DOI: 10.22055/IVJ.2022.338594.2460

شناسایی و آنالیز فیلوژنتیک ویروس آنفلوانزا پرندگان تحت تیپ H4N2 جدا شده از اردک‌های بومی در بازارهای فروش پرندگان زنده استان‌های شمالی ایران

علیرضا آبتین[۱]، عبدالحمید شوشتری[۲*]، سیدعلی پوربخش[۳]، محمدحسین فلاح‌مهرآبادی[۴] و هادی پورتقی[۵]

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] دانشیار پژوهشی،بخش بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[۳] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۴] استادیار پژوهشی، بخش بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[۵] استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

دریافت: ۱۴۰۱/۲/۲۱ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۴

چکیده

ویروس آنفلوانزا پرندگان تحت تیپ H4 یکی از شایع‌ترین و مسری‌ترین ویروس‌های آلوده کننده پرندگان آبزی بومی محسوب می‌شوند. اردک‌های بومی یکی از مخازن تحت گونه‌های مختلف ویروس آنفلوانزای پرندگان بوده و می‌توانند در اشاعه این بیماری نقش مهمی داشته باشند. بازارهای فروش پرندگان زنده مکان مناسبی برای انتشار و انتقال ویروس آنفلوانزا در بین پرندگان محسوب می‌شوند. هدف از این مطالعه شناسایی و آنالیز فیلوژنتیک ژن‌های HA و NA ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H4N2، جدا شده از اردک‌های بومی از بازارهای فروش پرندگان زنده استان های شمالی ایران بود. از ۹۶۲ سواب کلواک جمع‌آوری شده از اردک‌های بومی دو جدایه H4N2 شناسایی و ژن HA و NA آن‌ها مورد تعیین توالی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک قرار گرفت. جدایه‌های این مطالعه از نوع ویروس آنفلوانزا با حدت پایین LPAI بودند. آنالیز فیلوژنتیک ژن HA دو جدایه این مطالعه همسانی بالایی (۹۷ درصد) با ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H4N6 جدا شده از اردک‌های بومی در گرجستان را نشان داد. جایگاه کلیواژ ژن HA در هر دو جدایه این مطالعه " PEKASR/ GLF" و درجایگاه ۳۴۸ –۳۳۸ واقع شده بود. ژن NA دو جدایه این مطالعه شباهت (۹۸–۹۵ درصد) با ژن‌های N2 ویروس‌های آنفلوانزا داشت. در این مطالعه ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H4 برای اولین بار از اردک‌های بومی در ایران شناسایی و مورد آنالیز فیلوژنتیک قرار گرفت. با توجه به یافته‌های این مطالعه، پایش مداوم پرندگان عرضه شده در بازارها از نظر ویروس‌های آنفلوانزا به منظور آگاهی و شناسایی ویروس‌های آنفلوانزای در گردش و تغییرات ایجاد شده در ویروس‌ها و اتخاذ تصمیمات پیش‌گیرانه مناسب به خصوص در فصل‌های پرخطر به منظور کنترل بیماری در بازارهای کشور ضروری است.

کلمات کلیدی: ویروس آنفلوانزا پرندگان، تحت تیپ H4N2، اردک‌های بومی، آنالیز فیلوژنتیک، بازار فروش پرندگان زنده

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان یکی از مسری‌ترین و خطرناک‌ترین بیماری‌های ویروسی بوده که از سراسر نقاط دنیا گزارش شده است. عامل این بیماری در جنس آلفا آنفلوانزا ویروس متعلق به خانواده اورتومیکسوویریده قرار دارد

*نویسنده مسئول : عبدالحمید شوشتری، دانشیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
E-mail: a.shoushtari@rvsri.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

(Blagodatski et al, 2021). این ویروس‌ها می‌توانند از سد بین گونه‌ای عبور کرده و سبب انتقال بیماری به پستانداران و انسان شوند (Wu et al, 2015; Yuan et al, 2015). ویروس آنفلوانزای پرندگان از ۸ قطعه ژن مجزا تشکیل شده است که عبارتند از: PB1، PB2، PA، HA، NP، NA، M و NS (Blagodatski et al, 2021; Spackman, 2016). ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A بر اساس واکنش‌های سرمی نسبت به گلیکوپروتئین‌های سطحی هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) به تحت‌تیپ‌های مختلف تقسیم می‌شوند. تا کنون ۱۸ تحت تیپ هماگلوتینین (H1-H18) و ۱۱ تحت تیپ نورآمینیداز (N1-N11) شناسایی شده است. در پرندگان نیز تا به امروز غیر از تحت تیپ‌های H17N10 و H18N11 مابقی گونه‌ها مورد شناسایی و در حال گردش می‌باشند (Spackman, 2016).

پرندگان آبزی و اردک‌ها در خانواده Anatidae و در راسته Anseriformes قرار گرفته‌اند، با توجه به سازش حاصل از مواجهه این پرندگان با ویروس آنفلوانزا طی سال‌های متمادی، این پرندگان را می‌توان به عنوان مخازن ویروس و رمز ماندگاری آن به حساب آورد (Alexander, 2000; Wille and Holmes, 2020). از آن جا که نگهداری و پرورش اردک‌های بومی در شهرهای شمالی کشور مرسوم بوده و با توجه به ارتباط مستمری که این پرندگان با پرندگان وحشی، پرندگان خانگی و حتی پستانداران دارند، می‌توانند نقش مهمی در انتقال و بازآرایی ژنتیکی ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان داشته باشند (Blagodatski et al, 2021). همچنین با توجه به نزدیکی ژنتیکی اردک‌های بومی با اردک‌های وحشی مهاجر، این پرندگان می‌توانند به عنوان الگوهای ایده‌آل جهت بررسی، گسترش عفونت در بین گونه‌های وحشی و شیوع ویروس در بین پرندگان بومی محسوب شوند (Ecosystem et al, 2018; Wille and Holmes, 2020).

