

تعیین توالی و آنالیز فیلوژنتیک ژن نور آمینیداز ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H_9N_2 پرندگان در ایران

دکتر حسن نوروزیان^۱، دکتر مهدی وصفی مرندی^{۲*}، دکتر سید علی قریشی^۳

(۱) گروه آموزشی دامپزشکی، آموزشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد- ایران.

(۲) گروه آموزشی علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران- ایران.

(۳) مرکز تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران، تهران- ایران.

(دریافت مقاله: ۱۲ اسفند ماه ۱۳۸۸، پذیرش نهایی: ۱۱ مرداد ماه ۱۳۸۹)

چکیده

بیماری آنفلوانزا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی طیور صنعتی است. در این مطالعه، توالی ژن نور آمینیداز دوسویه ویروس آنفلوانزای طیور شامل $A/Chicken/Iran/ZMT-101/1998$ و $A/Chicken/Iran/NGV-1/2006$ مورد بررسی قرار گرفت. ویروس اولی در سال ۱۳۷۷ از موارد اولیه همه‌گیری آنفلوانزا و ویروس دومی از همه‌گیری آنفلوانزای طیور در گله‌های گاوشتی با تلفات بالا در سال ۱۳۸۵ جدا شده است. آمینواسیدهای محل جذب خونی یا HB (Hemadsorbing) پروتئین نور آمینیداز این دوسویه، تفاوت‌هایی با یکدیگر و با دیگر ویروس‌های جدا شده از ایران نشان دادند. هیچ‌گونه حذف یا درون پیوستگی یا تغییر در اندازه ساقه پروتئین نور آمینیداز در این سویه‌ها و دیگر جدایه‌های ایران دیده نشد. الگوی جایگاه‌های احتمالی گلیکوزیلاسیون در این دوسویه مشابه دیگر جدایه‌های آنفلوانزا بود. آنالیز فیلوژنتیکی ژن H_9N_2 این دوسویه، در مقایسه با دیگر جدایه‌های H_9N_2 نشان داد که هر دوسویه، در زیر دسته ویروس $A/Quail/HongKong/G1/1997 (H_9N_2)$ قرار می‌گیرند. سویه $A/Chicken/Iran/ZMT-101/1998$ با دیگر جدایه‌های ایران در یک گروه و سویه $A/Chicken/Iran/NGV-1/2006$ در کنار ویروس‌های H_9N_2 پاکستان، در گروه دیگری در این زیر دسته قرار گرفتند. نتایج مطالعه حاضر حاکی از تغییرات قابل توجه ژن و پروتئین نور آمینیداز (N_2) سویه اخیر ایران ($A/Chicken/Iran/NGV-1/2006$) در مقایسه با جدایه‌های قبلی است، که ممکن است منجر به تغییرات قابل توجه در خصوصیات بیولوژیکی و آنتی ژنیک ویروس‌های آنفلوانزای در حال چرخش در گله‌های طیور ایران، شده باشد. این تغییرات می‌تواند منجر به کاهش کارایی واکسیناسیون در بیماری آنفلوانزای طیور گردد. فلذا، بررسی میزان همولوژی ژن‌های ویروس‌های آنفلوانزای رایج در فیلد با ویروس واکسینال H_9N_2 ضروری است.

واژه‌های کلیدی: آنفلوانزای طیور (H_9N_2)، نور آمینیداز (N_2)، جذب خونی (HB)، آنالیز فیلوژنی.

دارد که نور آمینیداز ویروس‌های آنفلوانزا در تعیین طیف میزبانی، حدت ویروس و مونتاز پروتئین‌های ویروس دخالت دارد (۵،۶،۹،۱۰،۱۷،۱۸،۲۰،۲۵،۲۷،۳۳،۳۶).

تحت تیپ H_9N_2 ویروس‌های آنفلوانزا برای اولین بار در سال ۱۹۶۶ از بوقلمون‌ها، در آمریکا جدا شد. ویروس‌های این تحت تیپ تا قبل از اوایل دهه نود میلادی از پرندگان آبی جدا نشده بودند، اما هیچ‌گاه به عنوان تحت تیپ غالب در طیور صنعتی در یک منطقه جغرافیایی وسیع گزارش نشده بود. اولین گزارش جداسازی تحت تیپ H_9N_2 در آسیا مربوط به ۱۹۹۲ و ۱۹۹۴ از چین بوده است. از اواسط دهه نود، به خصوص در آسیا، H_9N_2 به تحت تیپ غالب طیور تبدیل شده است. در نیمه دوم دهه نود، این تحت تیپ از کشورهای آلمان، ایتالیا، بلغارستان، ایرلند، انگلستان، آفریقای جنوبی، چین، کره، هنگ کنگ، پاکستان، ایران، عربستان، امارات متحده عربی و فلسطین اشغالی گزارش شده است (۳). در ایران هم تحت تیپ H_9N_2 در سال ۱۳۷۷ به سرعت در جمعیت طیور سراسر کشور گسترده شد و تا کنون مکرراً، از عفونت‌های تنفسی طیور صنعتی جدا شده است (۲۹،۳۰،۳۷).

مطالعات مختلفی درباره آنالیز آنتی ژنیک و فیلوژنتیکی، ژن

مقدمه

آنفلوانزا یک عفونت و یا بیماری است که به وسیله ویروس‌های تیپ A خانواده اورتومیکسوویریده در طیور و پستانداران ایجاد می‌شود. پروتئین‌های هم‌گلوپروتئین (HA یا H) و نور آمینیداز (NA یا N)، دو گلیکوپروتئین اصلی ویروس‌های آنفلوانزا هستند. یکی از خصوصیات مهم ویروس آنفلوانزا تغییرات مکرر آنتی ژنیک در گذر سال‌ها بوده است که به دو دسته تغییرات جزئی (Drift) و کلی (Shift) تقسیم می‌شود (۳۲،۳۵،۳۸).

