Archive of SID

آنالیز فیلوژنیک بخشی از ژن پروتئین هماگلوتینین سه ویروس آنفلوانزای پرندگان H9N2 جدا شده از گله‌های طیور گوشتی اهواز بین سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲

زهرا برومند[۱*]، رمضانعلی جعفری[۲] و منصور میاحی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۷

چکیده

صنعت طیور کشور ایران از سال ۱۳۷۷ درگیر بیماری آنفلوانزای پرندگان می‌باشد. بروز بیماری با تلفات بالا این تصور را ایجاد کرده است که ویروس آنفلوانزا در سطح مزرعه دچار تغییرات ژنتیکی شده است. در این مطالعه سه ویروس آنفلوانزای طیور (H9N2) جدا شده از گله‌های آلوده با تلفات بالا مورد شناسایی ملکولی قرار گرفتند. قطعه ۴۸۸ جفت باز در این ویروس‌ها که در بر گیرنده‌ی بخش میانی ژنوم پروتئین هماگلوتینین بود به روش RT-PCR تکثیر و سپس تعیین توالی نوکلئوتید انجام گرفت. آنالیز نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه نشان‌دهنده‌ی وجود سه ویروس بسیار شبیه به یکدیگر ولی متمایز از همدیگر بود. آنالیز فیلوژنی قطعه ۴۸۸ جفت باز محصولات گزارش شده از سایر نقاط جهان نشان داد، ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران رابطه‌ی بسیار نزدیکی با یکدیگر داشته و به احتمال فراوان دارای منشاء یکسانند. بیش‌ترین شباهت اسیدهای آمینه این ویروس‌ها به ترتیب با ویروس‌های آنفلوانزای طیور کشور هند (۹۹ و ۹۷ درصد)، تونس (۹۹ درصد) بود. نتایج این مطالعه نشان داد که ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران شبیه ویروس‌های غیر بیماری‌زای H9N2 از دودمان اوراسیایی بوده و تغییرات ژنتیکی در ژن هماگلوتینین موجب به وجود آمدن پاتوتیپ جدید نشده است.

کلمات کلیدی: ویروس آنفلوانزا، پروتئین هماگلوتینین، H9N2، آنالیز فیلوژنی

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان یک بیماری حاد و مسری است که می‌تواند گونه‌های مختلف پرندگان را درگیر کند. ویروس‌های آنفلوانزا در خانواده ارتومیکسوویریده قرار داشته و دارای ژنوم قطعه‌ای با پولاریته منفی هستند. این ویروس‌ها بر اساس شاخص‌های آنتی‌ژنیکی پروتئین‌های نوکلئوپروتئین و ماتریکس، به سه جنس A، B و C تقسیم‌بندی شده‌اند. در این میان فقط جنس A ویروس-های آنفلوانزا هستند که می‌توانند ایجاد عفونت طبیعی در پرندگان نمایند. ویروس‌های آنفلوانزای جنس A بر اساس خواص آنتی‌ژنی دو گلیکوپروتئین سطحی هماگلوتینین و نورآمینیداز به تحت تیپ‌های متعددی تقسیم‌بندی می‌شوند. تا کنون، ۱۶ تحت تیپ H و ۹ تحت تیپ N شناسایی شده است (Foucheir et al. 2005).

ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان به دو گروه بسیار بیماری‌زا و کم‌تر بیماری‌زا تقسیم می‌شوند. در بین ویروس‌های کم‌تر بیماری‌زای آنفلوانزا، تحت تیپ H9N2 دارای اهمیت زیادی می‌باشد (Suarez 2008). از دهه‌ی ۱۹۹۰ میلادی تا کنون، گزارش‌های زیادی مبنی بر درگیری گله‌های طیور در نقاط مختلف جهان با این تحت