ویروس آنفلوانزا پرندگان تحت تیپ H4 یکی از شایع‌ترین ویروس‌های آلوده کننده اردک‌ها محسوب می‌شود و قدرت سرایت آن در بین پرندگان آبزی به خصوص اردک‌ها از شدت بالایی برخوردار است (Ecosystem et al, 2018; Kang et al, 2010). شناسایی این تحت تیپ به دلیل طیف گسترده‌ای از میزبان‌ها شامل جوجه، بوقلمون، طوطی‌سانان، پرندگان ساحلی (Shorebirds)، انسان، خوک و فک‌ها می‌تواند مهم ارزیابی گردد (Gulyaeva et al, 2018; Spackman, 2016). این ویروس برای اولین بار در سال ۱۹۵۶ در چکسلواکی جداسازی و شناسایی شد (Amanat et al, 2019)؛ ولی اخیراً چندین تحت تیپ از این ویروس پس از وقوع بازآرایی با سایر ویروس‌های آنفلوانزا پرندگان در بین اردک‌های بومی و در اکثر کشورهای دنیا شناسایی و در حال چرخش بوده است (Shi et al, 2016; Wille and Holmes, 2020). ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H4N8 در سال ۱۹۷۶ در ایالات متحده امریکا سبب تلفات شدیدی در بین مزارع مرغداری‌های آن کشور شد (Spackman, 2016). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که ویروس H4N8 آنفلوانزای پرندگان، می‌تواند سبب درگیری موش‌های آزمایشگاهی و نیز سبب تلفات در آن‌ها شود (Buia, 2012). دو مطالعه دیگر از چین و کانادا، ابتلا و درگیری خوک‌ها به ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H4 را تأیید و مورد بررسی قرار داده‌اند (Hu et al, 2012; Li and Robertson, 2021). Karasin و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مطالعه‌ای اعلام کردند که ویروس‌های H4N6 از نوع ویروس کم حدت آنفلوانزای پرندگان از خوکی که دارای علایم پنومونی بوده، جدا شده است (Li and Robertson, 2021). ویروس مذکور در دو منطقه ۲۲۶ (Q226L) و ۲۲۸ (G228S) ژن HA خود دچار جا به جایی‌ها و تغییراتی شده که این تغییرات می‌تواند دلایلی مبنی بر سازگاری این تحت تیپ از ویروس‌ها با رسپتور انسانی باشد (Li and Robertson, 2021). در دو مطالعه سرواپیدمیولوژی که در آمریکا و لبنان و با استفاده از آنتی-بادی اختصاصی بر علیه ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H4 انجام شد، در سرم خوک‌ها و سرم افرادی که در مرغداری‌ها

و مزارع پرورش بوقلمون فعالیت داشته‌اند ردپای ویروس آنفلوانزای H4 مشاهده شد (Kayali et al, 2010). همچنین Wong و همکاران در سال ۲۰۱۴ توانستند از بلدرچین یک ویروس آنفلوانزای H4N2 را جداسازی کنند که جایگاه کلیواژ آن به صورت پلی بازیک بود. این خصوصیت پیش از آن فقط در تحت تیپ‌های H5 و H7 آنفلوانزای پرندگان گزارش شده بود.

دریای خزر که بزرگ‌ترین دریاچه جهان محسوب می‌شود، در قسمت شمالی کشور ایران واقع شده است. استان‌های گیلان، مازندران و گلستان، از همسایگان این دریاچه محسوب می‌شوند. سالانه پرندگان مهاجر آبزی فراوانی به این دریاچه و آب‌گیرهای استان مجاور مهاجرت می‌کنند (Hadipour, 2010) که مخزنی ایده‌آل برای نگهداری و انتقال ویروس‌های مختلف آنفلوانزای پرندگان می‌باشند و در میان آن‌ها سه تحت تیپ H5، H7 و H9N2 می‌توانند تهدیدی برای سلامتی عمومی و بهداشت انسانی محسوب شوند (Swayne, 2020). همچنین این پرندگان در این استان‌ها در تماس مستقیم با پرندگان بومی و خانگی قرار گرفته و سبب انتقال ویروس‌های جدید آنفلوانزا و یا بازآرایی ویروس بین تحت تیپ‌های مختلف می‌شوند. از سوی دیگر در این مناطق، بازار فروش پرندگان زنده نیز رونق دارد که می‌توانند محل بالقوه‌ای برای انتشار و انتقال ویروس در بین پرندگان و جانوران مختلف باشد (Fallah Mehrabadi et al, 2019). در مطالعه‌ای که Gulyaeva و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام داده‌اند، مشخص شده است که فک‌های دریای خزر در اثر ارتباط نزدیکی که با اردک‌های وحشی مهاجر داشته‌اند نیز به ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H4 مبتلا شده‌اند.

هدف از این مطالعه شناسایی و تعیین هویت مولکولی ژن‌های HA و NA ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H4N2، جدا شده از اردک‌های بومی از بازارهای فروش پرندگان زنده استان های شمالی ایران بود.

مواد و روش کار

این مطالعه به صورت مقطعی و حدفاصل ماه‌های شهریور و مهر سال ۱۳۹۶ که شروع فصل مهاجرت پرندگان وحشی به کشور می‌باشد، انجام پذیرفت. نمونه‌برداری در این مطالعه از تمامی ۲۴ بازار فروش پرندگان زنده فعال در زمان نمونه‌گیری در استان‌های شمالی کشور(گیلان، مازندران و گلستان) انجام گرفت و در هر بازار حداقل از ۳۰ پرنده نمونه‌برداری شد. در مجموع ۹۶۲ سواب کلواک از اردک‌های بومی حاضر در بازارهای مختلف فروش پرندگان زنده واقع در استان‌های شمالی ایران جمع‌آوری شد (Figure 1). سواب‌ها در ۲ الی ۳/۵ میلی‌لیتر بافر ایزوتونیک فسفات (PBS) استریل و به صورت سوسپانسیون ۱۰ تا ۲۰ درصد (وزنی/حجمی) در محلول آنتی‌بیوتیکی با pH ۷ الی ۷/۴ قرار داده شد(Spackman, E, 2016) تمام نمونه‌ها در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و طی ۲۴ ساعت در کنار یخ خشک به آزمایشگاه تخصصی آنفلوانزای پرندگان در موسسه رازی منتقل شدند.

Figure 1: Geographical map of the swab collection locations of the current study

جداسازی ویروس طبق دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت دام انجام شد((Spackman, 2016). محتویات سوسپانسیون سواب به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و سپس از مایع رویی برای تلقیح داخل کیسه آلانتوئیک در سه تا پنج تخم‌مرغ جنین‌دار عاری از پاتوژن‌های اختصاصی (SPF) ۱۱-۹ روزه، استفاده شد. تخم‌مرغ‌ها در دمای ۳۷ سانتی‌گراد (محدود ۳۹-۳۵ سانتی‌گراد) به مدت ۷-۲ روز انکوبه شدند. نوربینی روزانه ۲ بار انجام گرفت. جنین‌های تلف شده به محض تشخیص و سایر تخم مرغ‌ها در پایان روز ۷ به یخچال منتقل شدند. تلفات ۲۴ ساعت نخست مکانیکی تلقی و مایع آلانتوئیک (Allantoic Fluid / AF) مابقی تخم‌مرغ‌ها که در تست هماگلوتیناسیون (HA) مثبت بودند، جمع‌آوری شد (Spackman and Killian, 2020).

