



Evaluation of the Efficiency of Polyclonal Antiserum Against the Conserved Motif of Influenza Virus Hemagglutinin in the Detection of Homologous and Heterologous Viruses

Vida Heidariyan¹✉, Vahid Karimi²✉, Shahla Shahsavandi³✉, Naser Ghodsian³✉

¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 19 July 2023, Accepted: 25 October 2023



[10.22059/jvr.2023.352766.3314](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.352766.3314)



[20.1001.1.20082525.1402.78.4.5.3](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.4.5.3)

Abstract

BACKGROUND: The H9N2 avian influenza is one of the most important viral diseases of poultry in Asian countries. Continuous mutations in the hemagglutinin (HA) protein as the main viral antigen make interpreting the HA-based serology test results difficult.

OBJECTIVES: In this experimental study, the ability of polyclonal antibodies against the conserved motif of HA protein in detecting heterologous H9N2 isolates was evaluated.

METHODS: Based on the bioinformatics data, a conserved motif of HA protein was selected and expressed in the pET-28a(+) vector. The recombinant peptide was mixed with an oil adjuvant and injected into specified pathogen free (SPF) chickens to produce the polyclonal antiserum. Similarly, antiserum from the inactivated virus was prepared. The efficiency of the prepared antisera was evaluated in the cross hemagglutination inhibition (HI) test using the homologous and heterologous H9N2 viruses.

RESULTS: The average titer of HI antibody against homologous and heterologous viruses using the polyclonal antiserum was equal to five. This titer was estimated to be seven for the homologous virus and much lower for heterologous viruses with inactivated virus antiserum. The difference was statistically significant.

CONCLUSIONS: According to the evaluations, this antiserum has a suitable efficiency in identifying different isolates of the H9N2 virus, and compared to the usual antiserum, it detects different antigens of a subtype more accurately. The resulting polyclonal antiserum does not contain non-specific inhibitors, which may cause problems interpreting serological findings. The results showed that polyclonal antiserum could identify H9N2 viruses isolated in different years by HI test; however, its validation requires testing with more viruses.

Keywords: Hemagglutinin, HI test, H9N2, Influenza virus, Polyclonal antiserum

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).

Publisher: University of Tehran

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Vahid Karimi, Tel/Fax: +9821-61117142/+9821-66933222



How to cite this article:

Heidariyan V, Karimi V, Shahsavandi S, Ghodsian N. Evaluation of the Efficiency of Polyclonal Antiserum Against the Conserved Motif of Influenza Virus Hemagglutinin in the Detection of Homologous and Heterologous Viruses. J Vet Res, 2023; 78(4): 289-302. doi: 10.22059/jvr.2023.352766.3314

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Epitope of B Cells Predicted in the Hemagglutinin (HA) Glycoprotein Sequence of H9N2 Iranian Influenza Virus.

Table 2. The Antigenicity, Hydrophilicity, and Available Surface of Conserved Hemagglutinin (HA) Glycoprotein Motifs of Iranian H9N2 Influenza Virus.

Table 3. Physicochemical Characteristics of Conserved Hemagglutinin (HA) Protein Motifs of Iranian H9N2 Influenza Virus.

Table 4. Prediction of the Binding of Hemagglutinin (HA) Protein Motif 2 of H9N2 Influenza Virus to Major Histocompatibility Complex (MHC) Class II Based on the Minimum IC₅₀ Value.

Figure 1. Phylogenetic Tree of Hemagglutinin (HA) Glycoprotein Sequence of Iranian H9N2 Influenza Viruses. The distance was calculated by the maximum composite likelihood method and based on substituting each nucleotide and one thousand repetitions.

Figure 2. Prediction of the Second Structure of Conserved Hemagglutinin (HA) Protein Motifs of H9N2 Iranian Influenza Virus. The gray line shows the coil structure, yellow indicates the beta sheets, and pink indicates the alpha helix. A: motif 2 and B: motif 4.

Figure 3. Optimizing and Increasing the Expression of Motif 2 at 0, 1, 2, 4, and 16 Hours After Induction With IPTG.

Figure 4. Antibody Titer in Cross Hemagglutination Inhibition (HI) Test With Homologous and Heterologous H9N2 Influenza Virus.



ارزیابی کارایی آنتی سرم پلی کلونال علیه موتیف حفظ شده هماگلوتینین و ویروس آنفلوانزا در

تشخیص ویروس‌های هومولوگ و هترولوگ

ویدا حیدریان^۱، وحید کریمی^۲، شهلا شاهسوندی^۳، ناصر قدسیان^۳^۱ دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران^۲ گروه بهداشت و بیماری‌های پرندگان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران^۳ مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۲۸ تیر ماه ۱۴۰۲، تاریخ پذیرش: ۳ مهر ماه ۱۴۰۲

doi: 10.22059/jvr.2023.352766.3314

20.1001.1.20082525.1402.78.4.5.3

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی ماکیان در کشورهای آسیایی به شمار می‌رود. جهش‌های متعددی که در گلیکوپروتئین سطحی هماگلوتینین HA به عنوان آنتی‌ژن اصلی ویروس رخ می‌دهند، تفسیر نتایج آزمایش‌های سرولوژی بر پایه HA را با مشکل مواجه می‌کنند.

هدف: در مطالعه تجربی حاضر، توانایی آنتی‌بادی پلی کلونال علیه موتیف حفاظت شده پروتئین HA در شناسایی جدایه‌های هترولوگ H9N2 مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: بر اساس داده‌های بیوانفورماتیک، موتیف حفاظت شده پروتئین HA انتخاب و در ناقل pET-28a(+) بیان شد. برای تولید آنتی سرم پلی کلونال، پپتید نوترکیب با ادجوان روغنی مخلوط و به جوجه‌های SPF تزریق شد. به طور مشابه آنتی سرم حاصل از ویروس غیرفعال تهیه شد. کارایی آنتی سرم‌ها در آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون HI متقاطع با ویروس‌های H9N2 هومولوگ و هترولوگ مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: در واکنش با آنتی سرم پلی کلونال، میانگین عیار آنتی‌بادی HI علیه ویروس‌های هومولوگ و هترولوگ یکسان و برابر ۵ برآورد شد. این عیار با آنتی سرم ویروس غیرفعال برای ویروس هومولوگ ۷ و برای ویروس‌های هترولوگ بسیار کمتر برآورد شد. این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری نهایی: با ارزیابی‌های انجام شده این آنتی سرم دارای کارایی مناسب در شناسایی جدایه‌های متفاوت ویروس H9N2 می‌باشد و در مقایسه با آنتی سرم معمول با دقت بیشتری آنتی‌ژن‌های مختلف یک تحت تیپ را تشخیص می‌دهد. آنتی سرم پلی کلونال حاصل فاقد بازدارنده‌های غیراختصاصی می‌باشد که ممکن است تفسیر یافته‌های سرولوژی را با مشکلاتی مواجه نماید؛ این نتایج نشان داد آنتی سرم پلی کلونال توان شناسایی ویروس‌های H9N2 جدا شده در سال‌های مختلف با آزمایش HI را دارد، هرچند معتبرسازی آن مستلزم انجام آزمایش با تعداد بیشتر ویروس است.

کلمات کلیدی: آزمایش HI، آنتی سرم پلی کلونال، ویروس آنفلوانزا، هماگلوتینین، H9N2

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی، دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.



نویسنده مسئول: وحید کریمی، گروه بهداشت و بیماری‌های پرندگان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان بیماری ویروسی حاد تنفسی است که پرندگان اهلی، وحشی و بسیاری از سایر گونه‌های جانوری را مبتلا می‌کند. عامل این بیماری ویروسی از خانواده ارتومیکسوویریده می‌باشد که در هفت جنس شامل آلفا، بتا، گاما، دلتا آنفلوانزا، توگاتوویروس، ایساویروس و کوراجاویروس رده بندی می‌شوند. ویروس‌های تیپ A در جنس آلفا آنفلوانزا بیش‌ترین بیماری‌زایی را برای پرندگان، پستانداران و انسان داشته و از عوامل مخاطره‌آمیز در بهداشت عمومی محسوب می‌گردند (۱-۳). تحت تیپ‌های ویروس‌های تیپ A براساس خاصیت آنتی‌ژنیسته دو گلیکوپروتئین سطحی هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) تعیین می‌شوند. تاکنون ۱۸ زیرواحد HA و ۱۱ زیرواحد NA در ویروس‌های تیپ A شناسایی شده‌اند (۴). انواع این ویروس توانایی جهش یا بازآرایی به اشکال عفونت‌های مرگ‌آور را دارا هستند و تنوع چشمگیری را در سرایت و مرگ‌ومیر در ماکیان نشان می‌دهند (۱). ویروس‌های کم حدت H9N2 شایع‌ترین ویروس‌های آنفلوانزا

در ماکیان محسوب می‌شوند و اندام‌های تولیدمثلی ماکیان را آلوده نموده و به دلیل کاهش تولید تخم‌مرغ تا ۷۰ درصد، ضررهای اقتصادی فراوانی ایجاد می‌کنند. موارد مرگ‌ومیرهای ناشی از این ویروس می‌تواند به دلیل عفونت‌های ثانویه باکتریایی یا ویروسی باشد (۵). ویروس‌های H9N2 علاوه بر توانایی اتصال به گیرنده‌های اختصاصی طیور، گیرنده‌های NeuAc α 2,6Gal شبیه سوبه‌های انسانی را نیز کسب کرده‌اند. این یافته‌ها بدین معنی است که این ویروس پتانسیل تهدید بهداشت عمومی و سرایت به انسان را دارد (۶، ۷).