پروتئین نور آمینیداز به وسیله قطعه شش ژنوم ویروس آنفلوانزا، کد می‌شود و یک گلیکوپروتئین غشایی و دومین آنتی ژن سطحی مهم ویروس است. نور آمینیداز اسید سیالیک را، از انتهای گلیکوپروتئین‌ها جدا می‌کند و به این طریق باعث آزاد شدن ذرات ویروسی از سلول‌های میزبان و تسهیل گسترش ویروس می‌شود. توالی ژن NA همانند ژن HA به شدت دچار جهش می‌شود. تاکنون ۹ تحت تیپ نور آمینیداز ویروس‌های آنفلوانزا اعم از دامی و انسانی، شناخته شده‌اند. به علاوه در داخل هر تحت تیپ واریانت‌هایی هم گزارش شده است. شواهدی وجود



فوق به مدت یک ساعت در ۴۳ درجه سانتی گراد در گرمخانه نگهداری شد. آزمایش PCR: آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن N2 با توالی Sense (3'-AGCAAAAGCAGGAGTGAAAATGAA-5') و Antisense (3'-5-TTCTAAAATTGCGAAAGCTTATAT-5') که توسط کامرون و همکاران طراحی شده بود (۷) در حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر با استفاده از ۵ میکرولیتر cDNA، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰x PCR، ۱/۵ میکرولیتر (۵۰ MgCl2 mM)، ۱ میکرولیتر (۱۰ dNTPs mM)، ۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای سنس و آنتی سنس (۱۰ pmol)، نیم میکرولیتر Taq DNA پلی مزاز (2.5 U) و ۳۳ میکرولیتر DEPC H2O (سیناژن) انجام گرفت. برنامه حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه به مدت دو دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد، سپس ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون به مدت یک دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال پرایمر به مدت یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و در انتها، گسترش نهایی به مدت ده دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد، با استفاده از ترموسایکلر (Eppendorf Co.) انجام گردید.

الکتروفوروز و رنگ آمیزی: محصول PCR به روش الکتروفوروز روی ژل آگاروز و سپس با رنگ آمیزی توسط محلول اتیدیوم بروماید نمایان شد. محصول تکثیر شده قطعه ای به طول ۱۴۴۷ bp بود و برای تعیین حدود اندازه آن از DNA Ladder 100 (Fermentas) استفاده شد.

تخلیص و تعیین مقدار محصول PCR جهت تعیین توالی: عمل استخراج DNA از ژل با استفاده از کیت استخراج محصول PCR با خلوص بالا (Roche No. 1732668)، انجام گردید. پس از جداسازی باندهای مورد نظر از روی ژل، محصول PCR مطابق دستورالعمل کیت، تخلیص گردید. برای تعیین مقدار محصول PCR از مارکر DNA (Fermentas) استفاده شد.

کلون کردن محصول PCR: کلون کردن محصول PCR با استفاده از کیت (Fermentas) TA cloneTM PCR و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. این کیت حاوی ناقل کلون تحت عنوان pT257R/T^æ یک سیستم TA برای کلون کردن مستقیم قطعات DNA محصول PCR است که در انتهای ۳ خود ناحیه تک رشته ای dA دارد. این ناحیه به وسیله آنزیم های DNA پلی مزازهای مقاوم به حرارت (مثل Taq) ایجاد می شود. پس از تعیین غلظت محصول PCR تخلیص شده با استفاده از مارکر روی ژل، مقدار مناسب از آن با محلول لیگاسیون مخلوط شده و مرحله لیگاسیون انجام گردید و سپس در مرحله ترانسفورماسیون، محصول لیگاسیون به محلول حاوی باکتری های E. Coli سویه TOP10 و پلاسمید Supercoil اضافه و در محیط LB کشت داده شدند. به منظور اطمینان از ورود موفق قطعه مورد نظر به درون پلاسمید، PCR بر روی کلنی های باکتریائی، انجام گردید. سپس کلنی های منفرد به دست آمده در محیط مایع LB کشت و پلاسمید استخراج شد و در نهایت از پلاسمید حاوی DNA الحاقی برای تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن نورآمینیداز استفاده شد. سپس نمونه برای تعیین توالی به شرکت MWG آلمان

نورآمینیداز ویروس های آنفلوآنزای H₉N₂ آسیا انجام شده است (۲۴، ۲۳، ۲۲، ۱۲، ۱۱، ۱۰). بر حسب آنالیز فیلوژنتیکی ژن N₂، ویروس های آنفلوآنزای سه دسته مجزا، شامل ویروس های جدا شده از طیور آمریکای شمالی (North American H₉N₂)، ویروس های جدا شده از انسان و خوک (Human and swine H₉N₂) و ویروس های جدا شده از پرندگان در اروپا - آسیا (Euroasian H₉N₂) تقسیم می شوند. ویروس های آنفلوآنزای طیور دسته اروپا - آسیا خود به چهار زیر دسته مشتمل بر زیر دسته آکه مربوط به ویروس های جدا شده از کشورهای کره و ژاپن است. زیر دسته II که نماینده آنها ویروس Qa/HK/G1/97 بوده و شامل ویروس های آنفلوآنزای H₉N₂ جدا شده از انسان در هنگ کنگ و ویروس های H₉N₂ جدا شده از کشورهای خاورمیانه و پاکستان است. زیر دسته III، که نماینده آن ویروس Ck/HK/G9/97 است و زیر دسته IV که نماینده آنها ویروس Dk/HK/Y280/97 است (۲۳، ۱۱).

Kiyanzadeh و همکاران در سال ۱۳۸۷ در مورد آنالیز فیلوژنتیکی ژن N₂ جدایه های H₉N₂ ایران در فاصله سال های ۲۰۰۱-۱۹۹۸ مطالعه ای انجام داده اند. بررسی آنها نشان داد که توالی آمینواسیدی ناحیه HB در کلیه جدایه های مطالعه شده، مشابه است (۱۴). هدف از انجام این مطالعه تعیین توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی کامل ژن نورآمینیداز دو جدایه H₉N₂ ایران مربوط به سال های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۶ و تعیین جایگاه آنها در درخت فیلوژنی به منظور نشان دادن میزان تغییرات رخ داده در حدود ده سال گذشته می باشد.

مواد و روش کار

جداسازی ویروس: جداسازی ویروس های آنفلوآنزای نمونه های بافتی، مطابق روش استاندارد انجام گرفت (۳۲). به طور خلاصه، سوسپانسیون کلیه نمونه ها در PBS با pH 7.4-7.4 حاوی آنتی بیوتیک تهیه شد. مقدار ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون هر نمونه، به داخل حفره آلانئوتیک ۳ عدد تخم مرغ جنین دار ۱۱ روزه تلقیح شد. مایع آلانئوتیک برداشت شده از نظر فعالیت همآگلوتیناسیون (HA)، بررسی گردید.

استخراج RNA: مایعات آلانئوتیک حاوی سویه ویروسی متعلق به سال ۱۳۷۷ A/Chicken/Iran/ZMT-101/98 و یکی از ویروس های جدا شده در سال ۱۳۸۵ (A/Chicken/Iran/NGV-1/06)، جهت انجام PCR-RT استفاده شد. استخراج RNA با استفاده از محلول RNXTM-Plus بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (سیناژن) انجام گردید.

