

## تعیین توالی و آنالیز فیلوژنتیک ژن (PB1) ویروس آنفلوانزای پرندگان (H9N2) در ایران

مسعود سلطانی<sup>۱\*</sup>، عبدالحمید شوشتری<sup>۲</sup>، رضا گودرزی<sup>۳</sup>، حسین وثوقی<sup>۴</sup>

(۱) بخش بیماریهای طیور، بیمارستان تخصصی دامپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر - ایران.

(۲) بخش بیماریهای طیور، آزمایشگاه ملی رفانس آنفلوانزا موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج، کرج - ایران.

(۳) بخش آسیب شناسی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد - ایران.

(۴) کارشناس ارشد مجتبع آزمایشگاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۳ بهمن ماه ۱۳۹۰، پذیرش نهایی: ۱۳ اردیبهشت ماه ۱۳۹۱)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** کمپلکس پلیمری ویروس های آنفلوانزا شامل سه زیر واحد (PA, PB2, PB1) می باشد که در فرایند نسخه برداری و تکثیر ویروسی نقش دارند. زیر واحد PB1 به عنوان هسته این کمپلکس مسوول سنتز RNA ویروسی است. **هدف:** بررسی مولکولی ژن PB1 در ویروس های آنفلوانزای (H9N2) پرندگان و تعیین رابطه آن با ویروس های سایر نقاط ایران و آسیا. **روش کار:** ژن PB1 در ۷ ویروس جدا شده از پرندگان گوشتی در خلال سال های ۲۰۰۸-۲۰۰۹ با روش RT-PCR تکثیر شده، تعیین توالی گردید و بر مبنای قطعه قابل تبدیل به پروتئین (orf) درخت فیلوژنتیک رسم شد. **نتایج:** آنالیز فیلوژنتیک ژن PB1 نشان می دهد که ویروس های ایران در گروه های ناشناخته ی مجزایی قرار می گیرند، به عبارت دیگر در حالی که مقایسه توالی نوکلئیدی نشان دهنده تنوع زیاد (High diversity) در بین ویروس های ایران است، همولوژی بالای با برخی تحت گونه های H5 و H7 نسبت به دودمان های اوراسیایی استقرار یافته در آسیا (G1, Korean, Y-280) دیده می شود. **نتیجه گیری نهایی:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد طی سال های اخیر ویروس های (H9N2) ایران متحمل باز آرایشی ژنتیکی شده اند به طوری که ژنوتیپ های جدیدی در ایران تولید شده.

**واژه های کلیدی:** آنالیز فیلوژنتیک، ژن (PB1)، آنفلوانزای پرندگان H9N2، ایران.

می توانند با شکستن سد بین گونه ای و انتقال به پستاندارانی مثل خوک، اسب و انسان باعث انتقال بیماری شوند. از بین این ویروس ها، ویروس های آنفلوانزای فوق حاد H5 و H7، ویروس های با بیماریزایی کم H9 به دلیل انتقال مستقیم آنها به انسان و ایجاد پاندمی های جدید آنفلوانزا بیشتر مورد توجه هستند. در سال ۱۹۹۹ و به دنبال آن سال ۲۰۰۳ عفونت با ویروس های (H9N2) A/Hk/2108/03 و A/HK/1073/99 در انسان رخ داد که از آن زمان، توجه به ویروس H9N2 به عنوان یکی از کاندیداهای ایجاد پاندمی جدید بیشتر شد (۱۰). سه قطعه از بزرگترین قطعات ژنومی ویروس آنفلوانزا پروتئین های PA, PB2, PB1 یا ساختار پلیمری را کد می کنند که بر حسب اسیدهای آمینه طول آنها به ترتیب ۷۵۷ و ۷۵۹ و ۷۱۶ مولکول می باشد. این قطعات همراه ژن نوکلئوپروتئین (Nucleoprotein: NP) ریبونوکلئوپروتئین (RNP) را تشکیل می دهند و در فرایند نسخه برداری و ترجمه ویروس های آنفلوانزا نقش دارند به طوری که این فرایند را از RNA ویروس های دیگر متمایز می سازند (۱۳). بررسی ژنتیکی ویروس های همه گیری های انسانی نشان داده است که برخی یا همه ژن های آنها همانند (PB1) از ویروس های آنفلوانزای پرندگان منشأ گرفته شده (۸).