موارد AF دارای نتیجه مثبت در آزمایش مانعت از هماگلوتیناسیون (HI) برای تشخیص عدم حضور ویروس نیوکاسل بررسی شدند. جدایه‌های آنفلوانزا پرندگان با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی در مقابل آنتی‌ژن‌های H1 تا H16 و N1 تا N9 توسط تست‌های مهارکننده HA و NA تعیین شدند، هر دو آزمون (HI و NI) دو بار تکرار شدند (Abtin, 2021; Spakman, 2016).

برای استخراج RNA ویروس از مایع آلانتوییک از کیت High pure viral Nucleic Acid شرکت Roche آلمان استفاده شد. در این مطالعه آزمون RT-PCR تک مرحله‌ای با استفاده از کیت Titan one step tube RT- PCR system شرکت Roche آلمان به منظور تکثیر هر قطعه ژن ویروسی انجام شد. ابتدا یک واکنش و با استفاده از یک جفت پرایمرهای اختصاصی ژن M به منظور تشخیص آلفاآنفلوانزاویروس انجام شد. سپس با استفاده از پرایمرهای هافمن، کل قطعات ژن HA و NA تکثیر و محصولات RT-PCR روی ژل آگارز یک درصد در کنار نردبان ۱۰۰ جفت بازی، الکتروفورز شدند (Hoffmann et al, 2001). مشخصات پرایمرهایی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، در Table 1 ذکر شده است. باندها با اندازه‌های مناسب تحت نور UV مشاهده شده و طبق دستورالعمل کیت High Pure PCR Product Purification شرکت Roche آلمان خالص‌سازی شدند. ارزیابی خلوص محصولات نهایی با استفاده از اسپکتروفتومتر Nanodrop قبل از انتقال و ارسال آن‌ها به منظور تعیین توالی شرکت بایونیر کره جنوبی نیز انجام گردید.

Table 1: The primers sequences used for RT-PCR amplification of M, HA and NA genes of AIV

Primer	Primer sequnces	PCR Product(bp)
Matrix-F	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG	1027
Matrix-R	ATATCGTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT	
HA-F	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTA	1778
HA-R	ATATCGTCTCGTATTAGAAACAAGGGTGTTTT	
NA-F	TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT	1413
	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT	

Figure 3- Analysis of the specific RT-PCR for detection of M gene. Lane 1: Positive control of M gene AIV (1027 bp band). Lane 2: Marker (100bp DNA ladder). Lane 3-7 were the AIV isolates of this study and lane 8: Negative control.

Figure 4. Neuraminidase-Inhibition assay(NI). From right to left, Tube1: N8 Antiserum, Tube2: N6 Antiserum, Tube3: N8 Antiserum, Tube 4: N6 Antiserum, Tube 5: N1 Antiserum

مجموعه داده‌های به دست آمده در این مطالعه با استفاده از پایگاه‌های داده‌ای NCBI و GISAID مورد مقایسه و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با استفاده از BLAST توالی‌های مشابه به ژن‌های مورد مطالعه HA و NA از بانک ژنی استخراج شد. در این مطالعه از نرم‌افزار MEGA 7. 0 برای مرتب کردن توالی‌های نوکلئوتیدی و ترجمه آن‌ها در توالی اسیدهای آمینه و رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش maximum likelihood با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap استفاده گردید (Kumar et al, 2018). جایگاه‌های بالقوه گلیکوزیلاسیون پروتئین NA با استفاده از سرور NetNGlyc 1.0 تعیین گردید (http: //www. cbs. dtu. dk/services/NetNGlyc).

نتایج

ویروس‌های شناسایی شده در این مطالعه

در این مطالعه از ۹۶۲ نمونه سواب کلواک که از اردک-های بومی موجود در بازارهای فروش پرندگان زنده استان‌های شمالی ایران جمع‌آوری شده بودند، ۵ نمونه با استفاده از روش هماگلوتیناسیون و همچنین آزمون RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن M به عنوان ویروس آنفلوانزا شناسایی (Figure 2) و با استفاده از دو آزمون HI و NI دو جدایه از میان آن‌ها (Figure 3) به عنوان تحت تیپ H4 تشخیص داده شد (Abtin, 2021).

شباهت نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ویروس‌های مورد مطالعه

نتایج حاصل از BLAST ژن HA دو جدایه این مطالعه در پایگاه‌های داده‌ای NCBI و GISAID بیانگر شباهت نزدیک (حدود ۹۷ درصد) آن‌ها با ویروس‌های آنفلوانزا تحت تیپ H4 موجود در آن دو بانک ژن بود. آنالیز مشابهی برای ژن NA نیز انجام شد، نتایج حاصل از BLAST ژن NA بیش‌ترین همسانی (حدود ۹۶ درصد) را با انواع تحت گونه‌های آنفلوانزا مشتق شده از پرندگان آبزی شامل H6N2، H4N2، H9N2، H1N2 و حتی H5N2 نشان داد که بیانگر متعلق بودن ژن NA جدایه‌های این مطالعه به تحت گونه N2 می‌باشد.

آنالیز فیلوژنتیک ژن‌های HA و NA

نتایج آنالیز فیلوژنتیک ژن HA این مطالعه نشان داد که دو جدایه این مطالعه در شاخه ویروس‌های آنفلوانزا تحت تیپ H4 واقع شده‌اند. جدایه‌های H4 این مطالعه در شاخه پرندگان آبزی بوده و از ویروس‌های آنفلوانزای تحت تیپ H4 جدا شده از خوک، بوقلمون و بلدرچین متمایز است. همچنین این جدایه‌ها در دودمان اروپایی- آسیایی قرار گرفته و ویروس‌های واقع در دودمان آمریکایی با اختلاف در شاخه دیگری واقع شده‌اند. ژن HA این جدایه‌ها با ویروس A/Domestic duck/Gerogia/2016(H4N6) قرابت نزدیکی دارد، همچنین شباهت بالایی (۹۹-۹۶ درصد) با ویروس‌های H4 جدا شده از فک‌ها در روسیه به نام A/Caspian Seal/Russia/2002(H4N6) نیز مشاهده می‌شود (Figure 4).

نتایج آنالیز فیلوژنتیک ژن NA در این مطالعه نشان داد، دو جدایه این مطالعه در گروه ویروس‌های آنفلوانزا تحت تیپ N2 واقع شده است. جدایه‌های N2 در این مطالعه متعلق به دودمان اروپایی- آسیایی و پرندگان بودند. همچنین ژن‌های N2 قرابت نزدیکی با ویروس A/Anser fabalis/China/Anhui/2014(H6N2) دارند (Figure 5) و با ویروس A/Wild bird/Anhui/2014(H9N2) در یک خوشه قرار گرفته که بیانگر قرابت نزدیک این جدایه‌ها با آن تحت تیپ ویروس آنفلوانزا می‌باشد. علاوه بر این میزان شباهت ژن NA ویروس‌های مورد مطالعه با ویروس‌های H5N2 جدا شده از جوجه در فرانسه ۹۶ درصد و با ویروس‌های H3N2 جدا شده از انسان در ایالات متحده آمریکا ۸۲ درصد بوده و با توجه به این که تحت تیپ‌های H5N2 و H3N2 در خوشه‌های دیگری واقع شده‌اند، اختلاف جدایه‌های این مطالعه با آن تحت تیپ ویروس‌ها مشهود می‌باشد.