آزمایش RT: آزمایش رونوشت برداری معکوس یا (RT) Reverse Transcription با استفاده از ۴ میکرولیتر بافر RT ۵x، ۲ میکرولیتر (۱۰ dNTPs mM)، ۲ میکرولیتر پرایمر (۲۰ Uni-12 pmol) با توالی 3'-AGC AAA AGC AGG-5'، یک میکرولیتر آنزیم (۲۰ U) (Fermentas) M-MVLV RT، نیم میکرولیتر ممانعت کننده (۲۰ RNaseU)، ۵ میکرولیتر template RNA و ۵/۵ میکرولیتر DEPC H₂O (سیناژن) در مجموع با حجم ۲۰ میکرولیتر، انجام گردید. مخلوط



جدول ۱- این جدول میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی N2 ویروس های H₉N₂ جدا شده در سال های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۶، با سایر سویه های ایران و پاکستان استخراج شده از بانک ژن را، نشان می دهد (* اعداد بر حسب درصد می باشد).

	Ch-Ir 430 98	Ch-Ir 11T 99	Ch-Ir RZ2808	Ch-Ir RZ3608	Ch-Ir RZ3708	Ch-Ir RZ4208	PK-PK Chi-197	Ch-PK 499
Ch-Ir ZMT-101-98	*۹۹/۶	۹۹/۷	۹۳/۶	۹۳/۵	۹۳/۶	۹۳/۵	۹۹/۳	۹۸/۲
Ch-Ir NGV-106	۹۳/۱	۹۴/۴	۹۷/۱	۹۷	۹۷	۹۷	۹۵	۹۵/۲

جدول ۲- این جدول میزان شباهت توالی آمینو اسیدی N2 ویروس های H₉N₂ جدا شده در سال های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۶، با سایر سویه های ایران و پاکستان استخراج شده از بانک ژن را، نشان می دهد (* اعداد بر حسب درصد می باشد).

	Ch-Ir 430 98	Ch-Ir 11T 99	Ch-Ir RZ2808	Ch-Ir RZ4208	Ch-Ir RZ3708	Ch-Ir B102 08	PK-PK Chi-197	Ch-PK 499
Ch-Ir ZMT-101-98	*۱۰۰	۹۹/۸	۹۴	۹۴	۹۴/۲	۹۴/۲	۹۸/۷	۹۷/۲
Ch-Ir NGV-106	۹۳/۹	۹۳/۶	۹۷/۲	۹۷/۲	۹۷	۹۸/۵	۹۴/۷	۹۴/۲

جدول ۳- این جدول مقایسه توالی آمینو اسیدی جایگاه های مرتبط با فعالیت HB و حذف در ساقه پروتئین نورآمینیداز سویه های ایران را با سایر سویه های تحت تیپ H₉N₂ استخراج شده از بانک ژن، نشان می دهد (سویه های بررسی شده در این مطالعه با علامت * نشان داده شده است).

ویروس های آنفلوانزای طیور	تحت تیپ	حذف	جایگاه های مرتبط با همادذوری		
			۳۶۶-۳۷۳	۳۹۹-۴۰۴	۴۳۱-۴۳۳
Ir-Ch-11T-99	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-ZMT-101-98*	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-430-98	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Sa-Ch-532-99	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-496-99	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-738-99	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-327-00	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-261-01	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-675-01	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-R253-06	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Hk-Qa-01-97	H9	38-39	KKK	SRAG	DDN
Hk-Ch-69-97	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Hk-1074-99	H9	38-39	KKK	SRAG	DDN
Bj-Ch-1-94	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Hk-Dk-T280-97	H9	63-65	KKK	SRAG	DDN
PK-Chiba-1-97	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
PK-Ch-4-99	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-NVG-06*	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-R228-08	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-R236-08	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-R237-08	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Dub-Ch-338-01	H9	ND	KKK	SRAG	DDN
Ir-Ch-R242-08	H9	ND	KKK	SRAG	DDN

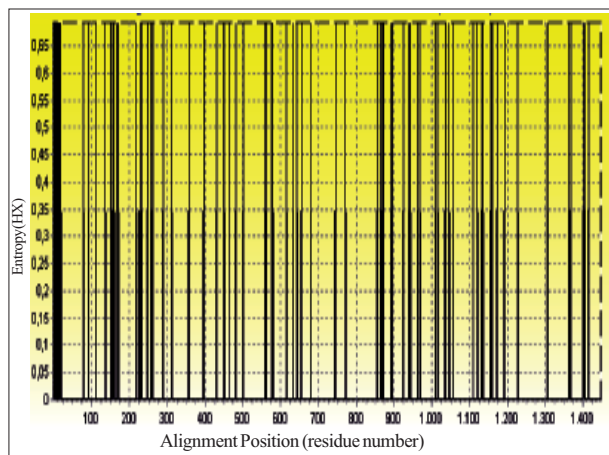
گله های درگیر آنفلوانزای طیور به دست آمده بود (1/06- فرستاده شد).

آنالیز فیلوژنتیک: تمام توالی های نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی نورآمینیداز بررسی شده با استفاده از نرم افزار رایانه ای Inc. BioEdit ClustralW MegAlign 5-1993-2001 DNASTAR مقایسه و درخت فیلوژنتیک ترسیم شد. تمامی توالی های نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی مورد استفاده در این مطالعه، از بانک ژن (www.ncbi.nlm.nih.gov) اخذ گردید. توالی های نوکلئوتیدی سویه های (H₉N₂) A/Chicken/Iran/ZMT-101/98 و (H₉N₂) A/Chicken/Iran/NGV تعیین شده در این مطالعه، به ترتیب با شماره های دسترسی EF078977 و EF044307 در Genbank ثبت گردید.