اولین شیوع H9N2 از ماکیان کشور چین در سال ۱۹۹۲ گزارش گردید و در طول بیست سال اخیر به‌عنوان رایج‌ترین تحت تیپ در گردش در کشورهای آسیایی اعلام شده است. شیوع سرمی بالای H9N2 در طیور روستایی در مطالعات مختلف نشان‌دهنده بومی شدن این ویروس در ایران و کشورهای خاورمیانه می‌باشد (۵، ۸، ۹). به دلیل خسارت اقتصادی ناشی از ویروس آنزوتیک H9N2 و تهدید سلامتی انسان و پرندگان، بسیاری از کشورها از جمله چین، کره جنوبی، مراکش، پاکستان، اندونزی، مصر، ایران و امارات متحده عربی، واکسیناسیون را در سطح محلی و ملی به‌عنوان یک رویکرد کلیدی برای جلوگیری از این بیماری در طیور اتخاذ کرده‌اند (۹-۱۴). با این حال در سال‌های اخیر عدم موفقیت واکسن‌های مصرفی در بسیاری از مناطق به دلیل پدیدار شدن انواع آنتی‌ژنیک، در نتیجه جهش‌هایی که در آنتی‌ژن اصلی ویروس یعنی پروتئین HA به وجود آمده‌اند گزارش شده است (۱۰، ۱۵-۱۷).

ایمنی علیه ویروس آنفلوانزا به دنبال عفونت یا واکسیناسیون با تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه هم‌گلوتینین HA ایجاد می‌شود. افزون بر این به دلیل نقش محوری آن در بیماری‌زایی، تعیین تحت تیپ HA و واکنش‌پذیری آن برای پایش‌های کنترلی و بررسی‌های اپیدمیولوژیک بیماری بسیار مهم است. تنوع آنتی‌ژنی در ویروس‌های آنفلوانزا اغلب در نتیجه جایگزینی‌های اسیدآمین در نزدیکی محل اتصال به گیرنده‌های گلیکوپروتئین HA رخ می‌دهند (۱۶، ۱۸). این جایگزینی‌ها با اثر مستقیم بر اتصال آنتی‌بادی، سبب ایجاد تغییر آنتی‌ژنی می‌شوند که متداول‌ترین مکانیسم فرار از سیستم ایمنی قلمداد می‌شود. به‌عبارت‌دیگر جهش‌های HA می‌توانند با افزایش توان اتصال ویروس به گیرنده سطح سلول، فعالیت آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده را کاهش دهند. به دلیل تغییرات پیش‌بینی نشده‌ای که در پروتئین HA به‌عنوان آنتی‌ژن اصلی ویروس رخ می‌دهد، ممکن است اثربخشی واکسن به شدت کاهش یافته و یا آزمایش‌های سرولوژی نتایج قابل قبولی در برداشته باشند (۱۵، ۱۹).

آزمایش ممانعت از هم‌گلوتیناسیون HI استاندارد طلایی و پرکاربردترین روش غربالگری آنفلوانزا می‌باشد که اهمیت زیادی در ویروس‌شناسی تشخیصی دارد. در این آزمایش وجود آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن، با خاصیت بازدارندگی از تجمع و توده شدن گلبول قرمز مشخص می‌شود و اساس آن واکنش بین پروتئین HA و ویروس آنفلوانزا و آنتی‌سرم است (۲۰-۲۲). در آزمایش HI اغلب از ویروس تکثیر یافته در تخم‌مرغ برای تهیه آنتی‌سرم اختصاصی استفاده می‌شود. وجود پروتئین‌های ناخواسته و نیز تغییرات آنتی‌ژنی پروتئین HA در نتیجه جهش‌های ژنومی، بر واکنش بین پروتئین HA و ویروس و آنتی‌سرم اثر نامطلوب داشته و موجب کاهش حساسیت آزمایش می‌شوند (۱۹، ۲۳). هزینه تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مرجع در مقایسه با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال برای استفاده در این آزمایش بالا می‌باشد (۲۴)؛ بنابراین، برای انجام آزمایش HI معتبر، استفاده از قطعه حفاظت شده پروتئین HA راهکار مناسبی برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال با میل ترکیبی بالا در تعیین هویت جدایه‌های ویروس آنفلوانزا و عیارسنجی است. آنتی‌سرم‌های تهیه شده از پروتئین نوترکیب HA تحت تیپ‌های مختلف ویروس آنفلوانزا در تعیین هویت تحت تیپ ویروس عامل و نیز ارزیابی میزان آنتی‌بادی در نمونه‌های سرمی کاربرد دارند (۱۱، ۲۵، ۲۶). در مطالعه حاضر، آزمایش HI با استفاده از پپتید نوترکیب برای تشخیص آنتی‌بادی اختصاصی علیه ویروس H9N2 طراحی شد. ابتدا با ابزارهای بیوانفورماتیک پپتید مناسب از پروتئین HA پیش‌بینی شد. سپس قطعه مورد نظر در سیستم یوکاریوتی بیان شده و آنتی‌سرم با تزریق به جوجه تهیه شد. ویژگی و حساسیت آنتی‌سرم حاصل در آزمایش HI متقاطع با ویروس‌های هومولوگ و هتروولوگ ارزیابی شد.

مواد و روش کار

شناسایی توالی‌های حفاظت شده: توالی‌های HA ویروس آنفلوانزا H9N2 ایران با طول کامل از پایگاه داده NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استخراج شده و درخت فیلوژنی با پردازش کم‌ترین میزان دگرگونی بر مبنای Maximum Composite Likelihood و یک هزار بار تکرار با الگوریتم Neighbor-Joining در نرم‌افزار MEGA

(<https://www.megasoftware.net/>) رسم شد. میزان واگرایی توالی‌ها در نتیجه فشار انتخابی با هدف بررسی جهش‌های خنثی که اثری بر دگرگونی وپروس ندارند، با آزمون بی‌طرفی Tajima (Tajima's Neutrality) در $P > 0.001$ برآورد شد. در مجموع چهار توالی پیتیدی حفظ شده در تمام توالی‌ها در موقعیت‌های ۱۰۰-۷۲، ۲۸۰-۲۲۶، ۳۸۱-۳۴۰، و ۴۸۲-۴۱۴ (به ترتیب موتیف‌های ۱ تا ۴) تعیین شدند.

بررسی ویژگی‌های توالی‌های حفاظت شده: قابلیت اتصال به آنتی‌بادی با پیش‌بینی وجود اپی‌توپ‌های خطی سلول‌های B در توالی هر موتیف با BepiPred و پیش‌فرض ۰/۵ در پایگاه داده IEDB (<http://tools.iedb.org/bcell>) ارزیابی شد. پتانسیل آنتی‌ژنیک بودن هر یک از موتیف‌ها با الگوریتم Kolaskar و Tongaonker، سطح دسترس آنتی‌ژن با Emimi، و میزان آب‌دوستی با Parker در IEDB با در نظر گرفتن حد آستانه ۱/۰ پیش‌بینی گردید. خصوصیات فیزیکوشیمیایی هر موتیف شامل ترکیب اسیدهای آمینه، نقطه ایزوالکتریک نظری pI، نیمه‌عمر در سلول‌های یوکاریوتیک، مخمر و *E. coli*، شاخص آلیفاتیک و میانگین کل هیدروپاتی GRAVY با استفاده از برنامه ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) ارزیابی شد. برای بررسی برهم‌کنش آنتی‌بادی و سلول‌های B، ساختمان دوم پروتئین با PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) پیش‌بینی گردید.

جدول ۱. اپیتوپ سلول‌های B پیش‌بینی شده در توالی گلیکوپروتئین HA ویروس آنفلوانزا H9N2 ایران.

شماره	آغاز	پایان	پپتید	طول
۱	۳۱	۳۲	TE	۲
۲	۴۲	۷۰	VPVTHAKELLHTEHNEMLCATNLGRPLIL	۲۹
۳	۸۴	۹۲	SCDLLLGGRR	۹
۴	۱۰۵	۱۰۵	N	۱
۵	۱۱۱	۱۵۳	GNVENLEELRTLFSSSSYQRIQIFPDTIWNVTYTGTSKSCSD	۴۳
۶	۱۶۳	۱۸۱	TQKNGLYPIQDAQYTNNRG	۱۹
۷	۱۹۵	۲۰۷	TDTAQTNLTYTRTD	۱۳
۸	۲۱۹	۲۳۶	RTFKPLIGRPLVNGQIG	۱۸
۹	۲۷۲	۲۸۵	SHGRILKTDLNSGN	۱۴
۱۰	۲۹۱	۳۰۶	QPEKGGNLSTLPFHNI	۱۶
۱۱	۳۰۹	۳۰۹	F	۱
۱۲	۳۱۷	۳۲۱	YIGVK	۵
۱۳	۳۲۳	۳۳۸	LKLAIGLRNVPKSSR	۱۶
۱۴	۳۵۲	۳۸۴	WPGLVAGWYGFQHSNDQGVMAADRSTQKAVD	۳۳
۱۵	۳۸۷	۳۸۸	TS	۲
۱۶	۳۹۹	۴۱۰	KQYEIIDHEFSE	۱۲
۱۷	۴۲۲	۴۲۵	IDDQ	۴
۱۸	۴۴۴	۴۵۵	KTLDEHDANVNN	۱۲
۱۹	۴۶۹	۴۷۰	ME	۲
۲۰	۴۸۴	۴۸۵	DQ	۲
۲۱	۴۸۷	۵۱۹	METIRNGTYNRRKYKEESRLKRQKIEGVKLESE	۳۳

جدول ۲. میزان آنتی‌ژنیسیته، آب دوستی و سطح در دسترس موتیف‌های حفظ شده گلیکوپروتئین HA ویروس‌های آنفلوانزا H9N2 ایران.