خصوصیات ژنتیکی HA و NA تحت تیپ H4N2

نتایج آنالیز پروتئین‌ها در این مطالعه نشان می‌دهد که سکانس (PEKASR/GLF) در جایگاه کلیواژ بین پروتئین هماگلوتینین HA1 و HA2 در هر دو جدایه H4 به دست آمد. علاوه بر این N-گلیکوزیلاسیون سایت‌های هر دو جدایه در موقعیت‌های ۱۸، ۳۴، ۱۷۸، ۳۱۰ و ۴۹۷ واقع شده‌اند. همچنین دو اسید آمینه V226 و P228 در محل اتصال به گیرنده مورد شناسایی قرار گرفت (Table 3). هیچ گونه حذفی در ساقه NA در ویروس‌های مورد مطالعه مشاهده نشد.

ثبت در بانک ژنی

ژن‌های HA و NA هر دو جدایه H4 توالی‌یابی شده و در GenBank نیز ثبت گردیده است. شماره‌های ورودی در بانک ژن در Table 2 قابل مشاهده است.

Table 2: Information of the Iranian avian influenza viruses of the current study

Isolate	Bird	Province	Date	Segment	Accession
A/Iran/ Domestic duck 282	Domestic duck	Mazandran	2017/8/30	HA	MZ453091
				NA	MZ453104
A/Iran/ Domestic duck 341	Domestic duck	Mazandran	2017/8/9	HA	MZ453105
				NA	MZ453107

Table 3: Comparison of HA segment amino acids between 282 and 341 strains

Isolate	226	228	337(Cleavage Site)
A/Iran/Domestic duck 282	V	P	PEKASR
A/Iran/ Domestic duck 341	V	P	PEKASR

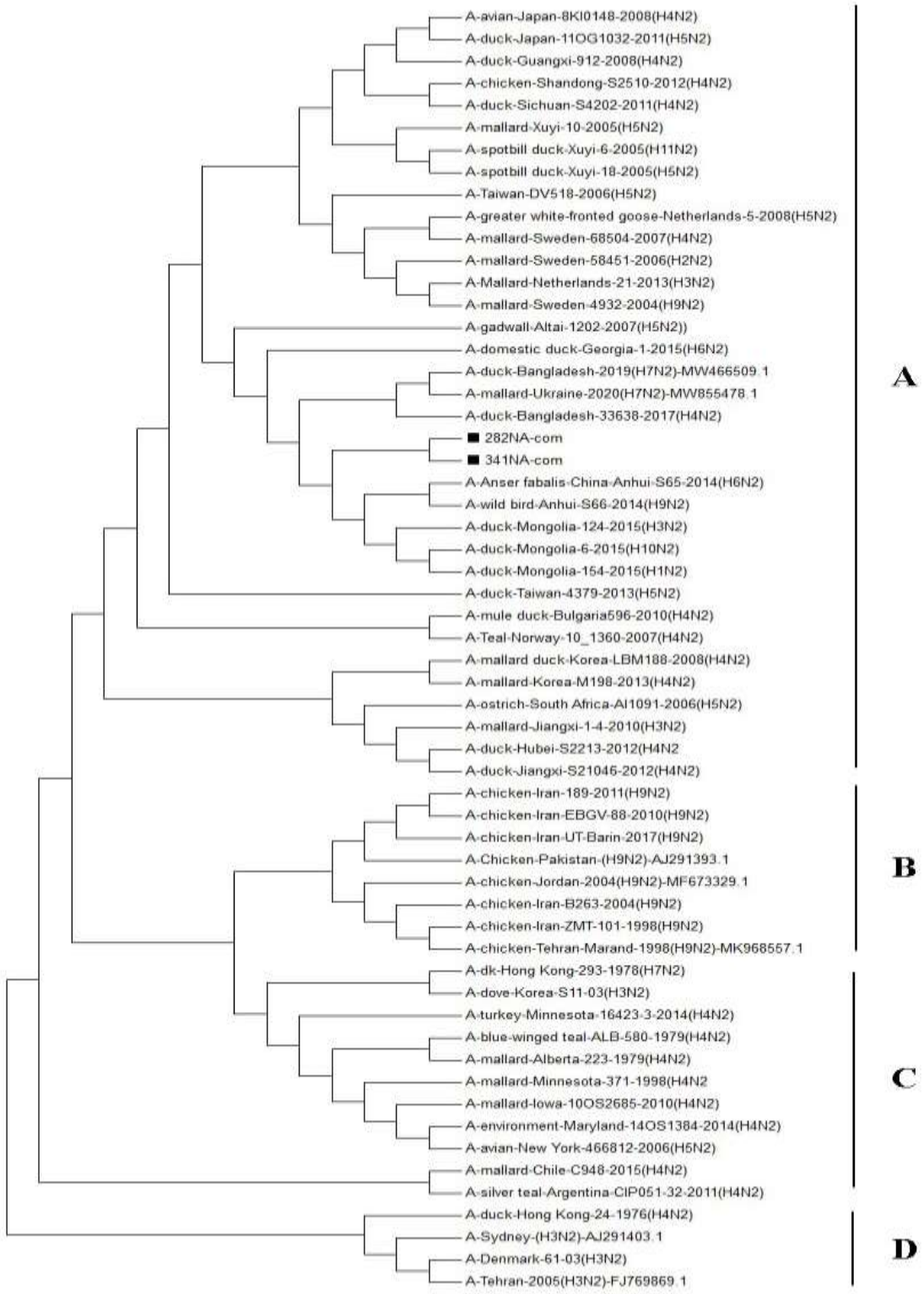

Figure 4. Nucleotide distance of segment 4, HA, of the isolates of the current study with those isolated from several other vertebrates.