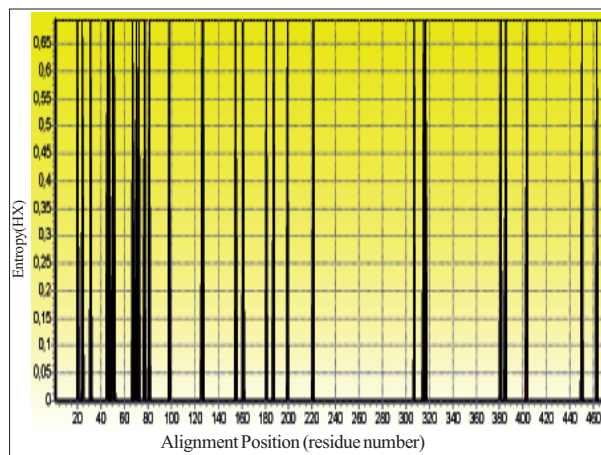
مقایسه توالی جدایه های H₉N₂: از مقایسه توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی جدایه های بررسی شده در این مطالعه با دیگر ویروس های H₉N₂ (جدول ۱، ۲) مشخص شد که سویه (H₉N₂) A/Chicken/Iran/ZMT-101/98 بیشترین میزان شباهت نوکلئوتیدی با سویه های همزمان خود در ایران (H₉N₂) A/Chicken/Iran/430/98 (۹۹/۶ درصد) و (H₉N₂) A/Chicken/Iran/11T/99 (۹۹/۷ درصد) و سویه (H₉N₂) A/Parakeet/Chiba/1/97 (۹۹/۳ درصد) و بیشترین میزان شباهت آمینو اسیدی با همان سویه ها (H₉N₂) A/Chicken/Iran/430/98 (۱۰۰ درصد) و (H₉N₂) A/Chicken/Iran/11T/99 (۹۹/۸ درصد) و (H₉N₂) A/Parakeet/Chiba/1/97 (۹۸/۷ درصد) دارد. در حالی که سویه سال ۱۳۸۵ ایران، A/Chicken/Iran/NGV-1/06،

نتایج
توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی سویه های ZMT-101/98 و MGV/006: در این مطالعه توالی قطعه ای به طول ۱۴۴۷ bp از ژن نورآمینیداز دو سویه ویروس آنفلوانزا که در سال های ۱۳۷۷ و ۱۳۸۵ از





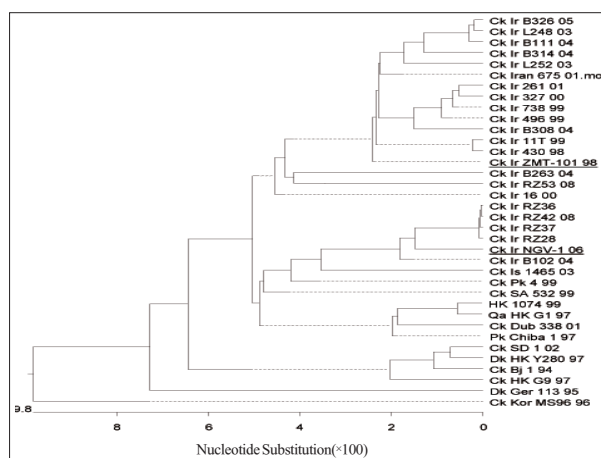
تصویر ۲- این تصویر میزان اختلاف توالی نوکلئوتیدی N2 ویروس های H₉N₂ جدا شده در سال های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۶ به تعداد ۱۴۵۰ باز نوکلئوتید (bp) را نشان می دهد.



تصویر ۱- این تصویر میزان اختلاف توالی آمینو اسیدی N2 ویروس های H₉N₂ جدا شده در سال های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۶ به تعداد ۴۶۶ اسید آمینه را نشان می دهد.

به طوری که در سویه A/Chicken/Iran/ZMT-101/98 و دیگر سویه های ایران مربوط به سال های ۲۰۰۱-۱۹۹۸ DSDNLS و در سویه 1/06- /Pakistan/4/99(H₉N₂) و سویه های A/Chicken/IR/NGV/G1/97 (H₉N₂) و A/Parakeet/Chiba/1/97(H₉N₂) و A/Chicken/Qail/HongKong/1074/99(H₉N₂) و A/HongKong/Y280/97(H₉N₂) و A/Duck/HongKong/433-430 در جایگاه ۴۳۳-۴۳۰ همه ویروس های H₉N₂ بررسی شده در این مطالعه PQE بود. حذف (Deletion) در توالی نوکلئوتیدی سویه های به دست آمده در این مطالعه مشاهده نشد. ویروس های A/Qail/HongKong/G1/97 (H₉N₂) و A/HongKong/1074/99(H₉N₂) در محل ساقه پروتئین نورآمینیداز (جایگاه های ۳۸۰، ۳۹) دچار حذف شده اند. این حذف در ویروس های ایران، پاکستان و خاور میانه دیده نشد (جدول ۳).

آنالیز فیلوژنتیک: درخت فیلوژنتیک رسم شده در تصویر ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج آنالیز فیلوژنتیک، ژن N2 ویروس های H₉N₂ به دست آمده از قاره آسیا (دسته Eurasia) به طور کلی به ۴ زیر دسته تقسیم می شوند. زیر دسته I شامل ویروس Chicken/Korea/Ms96/96 و A/Duck/HongKong/Y280/97 است. زیر دسته II شامل ویروس A/Chicken/HongKong/G1/97 و A/Chicken/Iran/B102/04 (H₉N₂) است. در گروه A-III ویروس های A/HongKong/1074/99(H₉N₂) قرار می گیرد و در گروه B-III ویروس A/Chicken/Iran/NGV-1/06 قرار می گیرد. در گروه A-IV ویروس های A/Chicken/Pakistan/4/99 قرار می گیرد. در زیر دسته IV تمامی ویروس های H₉N₂ قدیمی تر جدا شده از ایران در کنار ویروس (H₉N₂) A/Parakeet/Chiba/1/97 قرار می گیرند. میزان نزدیکی زیر دسته III و IV بیش از زیر دسته های I و II است.



تصویر ۳- آنالیز فیلوژنتیک ژن نورآمینیداز ویروس های H₉N₂ جدا شده از ایران در دسته آسیا-اروپا، خطوط افقی متناسب با حداقل تعداد تفاوت نوکلئوتیدی لازم برای اتصال گره (Nodes) و توالی ها است. زیر ویروس های جدا شده در این مطالعه خط کشیده شده است.

بیشترین میزان شباهت نوکلئوتیدی با ویروس های H₉N₂ (RZ28/08) A/Chicken/Iran/RZ36/08 (H₉N₂) (۹۷/۱ درصد)، A/Chicken/Iran/RZ37/08 (H₉N₂) (۹۷ درصد) و A/Chicken/Iran/RZ42/08 (H₉N₂) (۹۷ درصد) و A/Parakeet/Chiba/1/97 (H₉N₂) (۹۵/۲ درصد) و شباهت آمینواسیدی با ویروس های A/Chicken/Iran/B102/04 (H₉N₂) (۹۸/۵ درصد) و A/Chicken/Iran/RZ28/08 (H₉N₂) (۹۷/۲ درصد) و A/Parakeet/Chiba/1/97 (H₉N₂) (۹۴/۷ درصد) دارد.