[۱*] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: z.boroomand@scu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[۳] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

www.SID.ir

Archive of SID

تیپ آنفلوانزا وجود دارد و در اثر آن خسارات اقتصادی زیادی به صنعت مرغداری وارد شده است. همچنین گزارش‌هایی مبنی بر آلودگی انسان با این ویروس وجود دارد که اهمیت این تحت تیپ را از نظر بهداشت عمومی بیش‌تر کرده است (Peiris et al. a and b 1999). در ایران، واگیری آنفلوانزای ماکیان در خرداد ماه ۱۳۷۷ در مرغداری‌های استان‌های تهران و قزوین رخ داد و عامل آن ویروس آنفلوانزای جنس A، تحت تیپ H9N2 تشخیص داده شد (Pourbakhsh et al. 2000). در اوایل تیرماه ۱۳۷۷ وصفی‌مرندی و بزرگ‌مهری‌فرد توانستند برای اولین بار این تحت تیپ را گزارش کنند. تشخیص نهائی بر مبنای جداسازی ویروس از نمونه‌های بافت‌های آسیب دیده پرندگان مبتلا، توسط مرکز تشخیص دانشگاه ویبریج انگلستان صورت گرفت. مشخصات ویروس جدا شده 98/101-A/Chicken/ZMT تحت تیپ H9N2 بود. تحت تیپ جدا شده از ایران در آزمایش‌های ویروس‌شناسی، نه چندان بیماری‌زا شناخته شد (Vasfi Marandi and Bozorgmehri fard 2002). از آن تاریخ تاکنون، بیماری در مزارع طیور کشور در حال گردش است و با این که در گروه کم‌تر بیماری‌زای ویروس آنفلوانزا قرار گرفته، ولی باعث تلفات تا ۶۵ درصد و کاهش تولید تخم تا ۷۵ درصد در مزارع طیور نقاط مختلف ایران شده است. از بارزترین ویژگی‌های این بیماری وجود مشکلات تنفسی، تلفات بالا و جراحت‌های اگزوداتیو در مجاری تنفسی به ویژه قالب-های پنیری (cast) در برونش‌های ثانویه و شاخه‌های پایین این مجاری می‌باشد. احتمال می‌رود، عواملی از جمله استرس، مدیریت، تغذیه و عفونت‌های ویروسی و باکتریایی همزمان در افزایش حدت این تحت تیپ و افزایش مرگ و میر حاصله، مؤثر باشند (Seifi et al. 2009).

طرقی و همکاران در سال ۱۳۸۲، تغییرات احتمالی توالی اسیدهای امینه در محل شکسته شدن پروتئین HA ویروس‌های آنفلوانزای طیور (H9N2) جدا شده از گله‌های آلوده را مورد شناسایی ملکولی قرار دادند. بیش‌ترین قرابت ژنتیکی این ویروس‌ها به ترتیب با ویروس‌های آنفلوانزای کشورهای عربستان سعودی، آلمان و پاکستان بود. متأسفانه علیرغم تلاش‌های فراوان هنوز این صنعت نتوانسته است از این بیماری رهائی یابد. طی چند سال گذشته موارد بسیار زیادی از این بیماری در بخش بیماری‌های طیور دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ثبت شده است که در بعضی موارد مرغداران، شکایت از وجود تلفات بسیار زیاد در سطح گله‌های خود را داشتند.

با توجه به تغییرات ژنتیکی سریع این ویروس و ظهور سویه‌های با حدت بالا از سویه‌های مادری با حدت کم در نقاط مختلف جهان، این سئوال مطرح شد که آیا ویروس‌های موجود در حال گردش دستخوش تغییرات ژنتیکی شده‌اند. در این مطالعه سه ویروس آنفلوانزای طیور (H9N2) جدا شده از گله‌های آلوده با تلفات بالا مورد شناسایی ملکولی قرار گرفتند.

مواد و روش کار

از سه وقوع آنفلوانزای طیور در گله‌های مرغ گوشتی شهرستان اهواز با تلفات بالا سه ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 (A/chicken/Iran/AIa/2013(H9)) (A/chicken/Iran/AId/2013(H9)) (A/chicken/Iran/AIc/2013(H9)) در بخش بیماری‌های طیور دانشکده‌ی دامپزشکی جداسازی گردیده بود که این ویروس‌ها در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. هر یک از این ویروس‌ها برای دو بار روی تخم‌مرغ‌های جنین‌دار پاساژ شده بودند.