در طی سال های اخیر تحت تیپ H9N2 مهم ترین عامل ایجاد بیماری آنفلوانزای مرغی در جمعیت طیور کشور بوده است و گزارشاتی مبنی بر آلودگی انسان به این تحت تیپ و آلودگی سرمی به خصوص در

### مقدمه

خانواده ارتومیگسوویروسه شامل ویروس هایی است که دارای ژنوم RNA قطعه قطعه تک رشته با سنس منفی (Negative Sense) هستند (۱۳). پنج جنس مختلف در این خانواده جای دارد که شامل: ویروس های آنفلوانزای A, B, C، توگو و توویروس (Thogoto virus) و ایزا ویروس (Isavirus) است (۹). اعضای مختلف متعلق به سه جنس آنفلوانزای توانایی باز آرایشی ژنتیکی را دارند و بنابراین سرعاً اطلاعات ژنتیکی آنها دچار تغییر می شود با این وجود باز آرایشی مابین دو جنس مختلف گزارش نشده است. ویروس های آنفلوانزای جنس A انسان و همچنین طیف وسیعی از حیوانات از جمله اردک و وحشی، جوجه، بوقلمون، خوک و اسب را آلوده می نماید. ویروس های تیپ B انسان و گاهاً خوک دریایی و تیپ C علاوه بر انسان، پرندگان، خوک ها و وال ها را آلوده می کند (۴). ویروس های آنفلوانزای تیپ A بر اساس پروتئین های سطحی یعنی همآگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) تقسیم بندی می شوند، تا کنون ۱۶ تحت تیپ HA (H1-16) و ۹ تحت تیپ NA (N1-N9) شناسایی شده است (۲) این ویروس ها بر اساس بیماریزایی در پرندگان به دو گروه با بیماریزایی بالا و بیماریزایی کم طبقه بندی می شوند. سازگاری این ویروس ها در پرندگان و بروز نادر و کم علائم بیماری در آنها، این پرندگان را به عنوان مخزن طبیعی این ویروس ها (آنفلوانزای تیپ A) معرفی کرده است. این ویروس ها



۹۴°C به مدت دقیقه ۱ برای واسرشتگی (Denaturation)، ۵۰°C به مدت ۱ دقیقه برای اتصال (Annealing)، ۶۸°C به مدت ۷ دقیقه برای بسط (Extention)، که در نهایت با ۶۸°C به مدت ۱۰ دقیقه برای بسط نهایی (Late Extention) پایان یافت و محصول واکنش در ۲۰°C - نگهداری شد. مشخصات پرایمرهای استفاده شده:

Forward primer (۱۵۶۰pb)

5'- TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA -3'

Reverse primer (۱۵۶۰pb)

5'- TTRAACATGCCCATATCAT -3'

استخراج و خالص سازی محصول RT-PCR: محصول بدست آمده

High pure product purification kit با استفاده از کیت (Roche Germany) با روش برداشت DNA از داخل ژل خالص شد. محصول خالص شده ۴۰µL بود که پس از اندازه گیری غلظت DNA با نانودارپ، نمونه ها در ۴۵°C خشک و با استفاده از همان پرایمرهایی که برای تکثیر ژن ها استفاده شده بود، با روش ComfortRead توسط شرکت MWG-Biotech آلمان تعیین توالی گردیدند. غلظت نمونه های ارسالی ۸۰۷ng - ۲۲۰ بود.