در جدول ۳ توالی آمینواسیدی جایگاه های مرتبط با فعالیت HB پروتئین نورآمینیداز بین سویه های این مطالعه و سایر ویروس های H₉N₂ مقایسه شده است. توالی آمینواسیدی جایگاه های ۳۶۶-۳۷۳ در سویه های ایران و خاور میانه و پاکستان عمدتاً IKKDSRAG بود. ولی در جایگاه های ۳۹۹-۴۰۴، تنوع بیشتری در سویه های مختلف مشاهده شد.



بحث

در مطالعه Liu و همکاران در سال ۲۰۰۳ توالی آمینواسیدی ژن نورآمینیداز (N2) جدایه‌های ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H₉N₂ که از مزارع پرورش طیور کشور چین طی سال‌های ۲۰۰۲-۱۹۹۵ به دست آمده بود، در جایگاه‌های ۳۷۳-۳۶۶-۴۰۴-۳۹۹ مربوط به فعالیت HB پروتئین نورآمینیداز، با دیگر ویروس‌های H₉N₂ تفاوت داشت. اما در بین جدایه‌های چین توالی جایگاه‌های HB تا حدی مشابه و حفاظت شده بود (۲۳). تغییراتی در آمینواسیدهای مرتبط با فعالیت HB در پروتئین نورآمینیداز ویروس‌های امارات هم گزارش شده است (۱). Matrosovich و همکاران در سال ۲۰۰۱ معتقدند که جایگاه‌های HB پروتئین نورآمینیداز در ویروس‌های آنفلوانزای H₉N₂ در آسیا تحت فشار انتخابی مثبت قرار دارند و تغییر در جایگاه‌های HB توانایی ویروس‌های H₉N₂ را در تکثیر و تطابق با میزبان، افزایش داده است (۲۶). این فشار انتخابی ممکن است ناشی از فشار ایمنی میزبان باشد و واکنش‌های گسترده طیور علیه تحت تیپ H₉N₂ ویروس آنفلوانزا، آن را تقویت کند.

در مطالعه حاضر نیز تغییراتی در جایگاه‌های مرتبط با فعالیت HB پروتئین نورآمینیداز به ویژه در جدایه Ck/Ir/NGV-1/06 مشاهده شد. اما در بین جدایه‌های ویروس آنفلوانزا H₉N₂ کشور ما هم، توالی سایر جایگاه‌های HB تا حدی مشابه و حفاظت شده است (جدول ۳). با توجه به این که واکنش‌های غیرفعال H₉N₂ در چین و کشور ما از سال‌های ابتدای شروع همه‌گیری آنفلوانزا در طیور به طور گسترده‌ای به کار رفته است. احتمالاً، ایمنی ناشی از واکنش‌های ایمنی می‌تواند نقش مهمی در تغییر توالی آمینواسیدی جایگاه‌های HB داشته باشند (۲۳). همچنین ممکن است تغییرات مشاهده شده در جایگاه‌های HB پروتئین نورآمینیداز، از ادامه چرخش ویروس‌های آنفلوانزا H₉N₂ در منطقه خاورمیانه از زمان ظهور آنها در سال ۱۹۹۷ ناشی شده باشد. اگرچه با وجود همه این تغییرات، ویروس‌های آنفلوانزا H₉N₂ خاورمیانه (از جمله ویروس 1/06-Ck/Ir/NGV) هم چنان در دسته G1 قرار می‌گیرند (تصویر ۳).

تمام جدایه‌های ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H₉N₂ چین که در فاصله سال‌های ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۲ جدا شده‌اند، در جایگاه‌های آمینواسیدی ۶۵-۶۳-۴۳ حذف سه آمینواسید شده‌اند (۳۹، ۲۳). در پروتئین N2 ویروس آنفلوانزا H₉N₂ اولیه جدا شده در کشور چین در سال ۱۹۹۴ (A/Chicken/Beijing/1/94)، ویروس‌های آنفلوانزای H₉N₂ جدا شده از کره، و ویروس‌های H₉N₂ انسان و خوک و زیردسته (Ck/HK/G9/97) G9، هیچ حذف آمینواسیدی مشاهده نشده است. شباهت جدایه‌های چین از نظر حذف سه آمینواسید نشان می‌دهد که گروه این جدایه‌ها مستقل از سایر زیردسته‌ها، تکامل یافته است و عامل این استقلال تکاملی احتمالاً محدوده جغرافیایی مجزا بوده است (۲۳). در مورد ویروس‌های زیردسته G1 شامل ویروس Qa/HK/G1/97 و ویروس‌های H₉N₂ جدا شده از انسان در هنگ کنگ (به جز ویروس‌های جدا شده از خاورمیانه)، حذف آمینواسیدی در جایگاه‌های ۳۸ و ۳۹ پروتئین نورآمینیداز دیده

می‌شود. در حالی که در ویروس‌های H₉N₂ جدا شده از پاکستان (۷) و امارات (۱)، حذف این دو آمینواسید یافت نشده است.

توالی آمینواسیدی گلیکوپروتئین نورآمینیداز ویروس‌های جدا شده در مطالعه حاضر و سایر جدایه‌های ایران که در Genbank موجود است، دچار هیچ‌گونه حذف آمینواسیدی نشده‌اند (جدول ۳). با توجه به عدم وجود حذف در پروتئین نورآمینیداز ویروس‌های H₉N₂ منطقه خاورمیانه در مقایسه با گروه ویروس‌های Qa/HK/G1/97 و ویروس‌های جدا شده از انسان در هنگ کنگ، احتمالاً ویروس‌های H₉N₂ منطقه خاور میانه و پاکستان همزمان با ویروس‌های H₉N₂ بازارهای طیور زنده هنگ کنگ مربوط به زیردسته Qa/HK/G1/97 شکل گرفته‌اند. البته ممکن است اجداد هر دو گروه مشترک باشد. اما در هر حال احتمال این که ویروس‌های منطقه خاورمیانه پس از منشاء گرفتن از ویروس Qa/HK/G1/97 دچار درون پیوستگی (Insertion) دو آمینواسید در جایگاه‌های ۳۸ و ۳۹ شده باشند، کمتر از احتمال گردش همزمان آنها با ویروس G1 در منطقه خاورمیانه و هنگ کنگ است (۲۴).