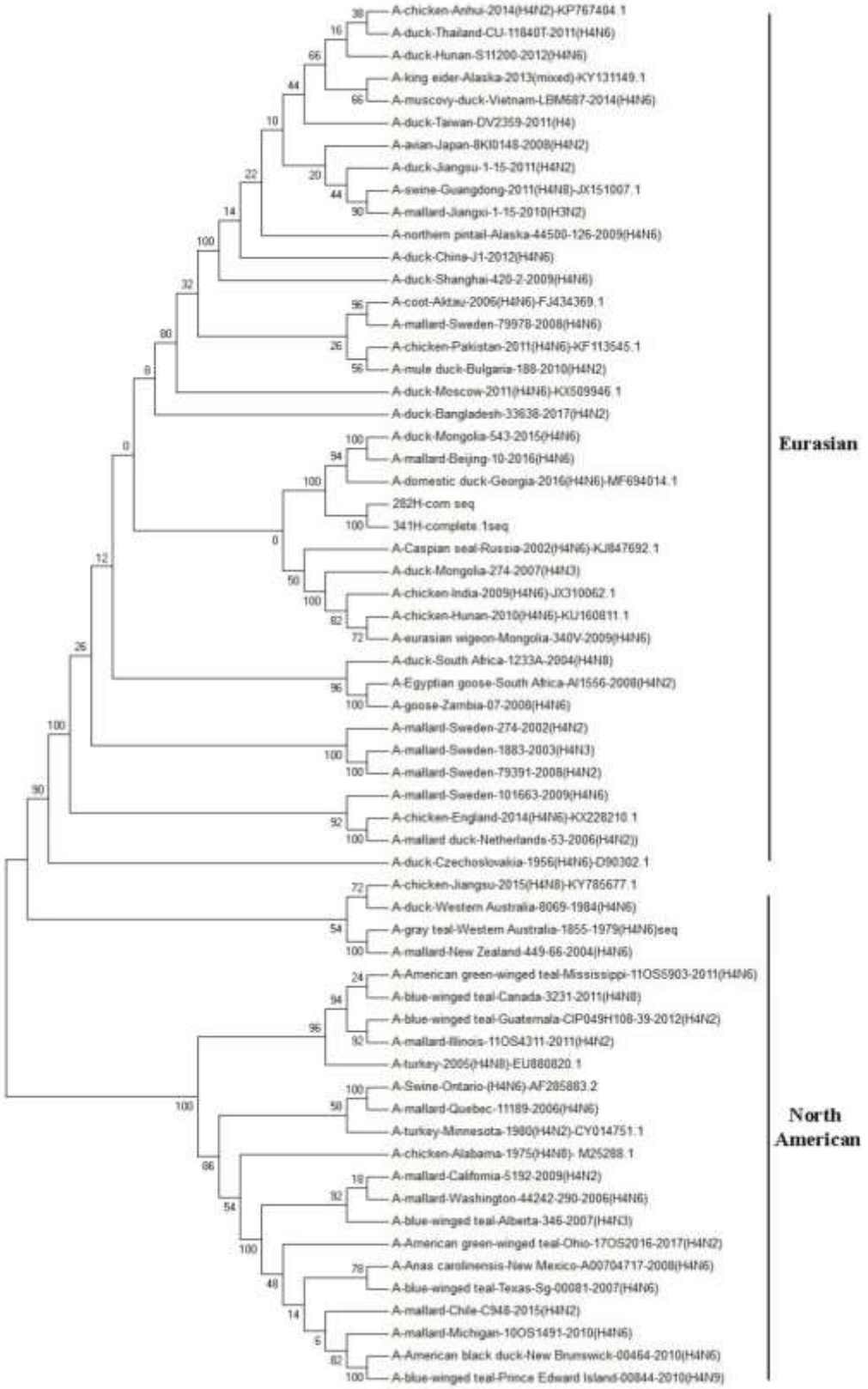

Figure 5. Nucleotide sequence of segment 6, NA, of the isolates of the current study with those isolated from several other vertebrates

بحث

انواع مختلفی از تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا وجود دارد که ممکن است ماکیان و پرندگان آبزی را آلوده کنند و تحت تیپ H4 یکی از آن‌ها است که می‌تواند میزبان‌های مختلفی از جمله پرندگان و پستانداران را آلوده کرده، در آن‌ها سازگاری پیدا کند. در ایران مطالعات متعددی در مورد ویروس‌های آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 و H5Nx انجام شده است (Hadipour, 2010; Mehrabadi et al, 2018)، اما اطلاعات کمی در مورد وضعیت و گردش سایر ویروس‌های آنفلوانزا در پرندگان بومی و وحشی وجود دارد. این نخستین مطالعه به منظور ردیابی و تعیین هویت مولکولی ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H4N2 از اردک‌های بومی در ایران بود.

ویروس‌های آنفلوانزای تحت تیپ H4 دارای ویژگی‌های ژنتیکی و آنتی‌ژنی متنوعی در بین میزبان‌های مختلف هستند. همچنین از آن جا که چندین گونه مختلف حیوانات و پرندگان به صورت زنده در بازارهای فروش پرندگان زنده حضور دارند، انتقال بین گونه‌ای ویروس آنفلوانزا بسیار محتمل خواهد بود؛ لذا پایش سالیانه این محل‌ها برای شناسایی و ردیابی تغییرات احتمالی ویروس می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ژن HA نشان داد که جدایه‌های این مطالعه متعلق به دودمان اروپایی-آسیایی هستند و در درخت فیلوژنی در شاخه پرندگان آبزی قرار گرفته، قرابتی با ویروس‌هایی با منشاء خوک و بوقلمون‌ها ندارند. همچنین نتایج آنالیز آمینواسیدی در این مطالعه سکانس "PEKASR/ GLF" در جایگاه کلیواژ پروتئین هماگلوتینین HA1 و HA2 در هر دو جدایه H4 را نشان داد که بیان‌گر کم حدت بودن این جدایه‌ها می‌باشد. دو اسید آمینه Q226 و T228 در محل اتصال به گیرنده در هر دو جدایه شناسایی شدند که نشان داد جدایه‌های این مطالعه برای ورود به سلول میزبان خود به گیرنده‌های اسید سیالیک آلفا ۲، ۳ متصل شده که بیشتر سلول‌های اپیتلیال روده پرندگان دارای این نوع گیرنده‌ها می‌باشند (Table 3). Karasin و همکاران در سال ۲۰۰۰ تغییراتی را در یکی از ویروس‌های آنفلوانزا پرندگان تحت تیپ H4N6 جدا شده از خوک در اسید آمینه‌های موقعیت ۲۲۴ و ۲۲۶ واقع در محل اتصال به گیرنده ردیابی کرده و اعلام کردند که این تغییرات سبب افزایش تمایل ویروس جهت اتصال به گیرنده‌های اسید سیالیک آلفا ۲، ۶ می‌گردد. با توجه به درخت فیلوژنتیک ژن HA، جدایه‌های این مطالعه با ویروس‌های آنفلوانزا تحت‌تیپ H4 جدا شده از اردک‌های بومی کشور گرجستان و اردک‌های مهاجر در مغولستان و چین مشابهت دارد و به نظر می‌رسد آلودگی اردک‌های بومی این مطالعه و ویروس جدا شده در گرجستان در نتیجه جا به جایی پرندگان آبزی مهاجر از آسیای شرقی به سمت دریای خزر و اروپا بوده باشد. از سوی دیگر جدایه‌های این مطالعه با ویروس‌های آنفلوانزا تحت تیپ H4 جدا شده از فوک‌های دریای خزر در روسیه دارای قرابت نزدیکی بوده، در یک خوشه قرار گرفته‌اند. در این مورد انتقال مستقیم از پرندگان وحشی به این جمعیت پستانداران دریایی محتمل‌ترین راه انتقال محسوب می‌شود (Figure 4). از آن جا که این پستانداران در طول دریای خزر مهاجرت می‌کنند، می‌توانند آلودگی را به مناطق مختلف آن انتقال دهند. بعضی شواهد حاکی از امکان تغییر اسید آمینه‌های ۲۲۶ و ۲۲۸ در این پستانداران بوده، مانند خوک احتمال افزایش تمایل ویروس جهت اتصال به گیرنده‌های اسید سیالیک آلفا ۲ و ۶ در این پستانداران وجود دارد (Fereidouni et al, 2014). در مطالعات متعددی از بلدرچین‌ها به دلیل داشتن هر دو رسپتور آلفا ۲ و ۶ و رسپتور الفا ۲ و ۳ به عنوان میزبانی مهم در اشاعه و گسترش ویروس آنفلوانزا، نام برده شده است. این پرنده می‌تواند به صورت یک میزبان واسط عمل کرده، ویروس را پس از تکثیر، به یک گونه جانوری دیگر منتقل کند. Kang و همکاران در سال ۲۰۱۳ در یک مطالعه تجربی اعلام کردند