موتیف	Tangaonkar و Kolaskar (آنتی‌ژنیسیته)			Parker (آب دوستی)			Emimi (سطح در دسترس)		
	بیشینه	کمینه	میانگین	بیشینه	کمینه	میانگین	بیشینه	کمینه	میانگین
۱	۱/۱۵۸	۰/۹۳۴	۱/۰۴۱	۴/۴۰۰	-۱/۲۰۰	۰/۴۱۵	۳/۱۸۹	۰/۲۱۴	۱/۰۰
۲	۱/۱۱۳	۰/۹۳۸	۱/۰۲۹	۶/۸۰۰	-۱/۶۱۴	۱/۵۳۶	۵/۶۱۷	۰/۱۱۰	۱/۰۰
۳	۱/۰۷۱	۰/۹۱۹	۰/۹۹۶	۵/۵۰۰	-۲/۷۴۳	۰/۸۷۳	۰/۵۷۴	۰/۲۲۶	۰/۴۶۷
۴	۱/۱۸۵	۰/۸۸۴	۱/۰۰۷	۵/۳۸۶	-۴/۳۷۱	۱/۸۸۸	۲/۹۹۶	۰/۱۲۲	۱/۰۰

جدول ۳. خصوصیات فیزیکوشیمیایی موتیف‌های حفظ شده پروتئین HA ویروس‌های آنفلوانزا H9N2 ایران.

موتیف	وزن مولکولی	باقیمانده‌های دارای شارژ مثبت	باقیمانده‌های دارای شارژ منفی	شاخص آلفاتیکی نظری	شاخص بی ثباتی	شاخص آلفاتیکی	میانگین کل هیدروپاتی GRAVY	نیمه عمر تخمین زده
۱	۳۲۵۸/۷۱	۲	۴	۴/۴۱	۴۹/۸۷	۱۰۴/۱۴	۰/۰۵۹	رتیکولوسیت‌های پستانداران مخمر / شیرشیا کلاسی
۲	۶۱۴۳/۰۳	۷	۲	۱۰/۵۲	۱۷/۵۱	۹۳/۸۲	-۰/۴۵۸	ساعت ساعت
۳	۴۴۱۲/۸۶	۲	۴	۴/۶۶	۲۴/۸۹	۶۲/۸۶	-۰/۱۴۰	دو دقیقه سه دقیقه
۴	۷۹۹۶/۰۱	۸	۱۱	۵/۱۶	۲۲/۵۴	۹۱/۸۸	-۰/۶۵۵	دو دقیقه یک ساعت

توانایی اتصال هر موتیف به MHC کلاس II در پایگاه داده IEDB بررسی شد. مبنای پیش‌بینی اتصال، روش SMM_align 1.1 می‌باشد که امکان شناسایی موتیف متصل شونده را از نظر ماتریس وزن مخصوص فراهم می‌کند. خروجی این روش مقادیر میل ترکیبی اتصال بر اساس IC50 (half maximal inhibitory concentration) است که رتبه صدک آن برای شناسایی پپتیدهای متصل شونده به سلول‌های T برابر ۵۰۰ نانو مولار در نظر گرفته شد. این آستانه بهترین مقدار توصیه شده برای تفکیک موتیف متصل شونده از غیر متصل شونده می‌باشد.

کلونینگ و بیان موتیف حفظ شده: پس از تعیین بهترین موتیف در ارزیابی بیوانفورماتیک، ویروس آنفلوانزا با شناسه JX456181.1 (H9N2) A/chicken/Iran/SS7/2011 برای انجام مطالعه حاضر انتخاب شد. توالی ژن HA این ویروس با شماره رهگیری JX456181.1 ثبت شده در GenBank تهیه شده و پرایمرهای رفت و برگشت اختصاصی برای تکثیر و کلونینگ آن در وکتور بیانی pET-28a (+) با استفاده از نرم‌افزار oligo طراحی گردید. جایگاه برش آنزیم‌های BamHI و HindIII در دو انتهای ۵' توالی پرایمرها در نظر گرفته شد. ویروس با استفاده از کیت Ribospin™ (GeneAll, Korea) استخراج شد. قطعه ژنی طی واکنش یک‌مرحله‌ای (Next generation of) RT-PCR (GeneAll, Korea) استخراج شد. با پرایمر رفت 5'-GGATCCGGCTGACTCAAAGAACGGG-3' و پرایمر برگشت 5'-AAGCTTTCAGAATTCTCCCGTGGCT-3' تکثیر شد. پس از تأیید درستی قطعه مورد نظر، وکتور و محصول PCR با آنزیم‌های محدود اثر برش داده شده و عمل اتصال با آنزیم DNA لیگاز T4 در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انجام شد. پلاسمید نوترکیب حاصل درون سلول‌های پذیرای باکتری E. coli سویه BL21 ترانسفورم شد. باکتری ترانسفورم شده در محیط کشت LB حاوی کانامایسین کشت داده شد. برای افزایش بازده بیان، IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار به ازای هر میلی‌لیتر محیط اضافه شده و تا ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در زمان‌های صفر، ۱، ۲، ۴ و ۱۶ ساعت پس از القا نمونه گرفته شده و نتیجه القا با الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌امید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) ۱۲ درصد در کنار مارکر پروتئین (Thermo Fisher) با طیف ۳/۴ تا ۱۰۰ کیلودالتون ارزیابی شد. پروتئین بیان شده با استفاده از ستون نیکل کیت تجاری Protino Ni-TED (Macherey-Nagel™) خالص شد. مقدار پروتئین خالص شده با روش برادفورد اندازه‌گیری شد (۲۷).

تهیه آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزا H9N2: مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی ویروس آنفلوانزا H9N2 A/chicken/Iran/SS7/2011 (H9N2) به همراه محلول آنتی‌بیوتیک شامل پنی‌سیلین G و استرپتومایسین به حفره آلانتوئیک تخم‌مرغ جنین‌دار ۱۰ روزه تزریق گردید و محل تلقیح با پارافین مسدود شد. پس از تزریق تخم‌مرغ‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته نگهداری شدند. تخم‌مرغ‌ها روزانه بررسی شده و آن‌هایی که جنین‌شان در ۲۴ ساعت اول مرده بودند، حذف شدند. در پایان مدت نگهداری، تخم‌مرغ‌ها ۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا رگ‌های خونی جنین بسته شود. سپس در زیر هود بیولوژیک کلاس II مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ‌ها برداشت شده و در ظرف استریل جمع‌آوری گردید. بقایای جامد با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه برداشته شد. عیار ویروس برابر با $10^{9.83}$ EID₅₀/ml محاسبه شده و با افزودن بتاپروپیولاکتون (Sigma Aldrich) دور به مدت ۲۰ دقیقه برداشته شد.

در غلظت نهایی ۰/۱ درصد در PBS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد غیرفعال گردید. برای اطمینان از فرایند غیرفعال شدن ویروس، آنتی‌ژن همانند روش ذکر شده به ۵ عدد تخم‌مرغ تزریق شد و در پایان دوره یک‌هفته‌ای، عدم وجود ویروس زنده در مایع آلاتوئیک با انجام آزمایش آگلوتیناسیون سریع بررسی شد (۲۸).

تهیه آنتی سرم اختصاصی: محلول آنتی‌ژن غیرفعال و مقدار ۱۰۰ میکروگرم از پروتئین نوترکیب محلول در PBS جداگانه با ادجوان روغنی مخلوط شدند. برای ایمن‌سازی، تعداد ۳۰ جوجه در سن سه هفته‌گی به طور تصادفی در سه گروه مساوی دریافت‌کننده ویروس غیرفعال، دریافت‌کننده پروتئین نوترکیب و دریافت‌کننده PBS به‌عنوان شاهد منفی تقسیم شدند. موارد اخلاقی نگاه‌داری جوجه‌ها در دوره آزمایش شامل دریافت کافی و مناسب آب و غذا، عدم ایجاد تنش به هنگام خون‌گیری و واکنش‌های غیرعادی به طور کامل طبق مجوز صادره از دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران به شماره IR.UT.VETMED.REC.1401.011 رعایت شد. جوجه‌های هر گروه نمونه مربوطه را به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر با تزریق درون عضله سینه دریافت کردند. برای همه گروه‌ها، یک تزریق یادآور با فاصله دو هفته‌ای تجویز شد. نمونه‌های خون هر هفته تا پایان هفته هفتم نگهداری گرفته شده و سرم‌های آن‌ها جمع‌آوری شد. سرم‌ها به مدت نیم ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد غیرفعال شده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برآورد ویژگی آنتی سرم‌های تولید شده در آزمایش HI: برای ارزیابی ویژگی آنتی سرم تولید شده در شناسایی اختصاصی تحت تیپ H9، آزمایش HI متقاطع با ویروس‌های H9N2 تعیین هویت شده شامل جدایه سال ۲۰۱۱ (JX456181.1) به‌عنوان ویروس هومولوگ و جدایه‌های سال ۲۰۰۹ (JX456179.1) و سال ۱۹۹۸ (FJ794817.1) به‌عنوان ویروس‌های هترولوگ انجام شد. برای هر یک از آنتی سرم‌های تهیه شده جداگانه در میکروپلیت در نظر گرفته شده و آزمایش به طور یکسان بر اساس دستورالعمل انجام شد (۲۸).