Aamir و همکاران در سال ۲۰۰۶ ویروس‌های آنفلوانزای H₉N₂ جدا شده از طیور امارات متحده عربی را، طی سال‌های ۲۰۰۳-۲۰۰۰، بررسی و نشان دادند که ژن نورآمینیداز آنها از نظر آنتی ژنتیکی و فیلوژنتیکی بیشترین شباهت را با ویروس A/Parakeet/Chiba/1/97 (۹۷-۹۵ درصد) و A/Chicken/Pakistan/4/99 (۹۶ درصد) دارد (۱). سویه‌های اولیه ویروس‌های H₉N₂ ایران (Ck/Ir/ZMT-101/98 و Ck/Ir/11T/99) از نظر ژن نورآمینیداز شباهت قابل توجهی با ویروس پاکستان Ck/Pk/4/99 (۹۸ درصد) و ویروس Parakeet/Chiba/1/97 (۹۹ درصد) دارند، ولی میزان شباهت در سویه Ck/Ir/NGV-1/06 (۹۵ درصد) و سویه‌های اخیر ایران (حدود ۹۴ درصد) کاهش یافته است (جدول ۱، ۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که شباهت ژن N2 جمعیت ویروس‌های H₉N₂ ایران به ویروس Ck/Pk/4/99 و ویروس Parakeet/Chiba/1/97 طی سال‌های پس از ۱۹۹۸ به مرور کاهش یافته است.

شباهت بسیار زیاد ژن N2 و همچنین ژن H9 ویروس‌های اولیه آنفلوانزای ایران با ویروس Parakeet/Chiba/1/97 و زمان جداسازی این ویروس در سال ۱۹۹۷ (قبل یا آغاز وقوع همه‌گیری آنفلوانزا در طیور ایران) نشان می‌دهد که ممکن است منشاء همه‌گیری ایران از حیات وحش (مثلاً جمعیت طوطی دم دراز) پاکستان بوده باشد. مرز زمینی مشترک وسیع بین دو کشور ایران و پاکستان و تجارت طیور و محصولات آن و همچنین تجارت پرندگان زینتی به سهولت می‌تواند منجر به اشاعه ویروس‌های آنفلوانزای طیور باشد (۱).

اهمیت پرندگان زینتی در اشاعه ویروس‌های آنفلوانزا پس از جداسازی دو ویروس آنفلوانزای A/Parakeet/Narita/92A/99 و H₉N₂ (A/Parakeet/Chiba/1/97) از دو طوطی دم دراز صادر شده از پاکستان به ژاپن بیشتر مورد توجه قرار گرفت. قبلاً تحت تیپ‌های دیگر ویروس آنفلوانزای تیپ A، از طوطی سانان جدا شده بودند (۲۰۲۸). اما راجع به



ژنتیکی باشد (تصویر ۱۰۲).

از پیامدهای تغییرات ژنتیکی ویروس آنفلوآنزا به ویژه در ژن های گلیکوپروتئین های سطحی هماگلوتینین و نورآمینیداز، کاهش کارایی واکسن های آنفلوآنزا در کنترل سویه های رایج ویروس در جمعیت انسان یا ماکیان است. از سال ۱۹۹۸ یک واکسن کشته روغنی (غیرفعال شده با فرمالین) که از جدایه اولیه Ck/SD/6/96 استخراج شده است، در کشور چین برای کنترل عفونت H_9N_2 مزارع پرورش طیور به کار می رود. ویروس های H_9N_2 جدا شده در مطالعات اخیر در چین و هنگ کنگ، تنوع آنتی ژنتیک گسترده ای داشته اند (۸،۲۱،۲۲) و آنتی سرم های ایجاد شده بر علیه ویروس واکسن با تعداد قابل توجهی از این ویروس ها، واکنش خنثی سازی موثری نشان نداده است (۲۲). این بدان معنی است که واکسن به کار رفته در کشور چین علیه تحت تیپ H_9N_2 آنفلوآنزا در ماکیان، نمی تواند به طور کامل مانع از تکثیر و دفع ویروس هایی شود که از نظر آنتی ژنتیک با آن تفاوت دارند. نتایج مشابهی در مورد ویروس H_9N_2 آنفلوآنزای پرندگان در مکزیک و واکسن رایج ضد آن ارائه شده است (۱۹). ویروس های آنفلوآنزای رایج انسان هم مکرراً دچار تغییرات آنتی ژنتیک می شوند و واکسیناسیون نمی تواند کاملاً مانع از تکثیر ویروس های آنفلوآنزای تغییر کرده شود (۱۵،۱۶). حدود نیم میلیارد دوز واکسن کشته H_9N_2 هر سال در طیور صنعتی چین به کار می رود. بهترین استراتژی برای کنترل همه گیری آنفلوآنزا، استفاده از واکسنی است که از سویه های اصلی همه گیری یا دست کم از سویه ای که از نظر آنتی ژنتیک به خوبی با آن جور باشد، تهیه شده باشد (۳۱). بنابراین ضروری است که میزان جور بودن جدایه های جدید ویروس های آنفلوآنزای H_9N_2 رایج در مزارع پرورش طیور ایران و سویه به کار رفته در واکسن های کشته شده توسط شرکت های واکسن ساز داخلی و خارجی بررسی شود و در صورت نیاز، فرمولاسیون واکسن به روز شود. مطالعه اخیر روی ژن هماگلوتینین ویروس های H_9N_2 ایران هم، تغییرات قابل توجهی را در توالی اسید نوکلئیکی و آمینو اسیدی هماگلوتینین نشان داده است (۱۳). این تغییرات، لزوم توجه بنیادی به تغییرات آنتی ژنتیکی ویروس های آنفلوآنزای طیور ایران، و انتخاب سویه جدید واکسینال را گوشزد می کند.

اکولوژی و همه گیرشناسی آنفلوآنزا در بین این پرندگان اطلاعات کمتری در دسترس می باشد. در مورد بیماری نیوکاسل، نقش طوطی در ورود و گسترش بیماری به جنوب کالیفرنیا گزارش شده است (۳۴). ممکن است ویروس های آنفلوآنزای H_9N_2 مشابه ویروس Parakeet/Chiba/1/97 در جمعیت حیات وحش کشور ما هم در حال گردش باشند.

بر حسب آنالیز فیلوژنتیک در مطالعه Cameron و همکاران در سال ۲۰۰۰، تمام ژن های ویروس پاکستان Ck/Pk/2/99 در زیر دسته ویروس G1 قرار می گیرد که نشان می دهد احتمالاً ویروس پاکستان محصول باز آرایشی ژنتیکی نبوده است (۷). مطالعه Aamir و همکاران در سال ۲۰۰۶ هم نشان داد که ژن های داخلی ویروس های H_9N_2 امارات همگی مشابه سایر ویروس های دسته G1 است و احتمالاً باز آرایشی ژنتیکی در آنها رخ نداده است (۱). اما این موضوع در مورد تمام ویروس های H_9N_2 منطقه خاورمیانه قابل تعمیم نیست. به عنوان مثال ویروس H_9N_2 جدا شده از عربستان سعودی در سال ۱۹۹۸ (Ck/SA/224/98)، در برخی از ژن های داخلی همولوژی بیشتری با ویروس های H_9N_2 زیر دسته های دیگر مثل (Ck/Kor/6/96 یا Dk/HK/Y439/97) دارند (۱۱) که ممکن است ناشی از باز آرایشی ژنتیکی باشد. با افزایش اطلاعات ژنتیکی در مورد توالی کامل تمام ژن های سویه های ویروسی قدیم و جدید H_9N_2 جدا شده از ایران، امکان انجام چنین مطالعاتی در بررسی احتمال وقوع باز آرایشی ژنتیکی در جدایه های ایران را میسر می کند.