آنالیز فیلوژنتیک: تمام اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی توسط نرم افزارهای Editseq (package Version 5.2) DNASTAR Software ویرایش شد. ابتدا در بانک ژن آزمون BLAST انجام شد و H9N2 بودن نمونه ها مورد تایید قرار گرفت و سپس قطعه قابل ترجمه به پروتئین (Open Reading Frame:ORF) ژن های مذکور با استفاده از روش ClustalW با سایر ژن های ثبت شده در ژن بانک (Genbank)، همتراز (Alignmen) شد. درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار MegAlin رسم شد.

## نتایج

بررسی اسیدهای آمینه پروتئین PBI: در بررسی کل نوکلئوتیدهای هفت ژن PBI ویروس های مورد مطالعه و مقایسه آن با ویروس A/turkey/winconsin/66، هیچگونه حذف یا اضافه شدنی در ژن های PBI مشاهده نمی شود ولی سوبه های استفاده شده در این مطالعه همانند دیگر سوبه های ایران چندین جهش نقطه ای را در طول این ژن نشان می دهند نتایج مقایسه اسیدهای آمینه ویروس های مورد مطالعه با ویروس های قبلی ایران و دیگر نقاط جهان نشان می دهد که تعداد ۹ اسید آمینه در موقعیت های (S to P) ۱۲، (R to K) ۵۴، (L to F) ۹۴، (I to V) ۱۱۴، (R to k) ۱۲۳، (R to k) ۱۷۸، (I to M) ۵۷، (R to K) ۲۳۶، (T to M) ۳۱۷ مخصوص ۷ ویروس مورد مطالعه می باشد. شباهت قابل توجهی بین توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی ژن (PBI) جدایه های بدست آمده در این مطالعه، ویروس H5N2 جدا شده از آلمان (6/1986)

افراد مرتبط با طیور در کشورمان گزارش شده است (۷،۱۲) لذا بررسی مستمر این ویروس به منظور آگاهی از تغییرات این ویروس در شناختی جدید از ویروس از جمله خطر انتقال به انسان به کارگیری واکنش های مناسب وقوع بازآرایی ژنتیکی در جدایه های جدید و تشخیص منشأ همه گیری آنفلوآنزای طیور در کشور به ما کمک خواهد کرد.

در همین راستا تحقیق حاضر به بررسی مولکولی ژن PBI در ویروس های (H9N2) آنفلوآنزای پرندگان به منظور بررسی تغییرات ایجاد شده در این ژن و تعیین رابطه آن با ژن های ویروس های سایر نقاط ایران و جهان می پردازد.