پس از خروج مایع آلانتوئیک از حالت انجماد، ۱۰۰۰ میکرولیتر RNX (ساخت شرکت سیناژن، ایران) به هر لوله حاوی ۲۰۰ میکرولیتر مایع آلانتوئیک اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از کلروفرم به لوله‌ها اضافه کرده و به مدت ۱۵ ثانیه لوله‌ها را به آرامی تکان داده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله‌ی بعدی، لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی

www.SID.ir

Archive of SID

سانتی‌گراد در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی، که حاوی مولکول‌های اسید ریبونوکلئیک است (به طوری که با مایع در فاز میانی مخلوط نگردد) برداشت شد و به لوله‌های جدید منتقل شد. در مرحله‌ی بعد، هم حجم با این مایع، ایزوپروپانول برای نامحلول کردن ژنوم اضافه شده و کاملاً مخلوط گردید و ۱۵ دقیقه روی یخ نگهداری شد. مجدداً لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. پس از دور ریختن مایع رویی و مشاهده‌ی پلت سفید رنگ قطره‌ی اشکی در ته لوله، ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به هر لوله اضافه شد تا پلت شستشو گردد. در مرحله‌ی بعدی، لوله‌ها به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در انتها مایع رویی را دور ریخته و اجازه داده شد تا در دمای اتاق تمام الکل تبخیر شود و رسوب خشک گردد. سپس ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به هر لوله اضافه شده و تا زمان ساخت cDNA در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

برای ساختن cDNA از RNA استخراج شده از کیت RT Pre Mix Accupower^{R} (ساخت شرکت بیونیر، کشور کره جنوبی) استفاده گردید. برای این کار از زوج آغازگرهای شناساگر ژن H9 ویروس آنفلونزا (Lee et al. 2001) استفاده گردید. مشخصات زوج آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش RT-PCR نوکلئوتیدهای دجنره Y=C or T و R=A or G (Lee et al. 20001)

توالی نوکلئوتیدی	ژن هدف	ویروس
F: CTY CAC ACA GAR CAC AAT GG	H9	AIV
R: GTC ACA CTT GTT GTT GTR TC	H9	AIV

برای انجام این واکنش، ۱۰ میکرولیتر از RNA یک نمونه همراه با ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۲۰ پیکومول مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس این مخلوط به لوله‌های ۰/۲ میلی‌لیتر مخصوص کیت منتقل شده و با آب مقطر حاوی DEPC به حجم۲۰ میکرولیتر رسانده شد. به وسیله‌ی دستگاه ورتکس پلت‌های لیوفیلیزه و محتویات با هم مخلوط گردید و پس از یک سانتریفیوژ کوتاه، روغن معدنی به هر یک از لوله‌ها اضافه شد. این واکنش با برنامه‌ای به قرار زیر انجام شد:

۱- ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه (به منظور سنتز cDNA)

۲-۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (غیرفعال کردنRTase)

cDNA های ساخته شده بلافاصله تا زمان استفاده به فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند.

میزان عوامل شرکت کننده در واکنش شامل موارد ذیل می‌باشد:

MgCl2 (50 mM): 0.6 µl, PCR Buffer 10x: 2 µl, dNTPs (10 mM): 0.2 µl, Taq polymerase:1u, Primer R (20 pmol): 1 µl, Primer F (20 pmol): 1 µl, DW: 10 µl, cDNA: 5 µl

این واکنش با دستگاه ترمال سایکلرگرادیانت با برنامه‌ای به قرار زیر انجام شد: ۳۵ سیکل شامل: ۹۵، ۵۳ و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد هرکدام به مدت ۱ دقیقه و به دنبال آن ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد، به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید 1µg/ml در برابر نور UV تصویر برداری به عمل آمد. مارکر مورد استفاده DNA، ۱۰۰ جفت باز (ساخت شرکت سیناژن، ایران) بود.

خالص‌سازی محصولات PCR ویروس‌ها با استفاده از کیت تجارتی خالص‌سازی محصولات PCR (Roche) انجام شد. تعیین توالی نوکلئوتیدهای این محصولات با استفاده از پرایمرهای مذکور توسط شرکت (bioneer) انجام گرفت. آنالیز نوکلئوتیدهای به دست آمده و اسیدهای آمینه مربوط به آن‌ها توسط برنامه نرم‌افزار

www.SID.ir

Archive of SID

(DNASTAR Inc., Madison, USA) ویرایش پنجم صورت گرفت. آنالیز فیلوژنی این سه ویروس به همراه ۲۳ ویروس که بیش‌ترین شباهت را در بانک ژنی داشتند، انجام شد . اطلاعات مربوط به این ویروس‌ها به همراه شماره‌ی دسترسی به آن‌ها در Genbank در جدول ۲ آمده است.