بلدرچین‌های آلوده شده توسط ویروس آنفلوانزا تحت‌تیپ H4 در حدفاصل بین پنج تا هفت روز پس از آلوده‌سازی به شدت ویروس را از خود دفع کرده، سبب اشاعه ویروس شدند. بنابراین لازم است در یک مطالعه تجربی رفتار ویروس‌های جدا شده در این مطالعه در بلدرچین مورد بررسی قرار گیرد.

در آنالیز فیلوژنی ژن HA ویروس‌های آنفلوانزا تحت تیپ H4 جدا شده در این مطالعه، ارتباط نزدیکی بین ویروس‌های جدا شده از اردک‌های بومی ایران با ویروس‌های آنفلوانزا تحت تیپ H4N6 جدا شده از جوجه در هند و چین وجود داشت. از آن جا که Siddique و همکاران در سال ۲۰۱۲ توانستند ویروس آنفلوانزا پرندگان تحت تیپ H4N6 را از جوجه‌هایی در بازار فروش پرندگان زنده در پاکستان جدا کنند، احتمال آلوده شدن ماکیان ایران به آنفلوانزا تحت تیپ H4N2 نیز وجود دارد و با توجه به حضور ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 به صورت اندمیک در کشور و قابلیت بازآرایی این ویروس، احتمال ایجاد یک ویروس جدید با قابلیت متفاوت در کشور امکان‌پذیر خواهد بود. به همین دلیل توصیه می‌شود پایشی جهت شناسایی احتمالی ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H4N2 در بین ماکیان کشور صورت گیرد.

Donis و همکاران در سال ۱۹۸۹ در مطالعه‌ای اعلام کردند، قرابت نزدیکی بین دو تحت تیپ H3 و H4 ویروس آنفلوانزا پرندگان وجود دارد. در مطالعه پیش رو، قرابت ژنی تحت تیپ‌های H4 و H3 مشاهده می‌شود و بین دو نمونه (A/mallard/Jiangxi-1-15/2010(H3N2) و A/swine/Guangdong/2011(H4N8) ارتباط بسیار نزدیکی وجود دارد. همچنین میزان قرابت بین ویروس‌های این مطالعه با ویروس A/mallard/Jiangxi-1-15/2010(H3N2) در حدود ۹۶ درصد بود.

پروتئین N2 را شاید بتوان به عنوان غالب‌ترین پروتئین NA در ترکیب با سایر پروتئین‌های HA در کشور ایران بر شمرد؛ چرا که ویروس آنقلوانزا تحت تیپ H9N2 در کشور به عنوان یک سویه اندمیک مطرح بوده، همچنین گزارشات متعددی از شناسایی ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H5N2 در کشور وجود دارد (Hadipour, 2010). از سوی دیگر در ایران ویروس H3N2 به عنوان یک تحت تیپ مهم ویروس آنفلوانزا در ایجاد عفونت فصلی و همه‌گیری در انسان محسوب می‌شوند (Abtin, 2021). با این حال نتایج این مطالعه نه تنها اختلاف زیادی بین ژن NA این مطالعه با ویروس‌های آنفلوانزای رایج در کشور را نشان داد (Figure 5)؛ بلکه حکایت از ارتباط نزدیک میان ژن NA این مطالعه با دو تحت تیپ مختلف ویروس آنفلوانزا در چین داشت که متعلق به دودمان اروپایی –آسیایی است. همچنین قرابت نزدیکی با دو جدایه H10N2 و H1N2 از کشور مغولستان مشاهده شد که شاید بیان‌گر تبادل ژنی بین پروتئین‌های NA ویروس‌های جدا شده از اردک بومی این مطالعه با اردک‌های وحشی مهاجر از مغولستان به سمت چین و یا بالعکس باشد (Figure 5). علاوه بر این، مطالعه پیش‌رو، اختلاف زیادی بین جدایه‌های اولیه H4 و ویروس‌های اخیر را نشان داد، به طوری که نمونه A/duck/Hong Kong-24/1976(H4N2) که یکی از اولین جدایه‌های تحت تیپ H4 محسوب می‌شود در درخت فیلوژنیک این مطالعه قرابت بالایی با ویروس‌های آنفلوانزا تحت تیپ‌های H3N2 انسانی داشت؛ ولی با سایر ویروس‌های تحت تیپ H4، از اختلاف زیادی برخوردار بود. به علاوه هیچ یک از اسیدهای آمینه مربوط به ساقه پروتئین NA حذف نشده بودند و این موضوع نشان از سازگاری جدایه‌های این مطالعه در طیور غیر مهاجر داشت (Kang et al, 2013).