## مواد و روش کار

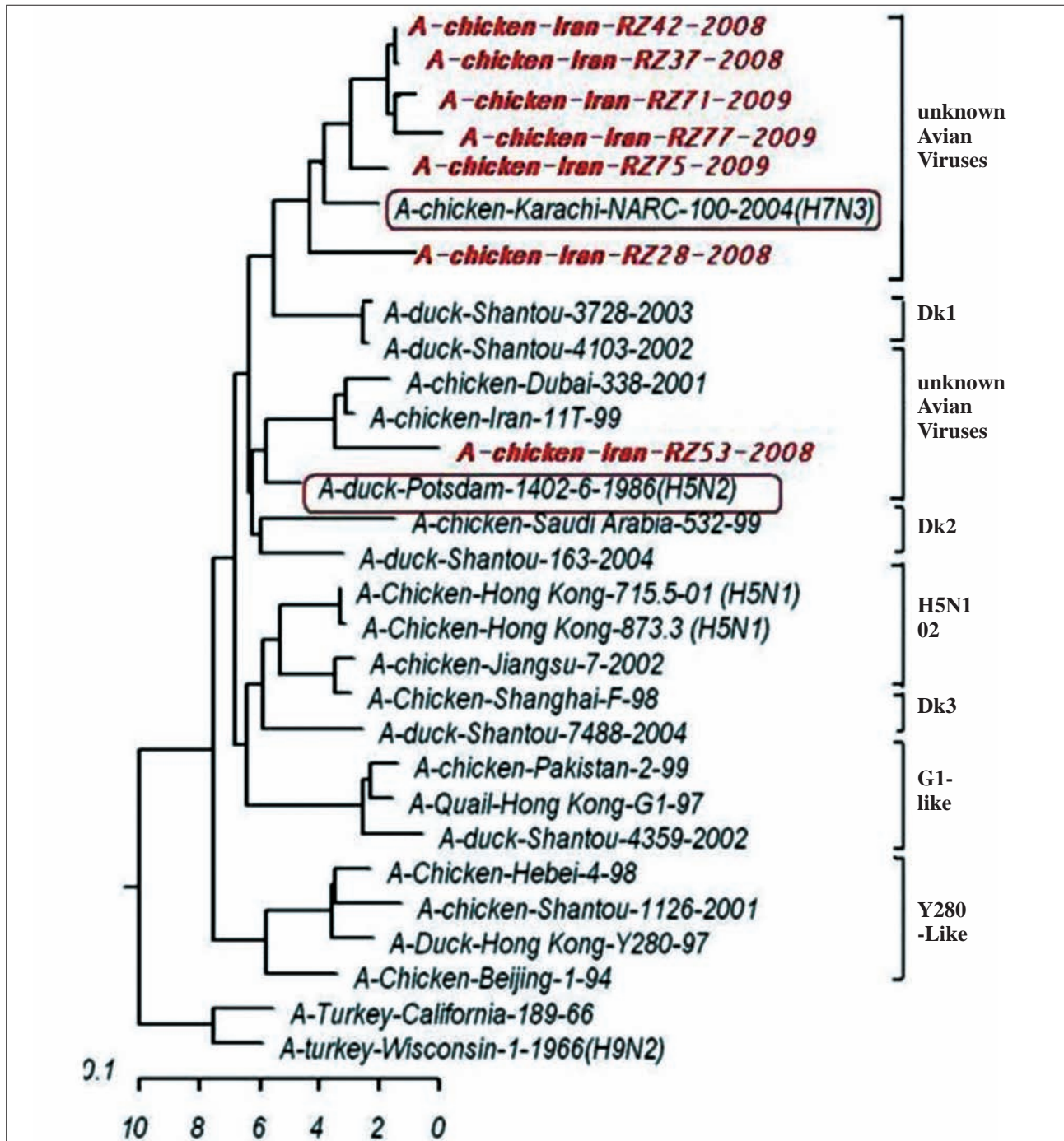
نمونه های ویروسی: برای بررسی ژن PBI ویروس های (H9N2) از ۷ نمونه ویروسی که طی سال ۸۷ (۲۰۰۸-۲۰۰۹) از شیوع بیماری آنفلوآنزا در مناطق مختلف تهیه شده بود استفاده گردید.

نمونه ها پس از آماده شدن به درون حفره آلانتوئیک (Allantoic Cavity) تخم مرغ های جنین دار عاری از بیماری (Specific Pathogen Free: SPF) کشت داده شد. تلفات بین ۲۴ تا ۹۶ ساعت پس از تزریق جمع آوری و در یخچال به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت نگهداری شد. با استفاده از روش همگلو تیناسیون سریع، وجود ویروس با فعالیت همگلو تیناسیون در مایع آلانتوئیک جمع آوری شده از جنین های تلف شده مورد تایید قرار گرفت. سپس با کمک آزمایش (HI Inhibition Hemagglutination) نوع ویروس دارای فعالیت همگلو تیناسیون مشخص می گردید (۱۹).

مشخصات گله هایی که ویروس از آن ها جدا شده است در جدول ۱ آورده شده است.