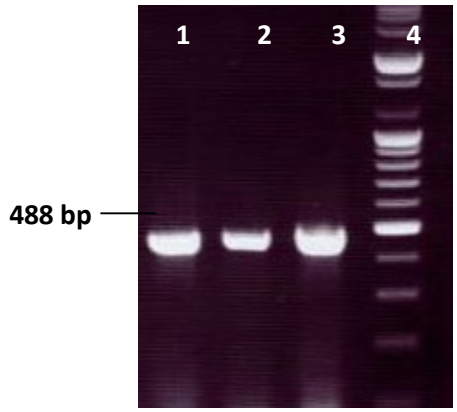
جدول ۲: اطلاعات مربوط به ویروس‌های مورد بررسی قرار گرفته و ویروس‌های استفاده شده

نام اختصار	شماره دسترسی	سویه ویروس
AIa	KP455989.1	A/chicken/Iran/AIa/2013(H9)
AId	KP455991.1	A/chicken/Iran/AId/2013(H9)
AIc	KP455990.1	A/chicken/Iran/AIc/2013(H9)
IN2788	AY435039.1	A/chicken/India/2788/2003(H9N2)
TU2068	JQ952589.1	A/turkey/Tunisia/2068/2010(H9N2)
IRMarkazi	KJ696533.1	A/chicken/Iran/Markazi/2013(H9N2)
TU345	JQ952590.1	A/chicken/Tunisia/345/2011(H9N2)
IR106	JQ419719.1	A/chicken/Iran/106/2009(H9N2)
IR114	JQ419721.1	A/chicken/Iran/114/2009(H9N2)
IR113	JQ419720.1	A/chicken/Iran/113/2009(H9N2)
IR187	KF800939.1	A/chicken/Iran/187/2011(H9N2)
IRAGH-B2	JX294921.1	A/chicken/Iran/AGH-B2/2012(H9N2)
IRN102	JQ970437.1	A/chicken/Iran/N102/2011(H9N2)
IRAGH-B4	JX294923.1	A/chicken/Iran/AGH-B4/2012(H9N2)
IR725	JQ419725.1	A/chicken/Iran/725/1998(H9N2)
IR121	JQ419723.1	A/chicken/Iran/121/2009(H9N2)
IqEKI 14	JX273543.1	/chicken/Iraq/EKI 14/2008(H9N2
IRB11A	EF063734.1	A/chicken/Iran/B11A/2005(H9N2)
IRL248	DQ922904.1	A/chicken/Iran/L248/03(H9N2)
IR20	GQ497133.1	A/chicken/Iran/20/2006(H9N2)
IRB326	EF063735.1	A/chicken/Iran/B326/2005(H9N2)
IRB76	EF063731.1	A/chicken/Iran/B76/2004(H9N2)
IRB99	EF063732.1	A/chicken/Iran/B99/2005(H9N2)
IRTH186	EU477245.1	A/Chicken/Iran/TH186/2007(H9N2)
UAE78	KF188329.1	A/houbara/UnitedArabEmirates/78/2006(H9N2)

نتایج

RT-PCR

محصولات PCR با اندازه‌ی ۴۸۸ جفت باز برای سه ویروس استفاده شده در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد . صحت محصولات PCR فوق با استفاده از اندازه آن‌ها روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد (شکل ۱) و تعیین توالی نوکلئوتیدهای آن‌ها انجام شد . پس از تعیین توالی نوکلئوتیدها، اسید آمینه‌های مربوط به این نوکلئوتیدها توسط نرم افزار DNASTAR تعیین و با تمام ویروس‌های آنفلوانزای طیور H9N2 موجود در بانک ژنی مقایسه شد و تعدادی از ویروس-هایی که در بانک ژنی مورد بررسی قرار گرفتند و شباهت بیش‌تری داشتند در جدول ۲ آورده شده است.



شکل ۱: الکتروفورز ژل آگاروز محصولات PCR سه ویروس آنفلوانزای طیور ایران با اندازه ۴۸۸ جفت باز (ستون‌های ۱ تا ۳) به همراه مارکر ۱۰۰ جفت باز DNA (ستون ۴)