در درخت های فیلوژنتیک رسم شده از آنالیز فیلوژنتیک ژن های جدایه های مختلف ویروس آنفلوآنزا، نحوه چیدمان جدایه های ویروس آنفلوآنزا در یک گروه و گروه های مجاور، قرابت زمانی جداسازی ویروس ها بیشتر از پراکنش جغرافیایی آنها می باشد. علت این موضوع گسترش سریع ویروس های آنفلوآنزا است که در یک جا محدود نمی ماند و به سرعت به مناطق مجاور یا حتی غیر مجاور انتشار پیدا می کند (۲۲). از طرف دیگر، ویروس های آنفلوآنزای هر منطقه مکرراً دچار تغییرات می شوند (۸،۲۱،۲۲). شدت این تغییرات ممکن است آنقدر زیاد باشد که دو ویروس جدا شده در دو زمان از یک منطقه در دو گروه فیلوژنتیک مجزا قرار گیرند. البته هنگامی که وسعت یک منطقه، از حد یک استان به یک کشور افزایش داده شود، معمولاً جدایه های ویروسی یک کشور از نظر دسته بندی فیلوژنتیکی حتی در گذر سال هادر کنار هم قرار خواهند گرفت (۴،۲۲).

در مورد آنالیز فیلوژنتیک ژن N2، جدایه های قدیمی ویروس های آنفلوآنزای H_9N_2 ایران در مجاورت هم در یک گروه قرار می گیرند. اما ژن N2 ویروس Ck/Ir/NGV-1/06 (H_9N_2) و سویه های اخیر ایران در گروه مجزایی در کنار ویروس پاکستان Ck/Pk/4/99 قرار می گیرد. این موضوع نشان می دهد که ژن N2 ویروس های آنفلوآنزای ایران در طی سال ها تا حد قابل توجهی، تغییر کرده است. میزان قابل توجه تغییرات در ژن نورآمینیداز ویروس آنفلوآنزا Ck/Ir/NGV-1/06 ممکن است ناشی از فشار سیستم ایمنی میزبان در طی سال های پس از ۱۳۷۷ یا بروز باز آرایشی

References

1. Aamir, U. B., Wernery, U., Ilyushina, N., Webster, R. G. (2007). Characterization of avian H_9N_2 influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to 2003. *Virology*. 361:45-55.
2. Alexander, D. J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74: 3-13.
3. Alexander, D. J. (2003). Report on avian influenza in



- Eastern Hemisphere during 1997-2002. *Avian Dis.* 47: 792-797.
4. Banet, N., Perk, S., Simanov, L., Grebenyuk, N., Rozenblut, E., Pokamunski, S., Pirak, M., Tendler, Y., Panshin A. (2007). H₉N₂ influenza viruses from Israeli poultry: a five-year outbreak. *Avian Dis.* 51: 290-296.
 5. Baum, L. G., Paulson, J. C. (1991). The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity. *Viol.* 180:10-15.
 6. Burnet, F. M. (1948). Mucins and mucoids in relation to influenza virus action. IV. Inhibition by purified mucoid of infection and haemagglutinin with the virus strain WSE. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 25:227-233.
 7. Cameron, K. R., Gregory, V., Banks, J., Brown, I. H., Alexander, D. J., Hay, A. J., Lin, Y. P. (2000). H₉N₂ subtype influenza A viruses in poultry in Pakistan are closely related to the H₉N₂ viruses responsible for human infection in Hong Kong. *Viol.* 278:36-41.
 8. Choi, Y. K., Ozaki, H., Webby, R. J., Webster, R. G., Peiris, J. S., Poon, L., Butt, C., Leung, Y. H. C., Guan, Y. (2004). Continuing evolution of H₉N₂ influenza viruses in southeastern China. *J. Virol.* 78:8609-8614.
 9. Choppin, P. W. (1969). Replication of influenza virus in a continuous cell line: high yield of infective virus from cells inoculated at high multiplicity. *Viol.* 39:130-134.
 10. Glathe, H., Strittmatter, H. U., Kunze, M., Sinnecker, H. (1982). Effect of low pH values on the infectivity and neuraminidase activity of human and animal strains of influenza virus type A. *Acta Biol. Med. Ger.* 41:1075-1078.
 11. Guan, Y., Shortridge, K. F., Krauss, S., Webster, R. G. (1999). Molecular characterization of H₉N₂ influenza viruses: were they donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in HongKong? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:9363-9367.
 12. Guo, Y., Dong, J., Wang, M., Zhang, Y., Guo, J., Wu, K. (2001). Characterization of hemagglutinin gene of influenza A virus subtype H₉N₂. *Chin. Med. J. (Engl. Ed.).* 114:76-79.
 13. Karimi, V., Bozorgmehrfard, M. H., Shahbazzadeh, D., Esmaelizad, M., Pourbakhsh S. A. (2004). Sequence analysis and phylogenetic study of hemagglutinin gene of H₉N₂ subtype of avian influenza virus isolated during 1998-2002 in Iran. *Iranian Biomed. J.* 8:167-172.
 14. Kianizadeh, M., Gohar, S. Z., Fathinajafi, M., Toroughi, R., Pourbakhsh S. A. (2007). Neuraminidase gene sequence analysis of avian influenza H₉N₂ viruses isolated from Iran (1998-2001) *Arch. Razi Institute.* 62:69-74.
 15. Kilbourne, E. D., Johansson, B. E., Grajower, B. (1990). Independent and disparate evolution in nature of influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:786-790.
 16. Kilbourne, E. D., Smith, C., Brett, I., Pokorny, B. A., Johansson, B., Cox, N. (2002). The total influenza vaccine failure of 1947 revised: major intrasubtypic antigenic change can explain failure of vaccine in a post-world-war II epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:10748-10752.
 17. Kobasa, D., Rodgers, M. E., Wells, K., Kawaoka, Y. (1997). Neuraminidase Hemadsorption Activity, Conserved in Avian Influenza A Viruses, Does Not Influence Viral Replication in Ducks. *J. Virol.* 71:6706-6713.
 18. Kobasa, D., Kodihalli, S., Luo, M., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Suzuki, Y., Suzuki, T., Kawaoka, Y. (1999). Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. *J. Virol.* 73:6743-6751.
 19. Lee, C. W., Senne, D. A., Suarez, D. L. (2004). Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *J. Virol.* 78:8372-8381.
 20. Li, S., Schulman, J., Itamura, S., Palese, P. (1993). Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus. *J. Virol.* 67:6667-6673.
 21. Li, K. S., Xu, K. M., Peiris, J. S. M., Poon, L. L. M.,