تا به امروز مطالعات زیادی در مورد شناسایی و تجزیه و تحلیل جدایه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا در کشور صورت گرفته است؛ ولی این مطالعه برای اولین بار توانسته است ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H4 را در کشور را ردیابی و تعیین هویت کند. در بررسی Fereidouni و همکاران در سال ۲۰۱۰، گونه‌های مختلفی از ویروس آنفلوانزا را از بین پرندگان آبزی مهاجر در دریای خزر مورد شناسایی قرار گرفت؛ ولی تحت تیپ H4 در بین موارد شناسایی شده

توسط آن‌ها گزارش نشد. لذا با توجه به قابلیت بازآرایی ژنی ویروس آنفلوانزا و از سوی دیگر نگهداری و پرورش این پرندگان آبزی بومی با دیگر پرندگان خانگی و همچنین ارتباط آن‌ها با پرندگان وحشی در استان‌های شمالی ایران، این امکان وجود دارد که یک بازآرایی ژنی رخ دهد و کشور با گونه‌های جدیدی از ویروس‌های آنفلوانزا مواجه گردد. از سوی دیگر با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و احتمال ابتلای ماکیان به این تحت تیپ ویروس آنفلوانزا و وقوع اپیدمی ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H4 در مرغداری‌های ایالت Alabama آمریکا در سال ۱۹۷۵، این امکان وجود دارد که مزارع پرورش طیور کشور نیز با این تحت تیپ آلوده شده و صنعت طیور کشور را با چالش جدید و امکان وقوع یک اپدیمی بیماری آنفلوانزا مواجه سازد. هر چند به نظر می‌رسد واکسیناسیون مرغداری‌ها با سویه‌های آنفلوانزا رایج در کشور می‌تواند در جلوگیری از اشاعه ویروس مناسب باشد ولی اکثر محقیقین بر این باور هستند که پایش‌های سالیانه و شناسایی زود هنگام تحت تیپ‌های جدید ویروس‌های آنفوانزا و در نتیجه اقدامات سریع جهت مراقبت و محافظت طیور صنعتی و بومی می‌تواند نقش مهم‌تری در شیوع و گسترش ویروس آنفلوانزا داشته باشد. همچنین مطالعات متعددی وجود دارد که بروز عفونت ویروس آنفلوانزا پرندگان تحت تیپ H4 را در انسان‌هایی که با جوجه‌ها و یا در مزارع بوقلمون کار می‌کنند، گزارش داده است (Kayali et al, 2010; Shi et al, 2016) که نتایج مطالعه مذکور می‌تواند زنگ خطری برای احتمال ابتلا انسان‌ها به این تحت تیپ ویروس آنفلوانزا بوده و سبب وقوع یک اپیدمی جدید از ویروس آنفلوانزا در آینده‌ای نزدیک شود.

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که بازارهای فروش پرندگان زنده می‌توانند نقش مهمی در بروز، شیوع و گسترش ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در کشور داشته باشند؛ بنابراین پایش‌های مداوم، منظم و دقیق در این مناطق و به صورت سالانه توصیه می‌شود. همچنین پیشنهاد می‌شود در مطالعه دیگری با تعیین توالی سایر ژن‌های داخلی دو جدایه به دست آمده در این مطالعه به بررسی دقیق تر این ویروس‌ها، خاستگاه و سیر تکاملی آن‌ها پرداخته شود. علاوه بر این، می‌توان در یک مطالعه تجربی، خاصیت بیماری‌زایی و اثرات احتمالی این ویروس‌ها را در سایر پرندگان و همچنین پستانداران بررسی و مورد ارزیابی قرار داد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسنده از اعضای محترم هیات علمی و کارمندان محترم بخش بیماری‌های طیور مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به دلیل همکاری در انجام این مطالعه تشکر و قدردانی فراوان می‌نماید.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان مقاله اعالم می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش در قالب پایان‌نامه دکتری تخصصی توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی واحد کرج تأمین گردیده است.

منابع

Abtin, A, et al 2021. (2021). *Two Novel Avian Influenza Virus Subtypes Isolated from Domestic Ducks in North of Iran*. https://doi.org/10.22092/ari.2021.353411.1603

Alexander, D. J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, *74*(1–2), 3–13. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00160-7

Amanat, F., Meade, P., Strohmeier, S., & Krammer, F. (2019). Cross-reactive antibodies binding to H4 hemagglutinin protect against a lethal H4N6 influenza virus challenge in the mouse model. *Emerging Microbes and Infections*, *8*(1), 155–168. https://doi.org/10.1080/22221751.2018.1564369

Blagodatski, A., Trutneva, K., Glazova, O., Mityaeva, O., Shevkova, L., Kegeles, E., Onyanov, N., Fede, K., Maznina, A., Khavina, E., Yeo, S. J., Park, H., & Volchkov, P. (2021). Avian influenza in wild birds and poultry: Dissemination pathways, monitoring methods, and virus ecology. *Pathogens*, *10*(5), 1–23. https://doi.org/10.3390/pathogens10050630

Buia, et al. (2012). H4N8 subtype avian influenza virus isolated from shorebirds contains a unique PB1 gene and causes severe respiratory disease in mic. *Virology.*, *423*(1), 77–88. https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.11.019.H4N8

Ecosystem, M., Venkatesh, D., Poen, M. J., Bestebroer, T. M., Scheuer, R. D., Vuong, O., Chkhaidze, M., Ransier, A., Stockwell, T. B., Wentworth, D. E., Kriti, D., Dutta, J., Bakel, H. Van, & Puranik, A. (2018). crossm Avian Influenza Viruses in Wild Birds : Virus Evolution in a. *Journal of Virology*, *92*(15), e00433-18.

Fallah Mehrabadi, M,M., Shoushtari, A., Tehrani, F., Motamed, N., Haerian, B., Ghalyanchilangeroudi, A., Ghafouri, S.A., Amirhajloo, S. (2019). Serological and Molecular Survey of Avian Influenza H9N2 Subtype in Live Birds Markets-2016. *Journal of veterinary science. 75*(4), 399-406.