www.SID.ir

Archive of SID

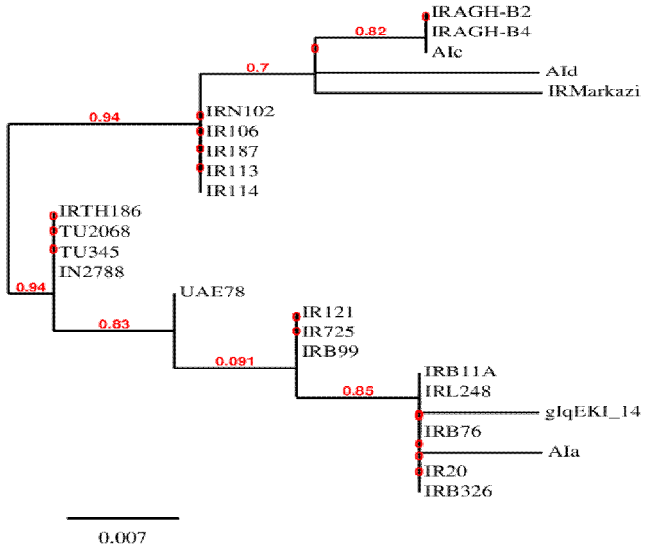
همان گونه که در این جدول مشخص است، برای ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران از سال ۱۳۷۷ الی ۱۳۹۲ حداقل یک نماینده‌ی ویروسی به ازاء هر سال موجود می‌باشد. مقایسه‌ی سه ویروس مورد مطالعه در این بررسی نشان داد، شباهت کاملاً یکسانی بین آن‌ها در سطح اسیدهای آمینه یا نوکلئوتیدها وجود ندارد. تعداد اسیدهای آمینه‌ی جانشین شده در ویروس‌های AIa, AIc و AId در مقایسه با توالی اسید آمینه الگوی اصلی موجود در بانک ژن، به ترتیب ۲، ۴ و ۴ اسید آمینه بود.

در مقایسه با ویروس‌های آنفلوانزای طیور سایر کشورها بیش‌ترین شباهت اسیدهای آمینه ویروس AIa با ویروس‌های آنفلوانزای کشور هند (۹۹ و ۹۷ درصد)، تونس (۹۹ درصد) و میزان شباهت این ویروس با ویروس‌های AIc و AId ۹۶ درصد بود. میزان شباهت ویروس‌های AIc و Aid به یکدیگر ۹۸ درصد بود و اسید آمینه‌های این دو ویروس بیش‌تر به جدایه‌های ایران شباهت داشتند.

در مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی این سه ویروس، ویروس AIa به میزان ۹۰ درصد به ویروس AIc و میزان ۸۹ درصد به ویروس Aid شباهت داشت. میزان شباهت دو ویروس AIc و Aid نیز ۹۷ درصد بود.

آنالیز فیلوژنی

اسیدهای آمینه در سه ویروس مطالعه شده به همراه ۲۳ ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 گزارش شده با استفاده از برنامه‌ی Megaliagn به روش Clustal_W مورد تجزیه و بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این بررسی به صورت درخت فیلوژنی در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲: درخت فیلوژنی بر اساس توالی اسیدهای آمینه پروتئین HA در سه ویروس آنفلوانزای طیور ایران به همراه ۲۳ ویروس آنفلوانزای طیور جدا شده از ماکیان. فاصله‌ی شاخه‌ها معرف میزان تفاوت توالی‌هاست.

ویروس‌های مورد بررسی دوشاخه‌ی عمده را تشکیل داده‌اند در شاخه‌ی اصلی اول، تمامی ویروس‌های آنفلوانزای طیور کشور ایران به همراه ویروس‌های AIc و Aid قرار گرفتند. همان گونه که در تصویر مشاهده می‌گردد ویروس AId بیش‌ترین شباهت را به جدایه‌ی ایرانی با نام اختصاری IRMarkazi داشته و ویروس AIc به همراه دو جدایه‌ی ایرانی دیگر با نام‌های اختصاری IRAGH-B2 و IRAGH-B4 در یک رده هستند. در

www.SID.ir

Archive of SID

شاخه‌ی اصلی دوم، تمامی ویروس‌های آنفلوانزای طیور کشورهای ایران، تونس، هند، امارات و عراق به همراه ویروس AIa قرار گرفتند و در نهایت این ویروس بیش-ترین شباهت را با جدایه‌های ایرانی با نام‌های اختصاری IRB11A, IRL248, gIqEKI_14, IRB76, IR20 و IRB326 نشان داد.

بحث

با ورود ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 به صنعت طیور کشور ما در سال ۱۳۷۷، این صنعت تا کنون متحمل خسارات بسیار سنگینی شده است (Nili and Asasi 2003) . در این مطالعه، شناسایی ملکولی سه ویروس آنفلوانزای طیور جدا شده از گله‌های آلوده با تاریخچه‌ی تلفات مورد بررسی قرار گرفت.