استخراج RNA و تکثیر ژنوم: جهت جداسازی RNA ویروس از مایع آلانتوئیک از کیت (Roche High pure viral Nucleic Acid Germany) Kit استفاده شد. جهت تکثیر ژن (PBI) ما بر مبنای سکانس ژن (PBI) موجود در بانک ژن (Gene Bank) گزارش شده از ایران اقدام به طراحی یک جفت آغازگر (Primer) با استفاده از نرم افزار (package Version 5.2) DNASTAR Software Genrunner کردیم. آغازگر طراحی شده بخشی از ژن (PBI) را به طول ۲۰۶۰ bp تکثیر نمود واکنش RT-PCR با استفاده از کیت RT-PCR Titan one step tube شرکت (Roche) آلمان انجام شد مخلوط RT-PCR در مجموع ۵۰µL بود که حاوی ۱۰µL بافر 5X، ۱µL آنزیم نسخه برداری معکوس، ۲/۵µL ممانعت کننده RNase، ۴µL مخلوط جفت پرایمر، ۴µL RNA ویروسی مورد نظرو ۲۷/۵µL آب عاری از آنزیم های مخرب RNA بود. شرایط دمای PCR - RT برای تکثیر ژن PBI عبارت بود از ۴۵°C به مدت ۴۵ دقیقه برای انجام نسخه برداری معکوس (Reverse Transcription)، ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه برای واسرشتگی اولیه (Primary Denaturation) و ۳۵ تکرار از





تصویر ۱- ژن های (PB1) در ویروس های ایران همولوژی زیادی را با تحت گونه های H5 و H7 نسبت به دودمان های اوراسیایی استقرار یافته در آسیا نشان می دهند.

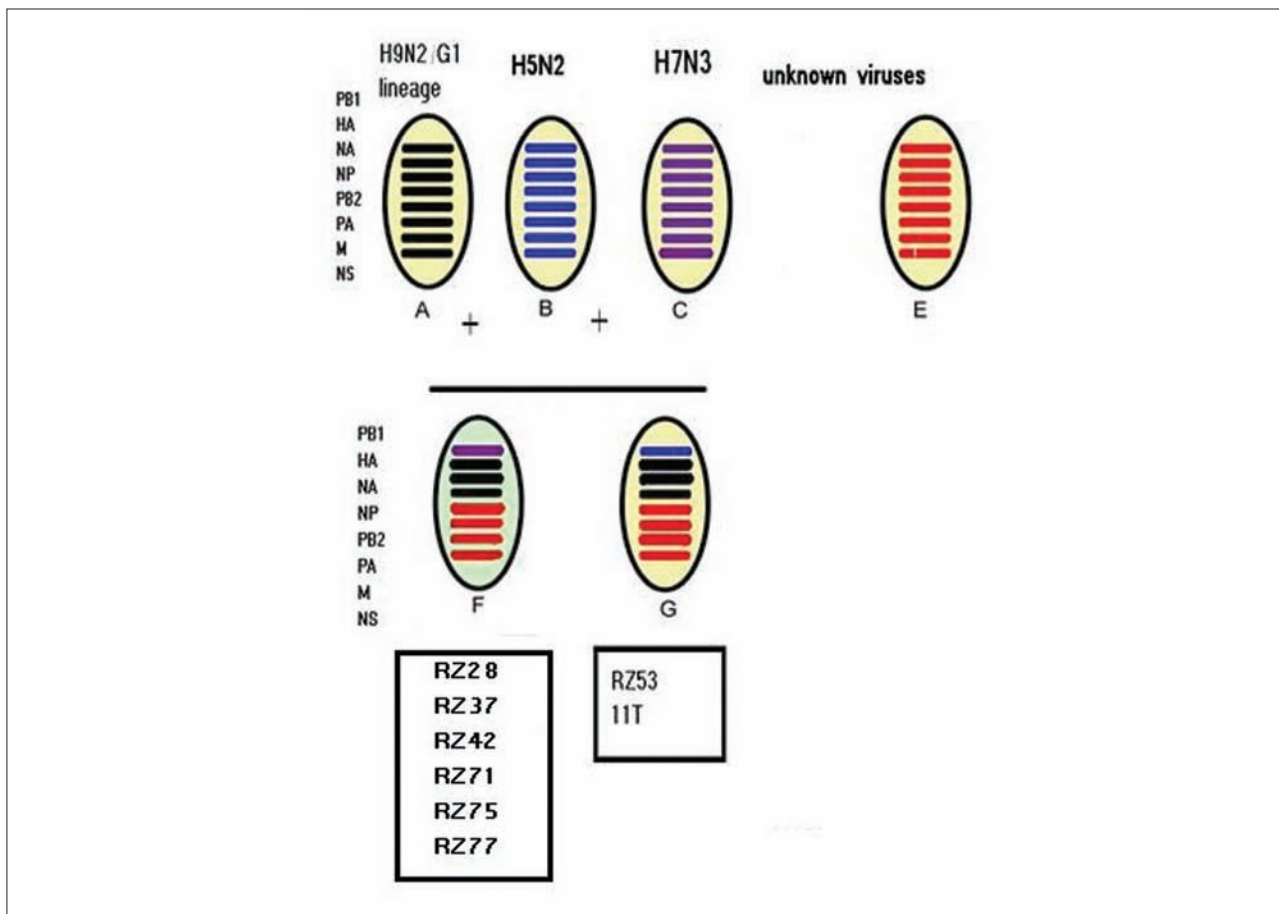
موش نقش دارد (جدول ۳) (۲۱).

