحت تیپ H5N8 درگیر شده بودند اما هیچ مورد عفونت انسانی گزارش نشد. اقدامات امنیت زیستی ضعیف در مزارع پرورش و بازارهای فروش پرندگی زنده در کنار جا به جایی فروشندگان مرغ و تخم مرغ بین مزارع، بازارها و شهرها بدون رعایت اقدامات محافظتی از عوامل خطر اصلی در انتشار این بیماری به حساب می‌آیند (۲۲). در سال‌های ۲۰۱۴-۲۰۱۵ در ایالات متحده آمریکا، رده ۴/۴/۳/۲a تحت تیپ H5 ویروس آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان در بین گله‌های روستایی و صنعتی (مرغ و بوقلمون) شیوع یافت. شیوع تحت تیپ‌های H5N8 و H5N1 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 آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان H5N8 در ده گله‌ی روستایی توسط **Hemida** و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. پرندگانی که از نظر بالینی درگیر شده بودند، شامل مرغ، شتر مرغ، 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 گاه‌گاه مشاهده شد. در بعضی موارد عفونت فوق حاد 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 جدایی این مطالعه نشان داد که این جدایی با ویروس‌های H5N7 پیشین در عربستان مرتبط بوده و شباهتی بین ۹۹/۸۷ تا ۹۹/۹۸ درصد را نشان دادند. تجزیه و تحلیل ژن HA جدایی این مطالعه نشان داد که این جدایی در یک خوشه در رده‌ی ۴/۴/۳/۲ و گروه B تحت تیپ H5 قرار می‌گیرد (۲۴). در مصر بین ژانویه ۲۰۱۶ تا دسامبر ۲۰۱۸، به‌منظور بررسی بیماری‌های ویروسی، ۶۱۳۷ نمونه سوپ از کلوک و ۵۰۷۳ نمونه سوپ 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 بررسی شده ۳۷،۱٪ به H5N8، ۷،۶٪ به H5N1، ۴،۸٪ به H9N2 و ۷،۳٪ از نمونه‌ها به‌طور همزمان به ۲ مورد از ۳ تحت تیپ ذکر شده آلوده بودند. بر اساس توالی‌یابی ژن HA، ویروس‌های H5N8 به زیر رده‌ی ۲/۳/۴/۴ تعلق داشتند. در این مطالعه، شیوع H5N8 در اردک‌ها (۲/۴٪) بیش‌تر از مرغ‌ها (۰/۹۴٪) بود (۲۵). (A/Chicken/Kagawa/C11/2020).

در سال ۲۰۲۰، در استان کاگوا در غرب ژاپن آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان، به‌دنبال شیوع تحت تیپ H5N8 این ویروس در یک مزرعه مرغ تخم‌گذار رخ داد. بررسی فیلوژنی ویروس (A/Chicken/Kagawa/C11/2020)، نشان داد که این ویروس متعلق به رده‌ی ۲،۳،۴،۴B از دودمان *Goose/Guangdong* تحت تیپ H5 می‌باشد (۲۶). پس از شیوع تحت تیپ H5N1 ویروس آنفلوآنزای پرندگان در سال‌های ۲۰۰۶، ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶، در سال ۲۰۱۸ تحت تیپ H5N8 ویروس آنفلوآنزای پرندگان در بین غازهای اهلی بومی که به شیوه‌ی روستایی نگهداری می‌شدند شناسایی شد. آنالیز فیلوژنی دو ژن هماگلوکوتینین و نورآمینیداز ویروس نشان داد که