قطعه ۴۸۸ جفت باز حاوی بخش میانی از پروتئین HA برای سه ویروس مذکور به روش RT-PCR تکثیر و تعیین توالی نوکلئوتید آن‌ها صورت پذیرفت. عدم وجود شباهت کامل در سطح اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدها مؤید وجود ۳ ویروس متفاوت بود. این امر حاکی از قدرت جهش و تغییر سریع ژنتیکی ویروس آنفلوانزا است. توالی اسیدهای آمینه‌ی این سه ویروس با توالی اسیدهای آمینه ۲۳ ویروس آنفلوانزای طیور منتشر شده (H9N2) که از ماکیان جدا شده بودند مورد مقایسه‌ی ژنتیکی قرار گرفت. آنالیز فیلوژنی ۴۸۸ جفت باز محصولات گزارش شده از سایر نقاط جهان نشان داد، ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران رابطه‌ی بسیار نزدیکی با یکدیگر داشته و به احتمال فراوان دارای منشاء یکسانند . بیش‌ترین قرابت ژنتیکی این ویروس‌ها به ترتیب با ویروس‌های آنفلوانزای طیور کشور هند، تونس، عراق و امارات متحده‌ی عربی بود. دو دودمان مجزای ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 تعریف شده است : دودمان آمریکای شمالی و دودمان اورآسیایی (Bashashati et al. 2013).

نتایج این مطالعه نشان داد که ویروس‌های آنفلوانزای طیور ایران شبیه ویروس‌های غیر بیماری‌زای H9N2 از دودمان اوراسیایی بوده و تغییرات ژنتیکی در ژن هماگلوتینین موجب به وجود آمدن پاتوتیپ جدید نشده است.

در مقایسه‌ی نوکلئوتیدی ویروس‌های تحت بررسی این مطالعه، میزان تفاوت این قسمت از ژن هماگلوتینین ۳ تا ۱۱ درصد تعیین شد که با نتایج به دست آمده از سایر مطالعات نزدیک است. میزان تغییرپذیری ژن هماگلوتینین در بین تحت تیپ‌های مختلف بین ۲۰ تا ۷۴ درصد و در یک تحت تیپ مشابه ۰ تا ۹ درصد گزارش شده است (Air 1981). سلطانی‌الوار و همکاران در سال ۲۰۱۰ میزان تفاوت ژن HA ویروس‌های H9N2 جدا شده در استان لرستان را ۰/۴ تا ۶/۳ درصد به دست آوردند (Soltanialvar et al. 2010).

همایونی‌مهر و همکاران با بررسی سکانس نوکلئوتیدی ژن HA ویروس‌های H9N2 جدا شده در سال‌های ۲۰۰۲-۱۹۹۸ در ایران، اختلاف بین ۰/۷ تا ۴/۸ درصد را گزارش نمودند (Homayounimehr et al. 2010).

در پژوهشی توسط موسی‌خانی و همکاران، میزان شباهت نوکلئوتیدی هماگلوتنین ۱۲ سویه آنفلوانزا جدا شده از ۱۲ استان مختلف ایران را ۰/۱ تا ۹/۸ درصد مشاهده نموده اختلاف زیاد ویروس‌های مورد مطالعه خویش را در مقایسه با مطالعات مشابه، ناشی از گردش وسیع ویروس‌ها در بین گله‌های طیور دانستند (Moosakhani et al. 2010).

به طور کلی با توجه به وجود تغییرات ژنتیکی سریع این ویروس در طی سال‌های گذشته و وجود پتانسیل زیاد تبدیل این ویروس به یک ویروس بسیار بیماری‌زا در اثر موتاسیون نقطه‌ای، تجدید نظر در سیاست‌های کنترلی این بیماری در کشورمان امری ضروری به نظر می‌رسد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

طرقی، رضا؛ ممیز، رضا و پوربخش، سیدعلی (۱۳۸۲). مقایسه توالی اسیدهای آمینه در محل شکسته شدن پروتئین هماگلوتینین سه ویروس آنفلوانزای طیور (H9N2). پژوهش و سازندگی، شماره ۶۳ ، صفحات ۹۵-۱۰۳.

Air, G.M. (1981). Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America, 12: 7639-43.