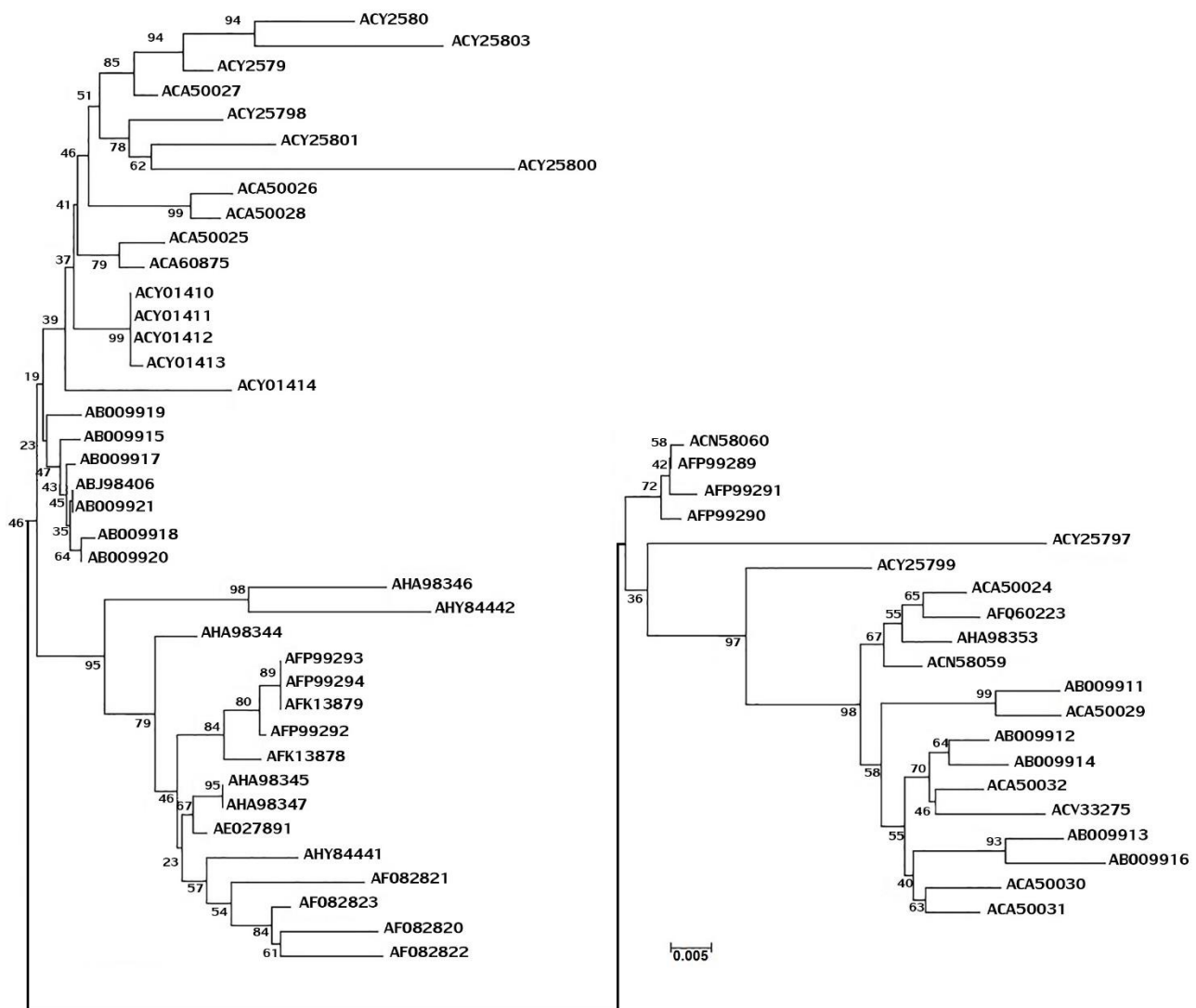
ارزیابی آماری: پردازش آماری با استفاده از آزمون آنووا یک‌طرفه نرم‌افزار SPSS، نسخه ۲۲ صورت گرفت. بیشینه خطای مورد پذیرش، با در نظر گرفتن ضریب اطمینان ۹۵ درصد، برابر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول ۴. پیش‌بینی اتصال موتیف ۲ پروتئین HA ویروس آنفلوانزا H9N2 به MHC کلاس II بر اساس کمینه مقدار IC50

IC50	توالی پپتید	توالی مرکزی	طول	پایان	آغاز
۷۳/۰۰	NYYSWSVLKPGQTLRV	WSVLKPGQT	۱۵	۲۸	۱۴
۷۳/۰۰	YYWSVLKPGQTLRVR	WSVLKPGQT	۱۵	۲۹	۱۵
۱۲۱/۰۰	YWSVLKPGQTLRVRS	LKPGQTLRV	۱۵	۳۰	۱۶
۱۲۵/۰۰	WSVLKPGQTLRVRSN	LKPGQTLRV	۱۵	۳۱	۱۷
۱۲۶/۰۰	INYYWSVLKPGQTLR	WSVLKPGQT	۱۵	۲۷	۱۳
۱۳۴/۰۰	RINYYWSVLKPGQTL	WSVLKPGQT	۱۵	۲۶	۱۲
۱۴۶/۰۰	GRINYYWSVLKPGQT	INYYWSVLK	۱۵	۲۵	۱۱
۱۵۵/۰۰	PGQTLRVRSNGLIA	TLRVRSNGN	۱۵	۳۶	۲۲
۱۵۹/۰۰	SVLKPGQTLRVRSNG	LKPGQTLRV	۱۵	۳۲	۱۸
۱۶۱/۰۰	GQTLRVRSNGLIAP	VRSNGLIA	۱۵	۳۷	۲۳
۱۹۴/۰۰	TLRVRSNGLIAPWY	VRSNGLIA	۱۵	۳۹	۲۵
۲۰۸/۰۰	QTLRVRSNGLIAPW	VRSNGLIA	۱۵	۳۸	۲۴
۲۳۲/۰۰	LRVRSNGLIAPWYG	VRSNGLIA	۱۵	۴۰	۲۶
۲۳۴/۰۰	LKPGQTLRVRSNGL	TLRVRSNGN	۱۵	۳۴	۲۰
۲۴۸/۰۰	PWYGHVLSGESHGRI	YGHVLSGES	۱۵	۵۱	۳۷
۲۵۲/۰۰	VLKPGQTLRVRSNGN	LKPGQTLRV	۱۵	۳۳	۱۹
۲۶۰/۰۰	APWYGHVLSGESHGR	YGHVLSGES	۱۵	۵۰	۳۶
۲۷۰/۰۰	KPGQTLRVRSNGLI	TLRVRSNGN	۱۵	۳۵	۲۱
۲۹۲/۰۰	NLIAPWYGHVLSGES	IAPWYGHVL	۱۵	۴۷	۳۳
۳۰۵/۰۰	IAPWYGHVLSGESHG	YGHVLSGES	۱۵	۴۹	۳۵
۳۱۷/۰۰	LIAPWYGHVLSGESH	YGHVLSGES	۱۵	۴۸	۳۴
۳۵۱/۰۰	WYGHVLSGESHGRIL	VLSGESHGR	۱۵	۵۲	۳۸
۳۷۵/۰۰	YGHVLSGESHGRILK	VLSGESHGR	۱۵	۵۳	۳۹
۴۵۶/۰۰	IGRINYYWSVLKPGQ	INYYWSVLK	۱۵	۲۵	۱۰