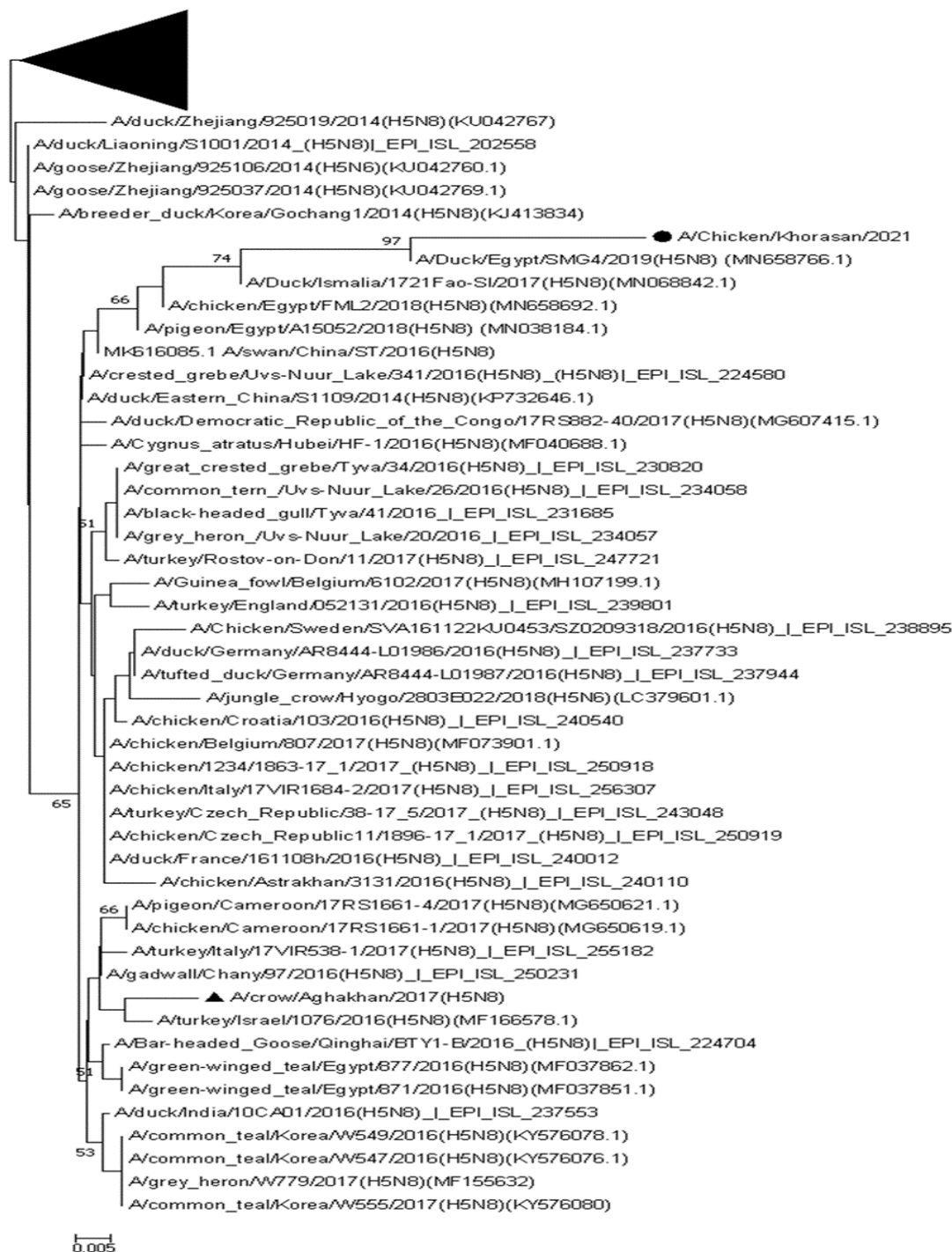
این جدایه متعلق به رده‌ی ۲,۳,۴,۴ گروه b بوده و با جدایه‌هایی از ایران، فلسطین اشغالی و بلژیک در یک خوشه قرار می‌گیرد (۲۷). در سال‌های ۲۰۱۷ تا ۲۰۱۹، تحت تیپ H5N8 ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان در عراق شناسایی شد. **Allawe** و **Mahmood** در مطالعه‌ای نشان دادند که آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان H5N8 جدا شده 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/F446/(2017) H5N8) با شناسه‌ی یکتا A/Crow/Aghakhan/2017) H5N8 (۳) است.

در ایران، اولین گزارش مربوط به شیوع تحت تیپ H5N8 ویروس آنفلوانزای 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/341/(2016) و (A/great-crested grebe/Tyva/34/(2016) بودند (۶، ۱۱). در سال ۲۰۱۷ این تحت تیپ از کلاغ ابلق در استان اصفهان جداسازی شد که دومین گزارش از شناسایی این ویروس در ایران بود. بررسی فیلوژنی ویروس جداسازی شده در این مطالعه، این ویروس را (A/Crow/Aghakhan/2017) همراه جدایه‌هایی از کره، مصر و کامرون در تحت گروه ۲,۳,۴,۴b Russia ۲۰۱۶ و گروه b رده ۲,۳,۴,۴ تحت تیپ H5 ویروس آنفلوانزای فوق‌حاد پرندگان قرار داد (۱۱). در مطالعه‌ی حاضر به بررسی فیلوژنی تحت تیپ H5N8 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 H5N8 (A/DUCK/EGYPT/SMG4/(2019) جداسازی شده از کشور مصر در سال ۲۰۱۹ و ۹۱,۰۸٪ با ویروس H5N8 (A/Crow/Aghakhan/2017)، جداسازی شده در ایران در سال ۲۰۱۷ مشابهت دارد. در تحلیل فیلوژنی ایزوله جدا شده در این مطالعه از مدل Neighbor-Joining و مقدار ۱۰۰۰ Bootstrap استفاده شد. بر اساس درخت فیلوژنی رسم شده، ایزوله‌ی مطالعه‌ی حاضر با مقدار Bootstrap شاخه‌ی ۹۷۰ در رده‌ی ۲,۳,۴,۴ گروه B (مشابه گوجانگ) قرار می‌گیرد.

جدول ۱. اطلاعات نوکلئوتیدی بخشی از ژن HA آنفلوانزا فوق‌حاد پرندگان H5N8 جدا شده در استان خراسان جنوبی در سال ۲۰۲۱ در مقایسه با برخی دیگر از ویروس‌های H5N8

		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 تحت تیپ H5N8 ویروس آنفلوانزای فوق حاد 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 در ارتباط 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 تحت تیپ 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 منافی 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, Ghalyanchi Langeroudi 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<sup>1</sup>, Soroush Sarmadi<sup>1</sup>, Mohammad Hossein Fallah Mehrabadi<sup>2</sup>, Mohammad Abdoshah<sup>2</sup>, Mohsen Mahmoudzadeh Akhijahani<sup>2</sup>, Fahimeh Jamiri<sup>1</sup>, Alireza Bakhshi<sup>1</sup>, Hossein Hosseini<sup>3</sup>, Omid Eghbali<sup>1</sup>, Nazanin Sarvian<sup>1</sup>, Arash Ghalyanchilangeroudi<sup>1\*</sup>

- 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