- Yu, K. Z., Yuen, K. Y., Shortridge, K. F., Webster, R. G., Guan, Y. (2003). Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans? *J. Virol.* 77:6988-6994.
22. Li, C., Yu, K., Tian, G., Yu, D., Liu, L., Jing, B., Ping, J., Chen, H. (2005). Evolution of H₉N₂ influenza viruses from domestic poultry in mainland China. *Virology* 340:70-83.
23. Liu, J. -H., Okazaki, K., Shi, W. -M., Wu, Q. -M., Simanyengwe, A., Kida, H. (2003). Phylogenetic analysis of neuraminidase gene of H₉N₂ influenza viruses prevalent in chickens in China during 1995-2002. *Virus. Genes.* 27:197-202.
24. Mase, M., Imada, T., Sanada, Y., Etoh, M., Sanada, N., Tsukamoto, K., Kawaoka, Y., Yamaguchi, S. (2001). Imported parakeets harbor H₉N₂ influenza A viruses that are genetically closely related to those transmitted to humans in Hong Kong. *J. Virol.* 5:3490-3494.
25. Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y., Webster, R., (1999). The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol.* 73:1146-1155.
26. 26- (2001). H₉N₂ influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* 281:156-162.
27. Mitnaul, L., Castrucci, M. R., Murti, K. G., Kawaoka, Y. (1996). The cytoplasmic tail of influenza neuraminidase (NA) affects NA incorporation into virions, virion morphology, and virulence in mice but is not essential for virus replication. *J. Virol.* 70:873-879.
28. Nestorowicz, A., Kawaoka, Y., Bean, W. J., Webster, R. G. (1987). Molecular analysis of the hemagglutinin genes of Australian H7N7 influenza viruses: role of passerine birds in maintenance or transmission? *Virology* 160: 411-418.
29. Nili, H., Asasi, K. (2002). Natural cases and an experimental study of H₉N₂ avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathol.* 31:247-252.
30. Nili, H., Asasi, K. (2003) Avian influenza (H₉N₂) outbreak in Iran. *Avian Dis.* 47:828-831.
31. Lu, X. H., Renshaw, M., Tumpey, T. M., Kelly, G. D., Primmer, J. H., and Katz, J. M. (2001). Immunity to influenza A H₉N₂ viruses induced by infection and vaccination. *J. Virol.* 75:4896-4901.
32. Swayne, D. E., Halvorson, D. A. (2003). Influenza. In: *Diseases of poultry.* (11th ed.) Saif Y.M. (ed.) Iowa State University Press, Ames. USA. p. 135-160.
- Takizawa, T., Matsukawa, S., Higuchi, Y.,
33. Nakamura, S., Nakanishi, Y., Fukuda, R. (1993). Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J. Gen. Virol.* 74: 2347-2355.
- Utterback, W. W., Schwartz, J. H. (1973).
34. Epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in southern California, 1971-1973. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 163:1080-1088.
- Varghese, J. N., Laver, W. G., Colman, P. M. (1983).
35. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature (London)* 303:35-40.
- Varghese, J. N., Colman, P. M., Donkellar, A. V.,
36. Blick, T. J., Sahasrabudhe, A., Mckimm-breschkin, J. L. (1997). Structural evidence for a second sialic acid binding site in avian influenza virus neuraminidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11808-11812.
- Vasfi Marandi, M., Bozorgmehrifard, M. H. (2002).
37. Isolation of H₉N₂ subtype of avian influenza viruses during an outbreak in chickens in Iran. *Iranian Biomed. J.* 6:13-17.
- 3 Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T.,
38. Chambers, T. M., Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56:152-179.
- Zhi-xun, X., Jian-bao, D., Xiao-fei, T., Jia-bo, L.,
39. Yao-shan, P., Xian-Wen, D., Zhi-Qin, X., Li-Ji, X., Mazhar, K. (2009). Genome sequencing and phylogenetic analysis of three avian influenza H₉N₂ subtypes in Guangxi. *Virologica Sinica.* 24:37-44.



CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF NEURAMINIDASE GENE IN ISOLATED AVIAN INFLUENZA VIRUSES OF H₉N₂ SUBTYPE FROM IRAN

Noroozian, H.¹, Vasfi Marandi, M.^{2*}, Gorashi, S. A.³

¹*Departement of Clinical Scineces, School of Veterinary Medicine, University of Lorestan, Khoram Abad-Iran.*

²*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

³*National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran-Iran.*

(Received 3 March 2010 , Accepted 2 August 2010)

Abstract:

Avian Influenza (AI) is a viral respiratory disease of poultry industry that cause great economic losses in worldwide. In this study, the neuraminidase (NA) gene of two H₉N₂ avian influenza virus (AIV) strains (A/Chicken/Iran/ZMT-101/1998 and A/Chicken/Iran/NGV-1/2006), isolated from AI infected poultry farms in 1998 and 2006, were cloned and sequenced. Amino acids at hemadsorbing (HB) site of these isolates showed some differences between them and also with other Iranian isolates. No insertion or deletion or shortening in the stalk region of the NA gene were observed. Phylogenetic analysis showed that N₂ gene of these strains, belonged to the same A/Qail/HongKong/G1/97-like virus sublineage. However, these strains were allocated in two different groups in the same sublineage. These results indicate that the N₂ gene and protein sequences of the recently isolated H₉N₂ strain (NGV-1/2006) have substantial variation compared to the previous Iranian reported H₉N₂ strain (ZMT-101/1998). These changes may cause some new biologic and immunologic characteristics for AIVs, such as reduction of vaccination efficacy in immunized chickens. Therefore, evaluation of important genes and protective efficacy of used H₉N₂ vaccine strain used in Iran would be crucial.

Key words: Avian influenza (H₉N₂), neuraminidase (N₂), hemadsorbing (HB), phylogenetic analysis.

*Corresponding author's email: mvmarand@ut.ac.ir, Tel: 021-66923510, Fax: 021-66933222