نتایج

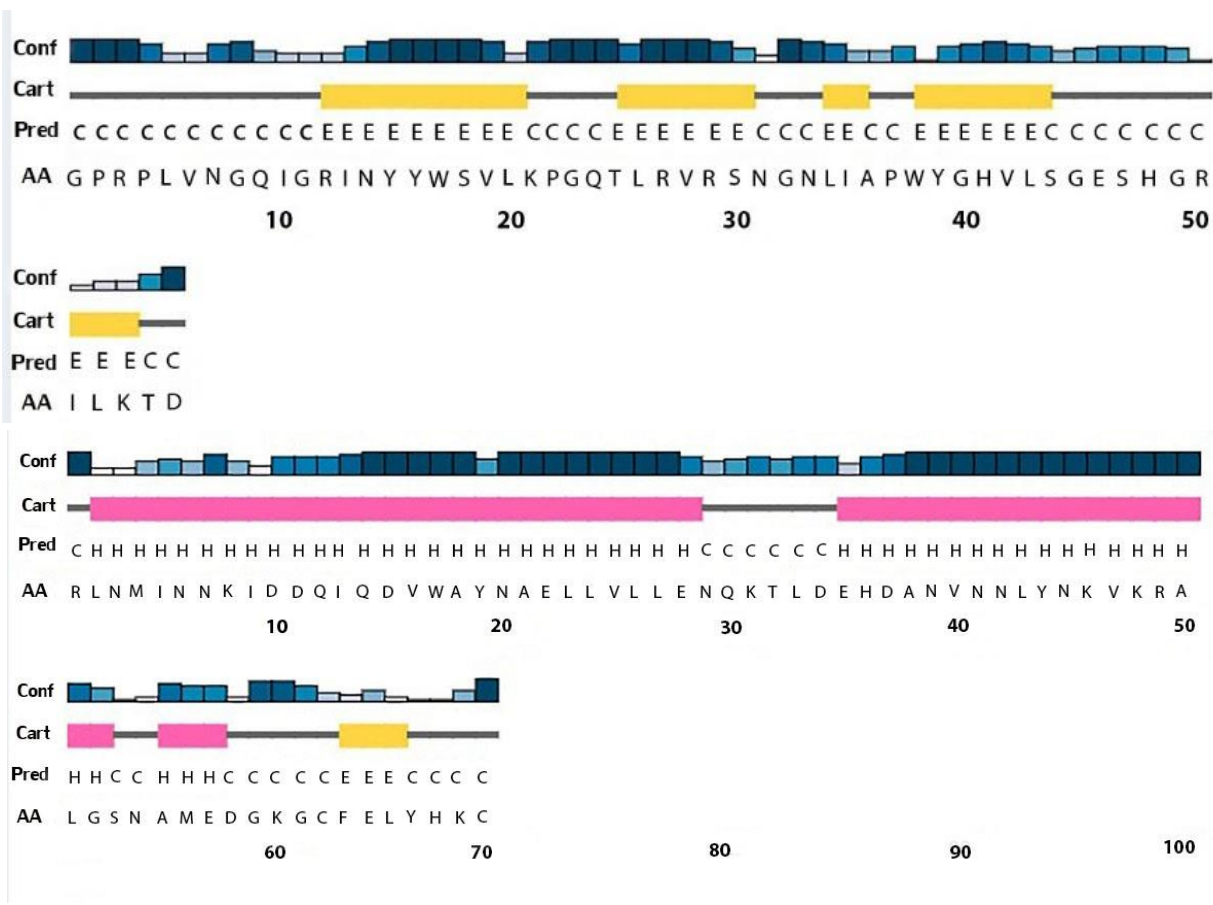
ویروس‌های آنفلوانزا H9N2 ایران بر اساس همسانی ۹۷ درصد گلیکوپروتئین HA، به دو کلاد اصلی I و II منشأ گرفته از دو نیای متفاوت سال‌های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۳ تقسیم شدند. ویروس‌هایی که برای اولین بار در ایران شناسایی شدند، همچنین ویروس‌های جدا شده تا سال ۲۰۰۴ و برخی جدایه‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ در دو گروه در کلاد I قرار می‌گیرند. ویروس‌های جدا شده از سال ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۸ و جدایه‌های ۲۰۰۹ تاکنون در دو گروه در کلاد II قرار می‌گیرند (تصویر ۱). نتایج آزمون بی‌طرفی Tajima نشان داد که در ۶۴ توالی گلیکوپروتئین HA ویروس‌های آنفلوانزا H9N2 ایران، ۲۲۵ محل جهش با تنوع نوکلئوتیدی یعنی میانگین تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی در هر مکان بین دو توالی برابر با ۰/۰۵۸۹۳۴ شناسایی شد؛ یعنی تنوع نوکلئوتیدی با تناوب کم بین این توالی‌ها زیاد است. مقادیر آزمون تاجیما برابر با ۱/۱۰۷۷۶۴- بوده و این مقدار منفی به طور قابل توجهی از صفر ($P > 0.01$) منحرف شده است. این نتیجه نشان داد که میزان واگرایی در این ویروس‌ها کم بوده و احتمالاً ناشی از فشار انتخابی واکسیناسیون می‌باشد.



تصویر ۱. درخت فیلوژنی توالی گلیکوپروتئین HA ویروس‌های آنفلوانزا H9N2 ایران. فاصله با روش Maximum Composite Likelihood و بر اساس جایگزینی هر باز نوکلئوتیدی و یک هزار بار تکرار محاسبه شده است.

بر اساس آنالیز BepiPred، تعداد ۲۱ اپیتوپ سلول B در توالی پروتئین HA ویروس آنفلوانزا H9N2 شناسایی شد (جدول ۱). در موتیف ۱ توالی SCDLLLGGR، در موتیف ۲ دو توالی GPRPLVNGQIG و SHGRILKTD، در موتیف ۳ توالی WPGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAADRSTQK و در موتیف ۴ سه توالی KTLDEHDANVNN، IDDDQ و ME به عنوان اپی توپ‌های ایمنونژنیک سلول B تعیین شدند. نتایج پیش‌بینی آنٹی‌ژنیسیته، آب‌دوستی و سطح در دسترس موتیف‌ها در جدول ۲ آورده شده است. بجز موتیف ۳، میزان آنٹی‌ژنیسیته سایر موتیف‌ها تقریباً مشابه بود. بر اساس الگوریتم Parker اسیدآمینه‌های قطبی بیشتر در سطح موتیف‌های ۲ و ۴ قرار گرفته‌اند و از پراکندگی بهتری برخوردارند، این ویژگی اهمیت زیادی در میان کنش آنٹی‌ژن - آنٹی‌بادی دارد. به عنوان شاخص کلیدی برای تعیین تاخوردگی و پایداری پروتئین‌ها و همچنین چگونگی برهم کنش آنٹی‌ژن - آنٹی‌بادی و تشکیل کمپلکس بین این دو مولکول، پیک‌های سطح در دسترس در موتیف ۲ نسبت به موتیف‌های دیگر از پراکندگی و توزیع بهتری برخوردارند.

نتایج بررسی خواص فیزیکوشیمیایی (جدول ۳) نشان داد که تعداد اسیدآمینه‌های با بار مثبت (Arg و Lys) در مقایسه با آن‌هایی که دارای بار منفی (Glu و Asp) می‌باشند در موتیف‌های ۲ و ۴ بسیار بیشتر از موتیف‌های دیگر بود. مقدار pI موتیف‌ها از ۴/۴۱ تا ۱۰/۵۲ برآورد شد و موتیف ۲ با بیشترین مقدار pI و شاخص ناپایداری برابر با ۱۷/۵۱ (کمتر از حد آستانه ۴۰)، نسبت به موتیف‌های دیگر پایداری بیشتری نشان داد. شاخص آلفاتیک که بیانگر افزایش پایداری حرارتی پروتئین‌ها است، برای موتیف ۳ بسیار کمتر از موتیف‌های دیگر برآورد شد. مقادیر منفی GRAVY نیز موید واکنشگری بیشتر موتیف‌های ۲ و ۴ است. در ساختمان دوم موتیف ۲، صفحات بتا و ساختار کوئل پیش‌بینی شد؛ در حالی که بیشتر این ساختمان در موتیف ۴ را مارپیچ آلفا تشکیل می‌دهد (تصویر ۲). صفحات بتا نسبت به مارپیچ آلفا انعطاف پذیرتر می‌باشند و از آن جایی که دومین‌های آنٹی‌ژن و آنٹی‌بادی اغلب در مناطقی با انعطاف پذیری بالا به یکدیگر متصل شده و کمپلکس تشکیل می‌دهند، موتیف ۲ گزینه مناسب‌تری در برهم کنش با آنٹی‌بادی به نظر می‌رسد. پیش‌گویی برای موتیف‌های ۱ و ۳ به دلیل کوتاه بودن طول توالی، امکان پذیر نبود.

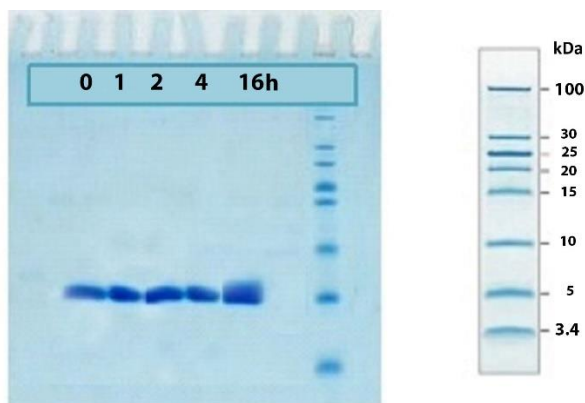


تصویر ۲. پیش‌گویی ساختار دوم موتیف‌های حفظ شده پروتئین HA ویروس‌های آنفلوانزا H9N2 ایران. خط خاکستری نمایشگر ساختار کوئل، رنگ زرد صفحات بتا و رنگ صورتی مارپیچ آلفا است. A: موتیف ۲ و B: موتیف ۴.

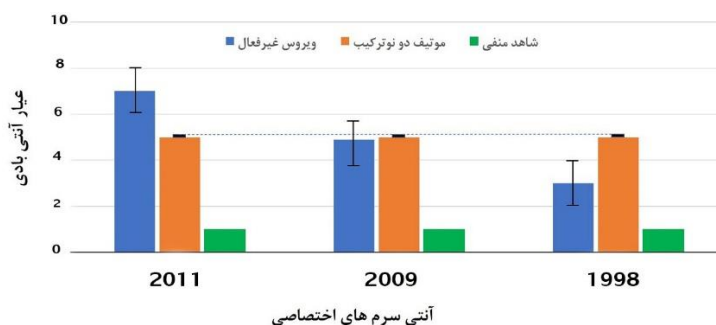
نتایج توانایی اتصال موتیف‌ها به MHC کلاس II بر اساس کمینه مقدار IC50 در جدول ۴ آورده شده است. صرف‌نظر از طول یکسان و با تجمیع توالی‌های مرکزی (core)، تعداد یک توالی در موتیف ۱، چهار توالی در موتیف ۲، دو توالی در موتیف ۳ و چهار توالی در موتیف ۴ قابلیت اتصال به MHC کلاس II را مقادیر تا ۵۰۰ نانو مولار دارند. به طور نسبی این مقدار برای موتیف‌های ۴ و ۲ بسیار کمتر از موتیف‌های دیگر برآورد گردید.

مقادیر کمتر از ۵۰۰ به معنای امکان اتصال قوی‌تر و بهتر آلی است. بر اساس داده‌های بیوانفورماتیک، موتیف‌های ۲ و ۴ گزینه‌های بهتری برای تهیه آنتی سرم اختصاصی می‌باشند؛ اما به دلیل قرار گرفتن موتیف ۴ در زیر واحد HA2 پروتئین HA و همسانی زیاد آن با دیگر تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا، موتیف ۲ برای ادامه مطالعه انتخاب شد. محصول RT-PCR حاصل از تکثیر ژن رمزگذار موتیف ۲ به طول ۳۶۱ جفت باز در وکتور pET-28a(+) بیان شد (تصویر ۳). وزن مولکولی پروتئین بر اساس برآورد ProtParam حدود ۶ کیلوالتون بود. ارزیابی نمونه‌های پروتئین بارگذاری شده روی ژل SDS-PAGE بیانگر این است که میزان بیان پس از ۱۶ ساعت به بیشترین مقدار رسیده است. مقدار پروتئین خالص شده برابر با ۵/۳۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برآورد گردید.