Fereidouni, S., Munoz, O., Von Dobschuetz, S., & De Nardi, M. (2014). Influenza virus infection of marine mammals. *EcoHealth*, *13*(1), 161–170. https://doi.org/10.1007/s10393-014-0968-1

Gulyaeva, M., Sobolev, I., Sharshov, K., Kurskaya, O., Alekseev, A., Shestopalova, L., Kovner, A., Bi, Y., Shi, W., Shchelkanov, M., & Shestopalov, A. (2018). Characterization of Avian-like Influenza A (H4N6) Virus Isolated from Caspian Seal in 2012. *Virologica Sinica*, *33*(5), 449–452. https://doi.org/10.1007/s12250-018-0053-y

Hadipour, M. M. (2010). Seroprevalence survey of H9n2 avian influenza virus in backyard chickens around the caspian sea in Iran. *Revista Brasileira de Ciencia Avicola*, *12*(1), 53–55. https://doi.org/10.1590/S1516-635X2010000100008

Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G., & Perez, D. R. (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, *146*(12), 2275–2289. https://doi.org/10.1007/s007050170002

Hu, Y., Liu, X., Li, S., Guo, X., Yang, Y., & Jin, M. (2012). Complete Genome Sequence of a Novel H4N1 Influenza Virus Isolated from a Pig in Central China. *Journal of Virology*, *86*(24), 13879–13879. https://doi.org/10.1128/jvi.02726-12

Kang, H. M., Choi, J. G., Kim, K. Il, Park, H. Y., Park, C. K., & Lee, Y. J. (2013). Genetic and antigenic characteristics of H4 subtype avian influenza viruses in Korea and their pathogenicity in quails, domestic ducks and mice. *Journal of General Virology*, *94*(PART11), 30–39. https://doi.org/10.1099/vir.0.046581-0

Kang, H. M., Jeong, O. M., Kim, M. C., Kwon, J. S., Paek, M. R., Choi, J. G., Lee, E. K., Kim, Y. J., Kwon, J. H., & Lee, Y. J. (2010). Surveillance of avian influenza virus in wild bird fecal samples from south korea, 2003-2008. *Journal of Wildlife Diseases*, *46*(3), 878–888. https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.3.878

Kayali, G., Ortiz, E. J., Chorazy, M. L., & Gray, G. C. (2010). Evidence of previous avian influenza infection among US Turkey workers. *Zoonoses and Public Health*, *57*(4), 265–272. https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01231.x

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

Li, Y., & Robertson, I. (2021). The epidemiology of swine influenza. *Animal Diseases*, *1*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s44149-021-00024-6

Mehrabadi, M. H. F., Bahonar, A., Mirzaei, K., Molouki, A., Ghalyanchilangeroudi, A., Ghafouri, S. A., Tehrani, F., & Lim, S. H. E. (2018). Prevalence of avian influenza (H9N2) in commercial quail, partridge, and turkey farms in Iran, 2014–2015. *Tropical Animal Health and Production*, *50*(3), 677–682. https://doi.org/10.1007/s11250-017-1438-x

Shi, Y., Cui, H., Wang, J., Chi, Q., Li, X., Teng, Q., Chen, H., Yang, J., Liu, Q., & Li, Z. (2016). Characterizations of H4 avian influenza viruses isolated from ducks in live poultry markets and farm in Shanghai. *Scientific Reports*, *6*(November), 1–11. https://doi.org/10.1038/srep37843

Spackman, E. (Ed.). (2016). *Animal Influenza Virus* (Third). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8

Spackman, E., & Killian, M. L. (2020). Avian influenza virus isolation, propagation, and titration in embryonated chicken eggs. *Methods in Molecular Biology*, *2123*, 149–164. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8_12

Swayne, D. (2020). *Diseases of Poultry, 14th Edition* (D. E. Swayne, M. Boulianne, C. M. Logue, L. R. McDougald, V. Nair, D. L. Suarez, S. de Wit, T. Grimes, D. Johnson, M. Kromm, T. Y. Prajitno, I. Rubinoff, & G. Zavala, Eds.; 14th ed.). Wiley. https://doi.org/10.1002/9781119371199

Wille, M., & Holmes, E. C. (2020). The ecology and evolution of influenza viruses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *10*(7), 1–19. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038489

Wong, S. S., Yoon, S. W., Zanin, M., Song, M. S., Oshansky, C., Zaraket, H., Sonnberg, S., Rubrum, A., Seiler, P., Ferguson, A., Krauss, S., Cardona, C., Webby, R. J., & Crossley, B. (2014). Characterization of an H4N2 influenza virus from Quails with a multibasic motif in the hemagglutinin cleavage site. *Virology*, *468–470*(August 2012), 72–80. https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.048

Wu, H., Peng, X., Peng, X., Cheng, L., Lu, X., Jin, C., Xie, T., Yao, H., & Wu, N. (2015). Genetic characterization of natural reassortant H4 subtype avian influenza viruses isolated from domestic ducks in Zhejiang province in China from 2013 to 2014. *Virus Genes*, *51*(3), 347–355. https://doi.org/10.1007/s11262-015-1245-2

Yuan, X. yuan, Wang, Y. ling, Yu, K. X., Zhang, Y. xia, Xu, H. ying, Yang, J. xing, Li, F., & Song, M. xun. (2015). Isolation and genetic characterization of avian influenza virus H4N6 from ducks in China. *Archives of Virology*, *160*(1), 55–59. https://doi.org/10.1007/s00705-014-2229-6

Received: 11.05.2022
Accepted: 26.09.2022

Vol. 19, No. 4, Winter, 2024 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2022.338594.2460

Detection and phylogenetic analysis of H4N2 avian influenza viruses isolated from domestic waterfowl at live poultry markets in north provinces of Iran

Alireza Abtin[1], Abdelhamid Shoushtari[2*], Seyed Ali Pourbaksh[3], Mohammad Hossein Fallah Mehrabadi[4] and Hadi Pourtaghi[5]

[1] PhD Student in Micribiology, Faculty of Veterinary Medicine, Sicence and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Avian Diseases Research and Diagnostics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[3] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Sicence and Research Branch, Islamic Azad University ,Tehran, Iran
4 Assistant Professor, Department of Avian Diseases Research and Diagnostics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Received: 11.05.2022 Accepted: 26.09.2022

Abstract

Waterfowls are one of the hosts for Avian influenza virus (AIV) H4 subtypes. In fact, the importance of domestic ducks as reservoirs in the distribution of this virus has been previously proven. Also, the live poultry market could be a significant place in spreading and transmission of influenza virus among the birds and animals. Identification and molecular determination of HA and NA genes of the H4N2 avian influenza virus was isolated from this group of birds in live bird markets of Iran. From 962 cloacal samples, collected from domestic ducks and geese, the NA and HA genes sequences revealed the emergence of this virus in Iran for the first time. Phylogenetic analyses of the HA gene showed high homology to the Eurasian lineage of H4N6. On the other hand, the cleavage site of the HA genes showed a PEKQTR/GLF motif, an indicator of LPAI. Also, the NA gene showed high homology to those belonging to AIV N2 subtype. This is the first study regarding the detection and identification of AIV H4 subtypes from domestic ducks in Iran. It recommends a continuous monitoring of the avian influenza viruses in Iran in order to study the evolution and identify new strains with pandemic potential because such information will be helpful in controlling of the disease.

Key words: Avian influenza virus, H4 subtype, Domestic ducks, Phylogenetic analysis, Live poultry market

[*] **Corresponding Author**: Abdelhamid Shoushtari, Associate Professor, Department of Avian Diseases Research and Diagnostics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
E-mail: a.shoushtari@rvsri.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).