آنالیز فیلوژنتیک ژن PB1: بررسی درخت فیلوژنتیک ژن PB1 ویروس های مورد مطالعه نشان می دهد که اکثر سویه های متعلق به ایران به همراه سویه های جدا شده از هند و دبی، یک زیرشاخه مجزا و ناشناخته را در نزدیکی ویروس های H7N3 جدا شده از پاکستان تشکیل می دهند در حالی که سویه (A/chicken/Iran/RZ53/08) به همراه یکی از سویه های قدیمی (A/chicken/Iran/11T/99) در گروه ناشناخته

-100/2004 H7N3 و ویروس A/duck/Potsdam/1402 (۹۵-۹۶/۴٪) جدا شده از پاکستان (۹۵-۹۶/۱٪) مشاهده می شود (جدول ۲).

در بررسی اسیدهای آمینه پروتئین PB1 مشخص گردید، در تمامی این ویروس های اسیدهای آمینه موقعیت های ۳۹ (از آلانین به تیروزین)، ۴۴۸ (از تیروزین به آلانین)، ۵۲۳ (از ایزولوسین به متیونین) و ۶۰۴ (از گلوتامین به پرولین) تغییر یافته است که این تغییر در تکثیر ویروس ها در





تصویر ۲- ژنوتیپ‌های جدید ویروس‌های H9N2 ایران، براساس آنالیز فیلوژنتیک حداقل دو ژنوتیپ F و G برای ویروس‌های ایران می‌توان در نظر گرفت.

جدول ۱- مشخصات ویروس‌ها س جدا شده در این مطالعه.

شماره دسترسی	محل جداسازی	تاریخ معاینه	نام ویروس
JX097033	خرم‌آباد	۸۷/۵/۵	A/chicken/Iran/RZ28/2008
JX097034	بروجرد	۸۷/۶/۲۰	A/chicken/Iran/RZ37/2008
JX097035	دورود	۸۷/۷/۲۰	A/chicken/Iran/RZ42/2008
JX097036	خرم‌آباد	۸۷/۹/۱	A/chicken/Iran/RZ53/2008
JX097037	نهادند	۸۷/۱۰/۴	A/chicken/Iran/RZ71/2008
JX097038	دزفول	۸۷/۱۱/۵	A/chicken/Iran/RZ75/2008
JX097039	شوستر	۸۷/۱۲/۷	A/chicken/Iran/RZ77/2008

### بحث

نتایج مطالعه حاضر که به بررسی خصوصیات مولکولی و آنالیز فیلوژنتیک ژن *PBI* ویروس‌های آنفلوانزا (H9N2) کشور پرداخته، نشان می‌دهد ویروس‌های ایران در دو گروه ناشناخته مجزا قرار می‌گیرند و متحمل بازآرایی ژنتیکی با تحت تیپ H5 و H7 شده‌اند. مطالعات مشابه دیگری در سایر نقاط جهان به منظور بررسی خصوصیات مولکولی و آنالیز فیلوژنتیک ژن‌های کمپلکس پلیمرازی (*PBI*, *PB2*, *PA*) ویروس‌های آنفلوانزا (H9N2) انجام گرفته که نتایج آن با نتایج بدست آمده در این مطالعه در بسیاری از موارد مطابقت دارد.