عیار آنتی‌بادی HI در نمونه‌های سرم به دست آمده از ایمن‌سازی جوجه‌ها با ویروس H9N2 غیرفعال و موتیف ۲ نوترکیب به ترتیب ۷/۰۶۴ و ۴/۹۵۹ برآورد شد (تصویر ۴). ویژگی آنتی سرم‌های تولید شده در شناسایی اختصاصی این تحت تیپ با آزمایش HI متقاطع ارزیابی شد (تصویر ۴). در واکنش با آنتی سرم حاصل از ویروس غیرفعال هومولوگ ۲۰۱۱، عیار آنتی‌بادی HI برابر با ۷/۰۶۴ به دست آمد. این عیار برای ویروس هترولوگ ۲۰۰۹ برابر با ۴/۶۰۸ و برای ویروس هترولوگ ۱۹۹۸ برابر با ۲/۸۹۵ برآورد شد. این تفاوت به لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P > 0.05$). در آزمایش با آنتی سرم موتیف ۲ نوترکیب، نتیجه مشابه با هر سه ویروس H9N2 هومولوگ و هترولوگ مشاهده شد و عیار HI تقریباً یکسان در محدوده کمتر از ۵ به دست آمد. بدین ترتیب برخلاف آنتی سرم حاصل از ویروس کامل، آنتی سرم نوترکیب توان شناسایی ویروس‌های H9N2 جدا شده در سال‌های مختلف را دارد.



تصویر ۳. بهینه‌سازی و افزایش بیان موتیف ۲ در زمان‌های صفر، ۱، ۲، ۴ و ۱۶ ساعت پس از القا با IPTG.



تصویر ۴. عیار آنتی‌بادی در آزمایش HI متقاطع با ویروس‌های آنفلوانزا H9N2 هومولوگ و هترولوگ.

بحث

تشخیص سریع بهترین گزینه برای جلوگیری از شیوع عفونت‌های بیشتر و کاهش خسارات ناشی از عفونت ویروس‌های آنفلوانزا H9N2 می‌باشد. اگرچه در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی برای تعیین تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا مطرح شده‌اند، اما هنوز از روش‌های سرولوژی مانند HI و ایزا به طور گسترده استفاده می‌شود (۲۹، ۳۰). مبنای آزمایش HI جلوگیری از اتصال ویروس به گلوبول‌های قرمز توسط آنتی‌بادی‌های اختصاصی می‌باشد. آنتی سرم‌های مرجع برای بسیاری از تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا، در بز یا گوسفند تهیه شده است. این آنتی سرم‌ها با HA یک جدایه تهیه شده و تک اختصاصی (monospecific) در نظر گرفته می‌شوند (۳۱). در مواردی که آنتی سرم تک اختصاصی در دسترس نباشد، آنتی سرم‌های پلی کلونال پیشنهاد می‌شوند. آنتی سرم مرجع معرفی شده از طرف WHO برای ویروس‌های H9N2، از سویه ۶۶/A/turkey/WI تهیه می‌شود (۲۱). مطالعات فیلوژنی بیانگر همسانی بسیار کمی بین HA ویروس‌های H9N2 جدا شده از آسیا که به دودمان اروپایی - آسیایی تعلق دارند، با این ویروس که از دودمان آمریکای شمالی است وجود دارد (۱۱، ۳۲)؛ بنابراین آنتی سرم مرجع پیشنهادی در ارزیابی ارتباط آنتی‌ژنیک سویه‌های مختلف به‌ویژه سویه واکسن و ویروس‌های در گردش و همچنین ارزیابی پتانسیل ایمنی بخشی واکسن کارایی نخواهد داشت. یک راهکار استفاده از آنتی سرم پلی کلونال اختصاصی آنتی‌ژن در سنجش HI است. با این حال به دلیل رانش (دریافت) متعدد آنتی‌ژنی ویروس آنفلوانزای پرندگان و پیامد برنامه طولانی مدت واکسیناسیون و فشارهای منفی ایمنی، ممکن است آنتی‌سرم‌های معمول در تشخیص و یا تعیین تحت تیپ جدایه‌های جدید که احتمالاً از نظر آنتی‌ژنی با ویروس‌های پیشین متفاوت می‌باشند، غیراختصاصی عمل کنند (۲۸، ۳۳، ۳۴). آنتی سرم اختصاصی که در آزمایش HI استفاده می‌شود، از تزریق ویروس زنده یا غیرفعال شده به جوجه می‌آید. در این روش چون از کل پیکره ویروس استفاده می‌شود، ممکن است وجود پروتئین‌های ناخواسته ویروس و نیز تخم‌مرغ در آنتی سرم مورد استفاده در آزمایش HI، در واکنش اصلی بین پروتئین HA ویروس آنفلوانزا و آنتی سرم اثر نامطلوب داشته و موجب کاهش حساسیت آزمایش شوند (۳۰، ۳۵).

در مطالعه حاضر با هدف ارائه روشی برای تولید آنتی سرم پلی کلونال که بتواند از محدودیت‌های آزمایش HI در تعیین تحت تیپ و تعیین ارتباط آنتی‌ژنیک‌های ویروس‌های همولوگ و هترولوگ در گردش با سویه واکسن بکاهد، ابتدا پتانسیل القای آنتی‌بادی چهار موتیف محافظت شده HA ویروس‌های آنفلوانزا H9N2 ایران با ابزارهای بیوانفورماتیک بررسی شد. بر اساس نتایج پیش‌بینی اپی‌توپ‌های سلول‌های B، پتانسیل آنتی‌ژنیک بودن، سطح در دسترس، میزان آب‌دوست بودن، خصوصیات فیزیکوشیمیایی، ساختمان دوم و توالی‌های متصل‌شونده به MHC کلاس II، موتیف‌های ۲ و ۴ نسبت به دو موتیف دیگر پایدارتر بوده و از پتانسیل آنتی‌ژنیک بیشتری برخوردارند. در ایجاد کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی احتمال برقراری اتصال قوی‌تر و بهتر را دارند، اما از نظر ساختاری موتیف ۲ انعطاف‌پذیرتر بوده و به نظر گزینه مناسب‌تری در برهم‌کنش با آنتی‌بادی است. بیش‌تر مکان‌های آنتی‌ژنی که علیه آن‌ها آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده تولید می‌شود، در سر کروی HA جای گرفته‌اند و پاسخ‌های HI بیشتر به سمت اپی‌توپ‌های اصلی آنتی‌بادی روی زیر واحد HA1 هدایت می‌شوند (۳۶). اگرچه زیر واحد HA2 هم تعدادی مکان‌های آنتی‌ژنیک دارد، اما توالی‌های آن بین تحت تیپ‌های مختلف ویروس آنفلوانزا محافظت شده‌اند؛ بنابراین کاندید مناسبی برای تولید واکسن جامع می‌باشند (۳۶، ۳۷). با بیان موتیف ۲ نو ترکیب، آنتی سرم اختصاصی علیه آن تولید شده و کارایی آن با آنتی سرم به دست آمده از کل پیکره ویروس در آزمایش HI متقاطع ارزیابی شد. آنتی سرمی که از موتیف حفاظت شده تهیه شده بود، با حساسیت و ویژگی بیشتری ویروس‌های هترولوگ را در مقایسه با آنتی سرمی که از کل پیکره ویروس به دست آمده بود، شناسایی کرد. در مطالعات مشابه، Sączynska و همکاران در سال ۲۰۱۷ پس از تزریق پروتئین نو ترکیب HA ویروس آنفلوانزا H5N1 به جوجه‌های SPF، آنتی‌بادی خنثی‌کننده علیه این قطعه را به میزان بالا تولید کردند و ایمنی مناسبی علیه سویه‌های همولوگ و هترولوگ به ترتیب به میزان ۱۰۰ و ۷۰ درصد ایجاد نمودند. اگرچه این مطالعه در ارتباط با تولید آنتی‌بادی محافظت‌کننده علیه H5N1 بود تا برای واکسیناسیون پرندگان مورد استفاده قرار گیرد، اما تولید HA نو ترکیب و ایجاد پاسخ ایمنی مناسب حفاظتی علیه ویروس‌های همولوگ و هترولوگ، بیانگر کاربرد پروتئین نو ترکیب برای ایجاد عیار بالای آنتی‌بادی‌های پلی کلونال حفاظتی علیه بیماری است (۲۵، ۲۶). پروتئین نو ترکیب HA علاوه بر ارتقاء بلوغ سلول‌های دندریتیک، تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی و جلوگیری از گسترش ویروس، سطوح بالای آنتی‌بادی سرمی تولید نموده که آثار قوی ممانعت از همگلوتیناسیون علیه سویه‌های هترولوگ تحت تیپ‌های H1 و H3 را نشان می‌دهد. افزون بر این آنتی‌بادی‌های خالص شده علیه این پروتئین نو ترکیب، به HA‌های مختلف با میل ترکیبی بالا متصل می‌شوند (۲۳، ۳۷). ویژگی و حساسیت آنتی سرم تولید شده علیه پروتئین نو ترکیب HA و نیز HA1

بیان شده در سیستم باکولوویروس و مقایسه آن با ویروس غیرفعال H9N2 بیانگر حساسیت زیاد و ویژگی ۱۰۰ درصد در ارزیابی پنج تحت تیپ مختلف ویروس‌های آنفلوانزا است (۲۶، ۳۵). در مطالعه روی ویروس نیوکاسل، پروتئین HN بیان شده در باکولوویروس به‌عنوان آنتی‌ژن، برای شناسایی و عیارسنجی آنتی‌بادی‌های اختصاصی در سرم جوجه و سرم بوقلمون با موفقیت در آزمون HI استفاده شده است (۳۸).