Bashashati, M.; Vasfi Marandi, M. and Sabuori, F. (2013). Genetic diversity of early (1998) and recent (2010) avian influenza H9N2 virus strains isolated from poultry in Iran. Archives of Virolgy. 158: 2089-2100.

Fouchier, R.A.M.; Munster, V.; Wallensten, A.; Bestebroer, T.M.; Herfst, S.; Smith, D. et al. (2005). Characterization of a novel influenza A virus heamagglutitin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. Journal of Virology, 79: 2814-2822.

Homayounimehr, A.R.; Dadras, H.; Shoushtari, A. and Pourbakhsh 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 and Production, 42(6): 1291-1297.

Lee, M.S.; Chang, P.C.; Shien, J.H.; Cheng, M.C. and Shien, H.K. (2001). Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. Journal of Virological Methods, 97: 13-22.

Moosakhani, F.; Shoshtari, A.H.; Pourbakhsh, S.A.; Keyvanfar, H. and 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 (2): 870-874.

Nili, H. and Asasi, K. (2003). Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. Avian Diseases, 47: 828-831.

Peiris, M.; Yam, W.C.; Chan, K.H.; Ghose, P. and Shortuidge, K.F. (1999a). Influenza A H9N2: aspects of laboratory diagnosis. Journal of Clinical Microbiology, 37:3426-3427.

Peiris, M.; Yuen, K.Y.; Leung, C.W.; Chan, K.H.; Ip P.L.S.; Lai, W.M. et al. (1999b). Human infection with influenza H9N2. The Lancet, 354: 916-917.

Pourbakhsh, S.A.; Khodashenas, M.; Kianizadeh, M. and Goodarzi, H. (2000). Isolation and identification of avian influenza virus H9N2 Subtype. Archives of Razi Institute, 51: 27-38.

Seifi, S.; Asasi, K. and Mohammadi, A. (2009). A study of co-infection caused by avian influenza (H9 subtype) and infection bronchitis virus in broiler chicken farms showing respiratory signs. Online Journal of Veterinary Research, 13: 53-62.

Soltanialvar, M.; Shoushtari, H.; Bozorgmehrifard, M.; Charkhkar, S. and Eshratabadi, F. (2010). Molecular characterization of hemagglutinin and neuramidase genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commerical broiler chicken in iran. Journal of Biological Sciences, 10(2): 145-150.

Suarez, D.L. (2008). Influenza A Virus. In Swayne, D.E. Avian Influenza, Blackwell Publishing, Ames, Iowa 50014, USA.

Vasfi Marandi, M. and Bozorgmehri Fard, M.H. (2002). Isolation of H9N2 subtype of Avian Influenza Viruses during an outbreak in chickens in Iran. Iranian Biomedical Journal, 6: 13-17.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 12, No. 4, Winter, 2017

Phylogenetic characterization of the partial hemagglutinin protein genes of three avian influenza viruses (H9N2) isolated in Ahvaz broiler flocks during 2011-2013

Boroomand, Z.[1]; Jafari, R.A.[2] and Mayahi, M.[3]

Received: 07.10.2015 Accepted: 27.01.2016

Abstract

Since 1998, Iranian poultry industry has been affected by avian influenza (AI) virus,subtype H9N2. The association of high mortality with these outbreaks in the field raised the specter of a possible new genetic modified AI virus. In this study, three AI viruses (H9N2) isolated from the broiler flocks with high mortality rates were characterized. The 488bp PCR products containing the midle site of hemagglutinin (HA) protein were generated and sequenced to determine molecular characterization of the isolates. Sequence analysis of main region of HAl gene of three isolates showed that isolates were identical at the nucleotide as well as amino acid levels. Phylogenetic analysis of 488 bp nucleotide region of the PCR products revealed that Iranian AI viruses had very close relationship to each other indicating these came from the common source. Moreover, the maximum amino acid sequence similarity of these viruses was observed with AI viruses from India (99 & 97%), Tunisia (99%), respectively. Overall, the results indicate that the current status of Iranian AI viruses resembles to other Eurasian H9N2 viruses and in spite of different nucleotide sequences among the viruses there is no evidence for existence of new AI pathotype.

Key words: Avian influenza virus, Hemagglutinin protein, H9N2, Phylogenetic analysis

1- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Boroomand, Z., E-mail: z.boroomand@scu.ac.ir

www.SID.ir