در بررسی Tosh و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی ویروس‌های H9N2 جدا شده از هند مشخص شد که ژن *PBI* این ویروس‌ها به همراه ویروس‌های از دب‌ای و ایران در یک گروه ناشناخته قرار می‌گیرند و متحمل بازآرایی ژنتیکی شده است (۱۹).

Xu و همکاران در سال ۲۰۰۸ درخت فیلوژنتیک ویروس‌های H9N2 اروپایی آسیایی (دودمان اوراسیایی) را به هفت گروه اصلی G1-Like، Y280، گروه ناشناخته منشأ گرفته از پرندگان، سه دودمان منشأ گرفته از اردک (DK1، DK2، DK3) و H5N1/01-Like تقسیم کردند و نشان

دیگری در کنار ویروس‌های H5N2 جدا شده از آلمان قرار می‌گیرند (تصویر ۱). با توجه به قرارگیری ویروس‌های H9N2 ایران در دو گروه مجزای فیلوژنتیکی، حداقل دو ژنوتیپ برای ویروس‌های ایران می‌توان در نظر گرفت (تصویر ۲) بدین صورت که ویروس‌های RZ37، RZ42، RZ28، RZ71، RZ75، RZ77 در ژنوتیپ F و ویروس‌های RZ37 و 11T در ژنوتیپ G قرار می‌گیرند.

جدول ۲- درصد همولوژی ژن های PBI جدایه های ایران با دیگر ویروس ها.

درصد همولوژی (بر مبنای توالی نوکلئوتیدی)					
(H9N2) Qa/HK/G1/97	(H9N2) Dk/HK/ Y280/97	(H9N2) ck/Korea/323/96	(H7N3) Ck/Kch/NARC-100/04	(H5N2) Dk/PS/6/84	ویروس های ایران
۹۲/۱	۹۶/۱	۸۸/۲	۸۷/۷	۹۰/۳	A/chicken/Iran/RZ37/2008
۹۳/۷	۹۶/۱	۸۸/۳	۸۴/۸	۸۹/۳	A/chicken/Iran/RZ42/2008
۹۵/۴*	۸۹/۱	۸۸/۹	۸۴/۷	۸۹/۴	A/chicken/Iran/RZ53/2008
۹۲/۶	۹۵/۱	۸۹/۲	۸۴/۸	۹۰/۳	A/chicken/Iran/RZ28/2008
۹۲/۲	۹۵/۵	۸۹/۹	۸۶/۳	۸۶/۶	A/chicken/Iran/RZ71/2008
۹۲/۰	۹۵/۷	۸۹/۲	۸۸/۴	۸۸/۴	A/chicken/Iran/RZ75/2008
۹۳/۴	۹۶/۰	۸۹/۱	۸۶/۹	۸۹/۵	A/chicken/Iran/RZ77/2008
۹۶/۴*	۹۲/۴	۸۸/۲	۸۹/۷	۸۹/۵	A-chicken-Iran-11T-99

جدول ۳- جایگاه محافظت شده در ژن PBI که در سازگاری ویروس های H9N2 در موش نقش دارد.

(A) ۳۹	(R) ۱۸۷	(Q) ۲۴۷	(L) ۴۱۹	(T) ۴۴۸	(I) ۵۲۳	(E) ۶۰۷	Viruses
T	K	R	F	A	M	P	A-chicken-Jiangsu-7-2002
T	R	Q	L	A	M	P	A/chicken/Iran/RZ37/2008
T	R	Q	L	A	M	P	A/chicken/Iran/RZ42/2008
T	R	Q	L	A	M	P	A/chicken/Iran/RZ53/2008
T	R	Q	L	A	M	P	A/chicken/Iran/RZ28/2008
T	R	Q	L	A	M	P	A/chicken/Iran/RZ71/2008
T	R	Q	L	A	M	P	A/chicken/Iran/RZ75/2008
T	R	Q	L	A	M	P	A/chicken/Iran/RZ77/2008
T	R	Q	L	A	M	P	A/Duck/Hong kong/Y280/97
T	R	Q	L	A	M	P	A/Quail/HongKong/G1/97
T	R	Q	L	A	M	P	A-chicken-Iran-11T-99
T	R	Q	L	A	M	P	A-Chicken-Beijing-1-94