از زمان تشخیص ویروس‌های H9N2 در ایران، واکسن غیرفعال به طور گسترده در مزارع پرورشی مورد استفاده قرار گرفته است. واکسیناسیون، فشار انتخاب مثبت برای ظهور انواع آنتی‌ژنی وارد می‌کند و تطابق آنتی‌ژنی کمتر با سویه‌های پیشین اغلب ناشی از فشار انتخابی واکسیناسیون می‌باشد (۱۸، ۳۴). توالی HA بیشتر این ویروس‌ها دارای جهش‌های نقطه‌ای است که به تغییر در ناحیه سر کروی HA1، مکان‌های آنتی‌ژنیک H9-A و H9-B، و همچنین از دست دادن اپیتوپ آنتی‌بادی در محل اسیدآمین‌های ۱۹۲ تا ۲۱۸ منجر می‌شود (۷، ۱۱، ۱۵). با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی HA، جهش‌های فرار آنتی‌بادی ویروس‌های H9N2 که حاوی حذف اسیدهای آمینه در حلقه ۲۲۰ در مکان‌های اتصال گیرنده HA بودند، شناسایی شدند. نشان داده شد که این ویروس‌های جهش یافته قادر به فرار از اتصال آنتی سرم پلی‌کلونال می‌باشند (۱۶، ۳۴، ۳۹). در مطالعات مشابه اعلام شده است آنتی‌بادی‌های اختصاصی H9 ناشی از واکسن‌های H9N2 تولید شده با ویروس‌های جدا شده در دهه ۱۹۹۰ در چین، اثر محافظتی ضعیفی در برابر سویه‌های در گردش کنونی ارائه می‌کنند (۶، ۱۳، ۴۰). در دو مطالعه توالی و اطلاعات ساختاری سه‌بعدی گلیکوپروتئین‌های HA همراه با داده‌های مربوط به آزمایش HI برای جدایه‌های ویروس H1N1 انسانی (۱۹۹۷-۲۰۰۹) و ویروس مرجع (H1N1 09) ارزیابی شد. داده‌ها بیانگر این است که جایگزینی یک تا دو اسیدآمین (N125D و/یا N156K) در مکان‌های اصلی آنتی‌ژنی HA ویروس H1N1 09 به طور چشمگیری بر توانایی آنتی‌بادی‌ها در تشخیص ویروس‌های H1N1 در آزمایش HI اثر می‌گذارد (۳۹، ۴۱). از آنجایی که برخی جهش‌های HA در ویروس‌های H9N2 مانند S145N، Q164L، A168T، A198V، M224K و Q234L می‌توانند بر خاصیت آنتی‌ژنیک ویروس‌های آنفلوانزا با تغییر تمایل اتصال گیرنده و تغییر پاسخ‌های آنتی‌بادی اثر بگذارند و سبب ایجاد عیارهای متفاوت HI شوند (۱۵، ۱۸)، در این مطالعه از بخشی از پروتئین HA ویروس H9N2 استفاده شد که فاقد این مکان‌های در معرض فشار انتخاب مثبت باشد تا محدوده حساسیت بالاتری در سنجش سرولوژی با آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده علیه پپتید حفظ شده ایجاد شود. پلی‌کلونال بودن یک آنتی‌بادی امکان چندین عامل آنتی‌ژنیک را فراهم می‌کند تا این آنتی‌بادی در سنجش علیه انواع پروتئین‌های هدف حساس تر باشد. این ویژگی اتصال چند اپی توبی امکان تشخیص آنتی‌ژن را در انواع واریانت‌های آنتی‌ژنی و حتی اگر برخی از این اپی توب‌ها تحت تأثیر تغییر ساختار سوم یا سطح دسترسی قرار گیرند، را فراهم می‌کند (۲، ۳۱). به دلیل ماهیت ناهمگون، آنتی‌بادی پلی‌کلونال ممکن است به اعتبارسنجی دقیق‌تری نسبت به آنتی‌بادی مونوکلونال نیاز داشته باشند. بسیاری از آنتی‌بادی پلی‌کلونال در برابر پروتئین‌های طبیعی یا قطعات بزرگ پروتئینی ایجاد شده و اپی توب‌های متعدد را تشخیص می‌دهند؛ بنابراین احتمال برهم‌کنش با دیگر پروتئین‌ها بسیار زیاد است که یک پاسخ ایمنی ناخواسته ایجاد می‌کند. پپتیدها می‌توانند همانند پروتئین‌ها در تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به طور مؤثر استفاده شوند؛ بی آن که واکنش‌های ناخواسته ایجاد کنند. تولید مناسب و با کیفیت بالای آنتی‌بادی علیه پپتید به انتخاب توالی پپتید، موفقیت در سنتز و بیان پپتید، پاسخ ایمنی هومورال در حیوان میزبان، ادجوان مورد استفاده، دوز پپتید تجویز شده، روش تزریق و خالص‌سازی بستگی دارد (۳۱).

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به اهمیت بیماری آنفلوانزا، بومی بودن ویروس H9N2 در ایران و واکسیناسیون گسترده، مطالعات گوناگونی روی این ویروس انجام می‌شود. این امر اهمیت استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه ویروس را دوچندان می‌کند. انتخاب توالی پپتیدی حیاتی‌ترین مرحله در تولید آنتی‌بادی است. روش‌های محاسباتی پیش‌بینی اپیتوپ سلول B می‌توانند در بیشتر شدن احتمال تولید آنتی‌بادی‌های مؤثرتر کمک کنند. در مطالعه حاضر قابلیت اتصال به آنتی‌بادی با پیش‌بینی وجود اپیتوپ‌های خطی سلول B، پتانسیل آنتی‌ژنیک بودن، سطح دسترسی، میزان آب‌دوستی و خواص فیزیکوشیمیایی قطعه حفاظت شده زیر واحد HA1 پروتئین HA ویروس H9N2 با الگوریتم‌های بیوانفورماتیک پیش‌بینی شد. افزون بر این توانایی و میل ترکیبی اتصال به MHC کلاس II برای آنالیز میان‌کنش‌های آنتی‌بادی با آنتی‌ژن نیز بررسی شد تا بهترین توالی پپتیدی برای تزریق به حیوان و تولید آنتی سرم پلی‌کلونال انتخاب شود. سپس واکنش آنتی سرم پلی‌کلونال به دست آمده با ویروس‌های همولوگ و هتروولوگ با آزمایش HI بررسی شد. با ارزیابی‌های انجام شده این آنتی سرم دارای کارایی مناسب در شناسایی جدایه‌های متفاوت ویروس H9N2 است و در مقایسه با آنتی

سرم معمول با دقت بیشتری اختلاف آنتی ژنی یک تحت تیپ را مشخص می کند. آنتی سرم پلی کلونال حاصل فاقد بازدارنده های غیراختصاصی می باشد که ممکن است تفسیر یافته های سرولوژی را با مشکلاتی مواجه نماید؛ هرچند معتبرسازی آن مستلزم انجام آزمایش با تعداد بیشتر ویروس است.

سیاسگزاری

مطالعه حاضر حاصل پایان نامه دکترای تخصصی بیماری های طیور مصوب دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران می باشد. نویسندگان بر خود لازم می دانند از حمایت های مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی قدردانی نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*. 2007;25(30):5637-44. doi: [10.1016/j.vaccine.2006.10.051](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.10.051) PMID: 17126960
2. Alexander D. Avian influenza-diagnosis. *Zoonoses Public Health*. 2008;55(1):16-23. doi: [10.1111/j.1863-2378.2007.01082.x](https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01082.x) PMID: 18201322
3. Aslan C. Avian influenza; virus characteristics, clinical symptoms and antiviral drugs. *Turk J Agric For*. 2022;10(11):2108-14. doi: [10.24925/turjaf.v10i11.2108-2114.5152](https://doi.org/10.24925/turjaf.v10i11.2108-2114.5152)
4. Recuenco S, Ellison J, Davis C, York I, Turmelle A, Moran D, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(11):426974. doi: [10.1073/pnas.1116200109](https://doi.org/10.1073/pnas.1116200109) PMID: 22371588
5. Peacock TP, James J, Sealy JE, Iqbal M. A global perspective on H9N2 avian influenza virus. *Viruses*. 2019;11(7):620. doi: [10.3390/v11070620](https://doi.org/10.3390/v11070620) PMID: 31284485
6. Guo Y, Krauss S, Senne D, Mo I, Lo K, Xiong X, et al. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology*. 2000;267(2):279-88. doi: [10.1006/viro.1999.0115](https://doi.org/10.1006/viro.1999.0115) PMID: 10662623
7. Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology*. 2001;281(2):156-62. doi: [10.1006/viro.2000.0799](https://doi.org/10.1006/viro.2000.0799) PMID: 11277689
8. Saadat Y, Ghafouri SA, Tehrani F, Langeroudi AG. An active serological survey of antibodies to newcastle disease and avian influenza (H9N2) viruses in the unvaccinated backyard poultry in Bushehr province, Iran, 2012-2013. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014;4:S213-S6. doi: [10.12980/APJTB.4.2014C1293](https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1293) PMID: 25183083
9. Nagy A, Mettenleiter T, Abdelwhab E. A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa. *Epidemiol Infect*. 2017;145(16):3320-33. doi: [10.1017/S0950268817002576](https://doi.org/10.1017/S0950268817002576) PMID: 29168447
10. Park KJ, Kwon H-i, Song M-S, Pascua PNQ, Baek YH, Lee JH, et al. Rapid evolution of low-pathogenic H9N2 avian influenza viruses following poultry vaccination programmes. *J Gen Virol*. 2011;92(1):36-50. doi: [10.1099/vir.0.024992-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.024992-0) PMID: 20861321
11. Shamsavandi S, Salmanian A-H, Ghorashi SA, Masoudi S, Ebrahimi MM. Evolutionary characterization of hemagglutinin gene of H9N2 influenza viruses isolated from Asia. *Res Vet Sci*. 2012;93(1):234-9. doi: [10.1016/j.rvsc.2011.07.033](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.033) PMID: 21907373
12. Swayne DE. The role of vaccines and vaccination in high pathogenicity avian influenza control and eradication. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(8):877-80. doi: [10.1586/erv.12.60](https://doi.org/10.1586/erv.12.60) PMID: 23002966
13. Gu M, Xu L, Wang X, Liu X. Current situation of H9N2 subtype avian influenza in China. *Vet Res*. 2017;48:1-10. doi: [10.1186/s13567-017-0453-2](https://doi.org/10.1186/s13567-017-0453-2) PMID: 28915920

14. Naeem K, Siddique N. Use of strategic vaccination for the control of avian influenza in Pakistan. *Dev Biol (Basel)*. 2006;124:145-50. [PMID: 16447505](#)
15. Li Y, Bostick DL, Sullivan CB, Myers JL, Griesemer SB, StGeorge K, et al. Single hemagglutinin mutations that alter both antigenicity and receptor binding avidity influence influenza virus antigenic clustering. *J Virol*. 2013;87(17):9904-10. [doi: 10.1128/JVI.01023-13](#) [PMID: 23824816](#)
16. Peacock TP, Benton DJ, James J, Sadeyen J-R, Chang P, Sealy JE, et al. Immune escape variants of H9N2 influenza viruses containing deletions at the hemagglutinin receptor binding site retain fitness in vivo and display enhanced zoonotic characteristics. *J Virol*. 2017;91(14):e00218-17. [doi: 10.1128/JVI.00218-17](#) [PMID: 28468875](#)
17. Zhu R, Xu S, Sun W, Li Q, Wang S, Shi H, et al. HA gene amino acid mutations contribute to antigenic variation and immune escape of H9N2 influenza virus. *Virol J*. 2022;53(1):1-11. [doi: 10.1186/s13567-022-01058-5](#) [PMID: 35706014](#)
18. Chen X, Liu S, Goraya MU, Maarouf M, Huang S, Chen JL. Host immune response to influenza a virus infection. *Front Immunol*. 2018;5(9):320. [doi: 10.3389/fimmu.2018.00320](#) [PMID: 29556226](#)
19. Ilyushina NA, Komatsu TE, Ince WL, Donaldson EF, Lee N, O'Rear JJ, et al. Influenza a virus hemagglutinin mutations associated with use of neuraminidase inhibitors correlate with decreased inhibition by anti-influenza antibodies. *Virol J*. 2019;16(1):1-9. [doi: 10.1186/s12985-019-1258-x](#) [PMID: 31783761](#)
20. Comin A, Toft N, Stegeman A, Klinkenberg D, Marangon S. Serological diagnosis of avian influenza in poultry: is the haemagglutination inhibition test really the 'gold standard'? *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(3):257-64. [doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.00391.x](#) [PMID: 22694208](#)
21. El Zowalaty ME, Bustin SA, Hussein MI, Ashour HM. Avian influenza: virology, diagnosis and surveillance. *Future Microbiol*. 2013;8(9):1209-27. [doi: 10.2217/fmb.13.81](#) [PMID: 24020746](#)
22. Root JJ, Shriner SA. Avian influenza a virus associations in wild, terrestrial mammals: A review of potential synanthropic vectors to poultry facilities. *Viruses*. 2020;12(12):1352. [doi: 10.3390/v12121352](#) [PMID: 33256041](#)
23. Zacour M, Ward BJ, Brewer A, Tang P, Boivin G, Li Y, et al. Standardization of hemagglutination inhibition assay for influenza serology allows for high reproducibility between laboratories. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(3):236-42. [doi: 10.3390/v12121352](#) [PMID: 26818953](#)
24. Ascoli CA, Aggeler B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *Biotechniques*. 2018;65(3):127-136. [doi: 10.2144/btn-2018-0065](#) [PMID: 30089399](#)
25. Sączyńska V, Romanik A, Florys K, Cecuda-Adamczewska V, Kęsik-Brodacka M, Śmietanka K, et al. A novel hemagglutinin protein produced in bacteria protects chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses by inducing H5 subtype-specific neutralizing antibodies. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172008. [doi: 10.1371/journal.pone.0172008](#) [PMID: 28212428](#)
26. Shahsavandi S, Salmanian A-H, Ghorashi SA, Masoudi S, Fotouhi F, Ebrahimi MM. Development of rHA1-ELISA for specific and sensitive detection of H9 subtype influenza virus. *J Virol Methods*. 2011;171(1):260-3. [doi: 10.1016/j.jviromet.2010.11.012](#) [PMID: 21111002](#)
27. Bradford N. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of a protein isolated from red cell membranes. *Anal Biochem*. 1976;72(248):e254. [doi: 10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](#) [PMID: 942051](#)
28. Lee D-H, Song C-S. H9N2 avian influenza virus in Korea: evolution and vaccination. *Clin Exp Vaccine Res*. 2013;2(1):26-33. [doi: 10.7774/cevr.2013.2.1.26](#) [PMID: 23596587](#)
29. Shahsavandi SEMM. *Influenza*. 1st ed. Academic Jihad Publishing Organization. Tehran, Iran. 2013;p.116.
30. Kirchenbaum GA, Sautto GA, Richardson RA, Ecker JW, Ross TM. A competitive hemagglutination inhibition assay for dissecting functional antibody activity against influenza virus. *J Virol*. 2021;95(23):e0237920. [doi: 10.1128/JVI.02379-20](#) [PMID: 34523961](#)
31. Leenaars M, Hendriksen CF. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J*. 2005;46(3):269-79. [doi: 10.1093/ilar.46.3.269](#) [PMID: 15953834](#)

32. Banks J, Speidel E, Harris P, Alexander D. Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. *Avian Pathol.* 2000;29(4):353-9. [doi: 10.1080/03079450050118485](https://doi.org/10.1080/03079450050118485) PMID: 19184825
33. Mehmood M, Anwar H, Noreen S, Hassan S-u, Ahmad S, Mirza K. Raising of polyclonal hyperimmune sera in broilers against avian influenza virus subtypes H5N1, H7N3, H9N2 and Newcastle disease virus for diagnostics and therapeutics. *Int J Vet Sci Anim Husb.* 2018;3(5):95-9.
34. Peacock T, Reddy K, James J, Adamiak B, Barclay W, Shelton H, et al. Antigenic mapping of an H9N2 avian influenza virus reveals two discrete antigenic sites and a novel mechanism of immune escape. *Scientific reports.* 2016;6(1):18745. [doi: 10.1038/srep18745](https://doi.org/10.1038/srep18745) PMID: 26738561
35. Shahsavandi S, Salmanian A-H, Ghorashi SA, Masoudi S, Fotouhi F, Ebrahimi MM. Specific subtyping of influenza A virus using a recombinant hemagglutinin protein expressed in baculovirus. *Mol Biol Rep.* 2011;38:3293-8. [doi: 10.1007/s11033-010-0434-2](https://doi.org/10.1007/s11033-010-0434-2) PMID: 21110118
36. Te Beest DE, de Bruin E, Imholz S, Koopmans M, van Boven M. Heterosubtypic cross-reactivity of HA1 antibodies to influenza A, with emphasis on nonhuman subtypes (H5N1, H7N7, H9N2). *PLoS One.* 2017;12(7):e0181093. [doi: 10.1371/journal.pone.0181093](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181093) PMID: 28715468
37. Kostolanský F, Tomčíková K, Briestenská K, Mikušová M, Varečková E. Universal anti-influenza vaccines based on viral HA2 and M2e antigens. *Acta Virol.* 2020;64(4):417-26. [doi: 10.4149/av_2020_408](https://doi.org/10.4149/av_2020_408) PMID: 33151738
38. Heckert RA, Nagy E. Evaluation of the hemagglutination-inhibition assay using a baculovirus-expressed hemagglutinin-neuraminidase protein for detection of Newcastle disease virus antibodies. *J Vet Diagn Invest.* 1999;11(1):99-102. [doi: 10.1177/104063879901100118](https://doi.org/10.1177/104063879901100118) PMID: 9925222
39. Stanekova Z, Mucha V, Sladkova T, Blaškovičová H, Kostolanský F, Varečková E. Epitope specificity of anti-HA2 antibodies induced in humans during influenza infection. *Influenza Other Respir Viruses.* 2012;6(6):389-95. [doi: 10.1111/j.1750-2659.2011.00328.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00328.x) PMID: 22236105
40. Sun Y, Liu J. H9N2 influenza virus in China: a cause of concern. *Protein Cell.* 2015;6(1):18-25. [doi: 10.1007/s13238-014-0111-7](https://doi.org/10.1007/s13238-014-0111-7) PMID: 25384439
41. Yurie H, Ikeguchi R, Aoyama T, Kaizawa Y, Tajino J, Ito A, et al. The efficacy of a scaffold-free Bio 3D conduit developed from human fibroblasts on peripheral nerve regeneration in a rat sciatic nerve model. *PloS one.* 2017;12(2):e0171448. [doi: 10.1371/journal.pone.0171448](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171448) PMID: 28192527