ناشناخته مجزا، قرار می گیرند. این تغییر در فیلوژنتیک ویروس های ایران را می توان به گردش وسیع ویروس های H9N2 در سطح جمعیت های پرندگان و احتمالاً انسانی نسبت داد. مقایسه توالی ژن PBI ویروس های ایران نشان دهنده تنوع زیاد (High Diversity) در بین این ویروس ها است (۸ تا ۱۱٪) به طوری که شش جدایه (RZ28، RZ71، RZ75، RZ77، RZ37، RZ42) همولوژی بالای (۹۷/۱ - ۹۷٪) بر مبنای توالی اسیدهای آمینه و ۹۶-۹۵٪ بر مبنای توالی نوکلئوتیدی) را با ویروس H7N3 پاکستان نشان می دهند در حالی که جدایه (RZ53) به همراه (Iran-11T) بیشترین شباهت را (۹۹/۶-۹۷٪) بر مبنای توالی اسیدهای آمینه و ۹۶-۹۷٪ بر مبنای توالی نوکلئوتیدی) با ویروس H5N2 آلمان نشان می دهند بر

دادند که برخی از سویه های جدا شده از ماکیان جنوب چین بر اساس آنالیز فیلوژنتیک ژن های کمپلکس پلمیرازی (PA، PB2، BI) در گروه های ناشناخته قرار می گیرد (۲۲) Igbal و همکاران در سال ۲۰۰۹ ژنوتیپ های جدیدی از ویروس های H9N2 پاکستان را معرفی کردند که برخی از ژن های خود را از ویروس های H5N1 یا H7N3 در یافت کرده است (۶).

آنالیز فیلوژنتیک ژن PBI ویروس های مورد مطالعه نشان می دهد که این ژن ها برخلاف ژن های نوکلئوپروتئین (Nucleoprotein)، همگلوتینین (Haemagglutinin) و نورآمینیداز (Neuraminidase) که در گروه A/Quail/Hong Kong/G1/97 قرار می گیرند، در دو گروه



در آنها می‌تواند نقش کلیدی در بیماری‌زایی و تکثیر ویروس H9N2 در موش داشته باشد (۱۷). جدایه‌های اخیر ایران تغییراتی در این جایگاهها نشان می‌دهند به طوری که تمامی آنها در چهار جایگاه از هفت جایگاه دچار موتاسیون شده‌اند این تغییرات در ژن *PBI* این احتمال را به وجود می‌آورد که ویروس‌های H9N2 ایران گونه‌های غیر از پرندگان را آلوده می‌نمایند که این امر می‌تواند یکی از عوامل اصلی در گسترش این ویروس‌ها باشد.

Shoushtari و همکاران در سال ۲۰۰۹ به جداسازی ویروس‌های فوق حد H5N1 در تالاب انزلی پرداختند (۱۵) به نظر می‌رسد با وجود تالاب‌های همانند انزلی و شادگان که محل حضور انواع پرندگان آبی مهاجر هستند و حضور همزمان ویروس‌های H9N2، H5N1 در کشور، وقوع بازآرایی‌های جدید و در نتیجه سرو تیپ‌ها و ژنوتیپ‌های جدید بعید نباشد.

مطالعه حاضر همانند تحقیقات Wu و Sun در سال ۲۰۰۸ حضور ژنوتیپ‌های جدید را برای اولین بار در کشور اعلام می‌کند این نکته بیانگر تولید ویروس‌های H9N2 جدید با خواص بیولوژیکی متفاوت است بنابراین مطالعه حاضر بر پایش ویروس‌های H9N2 کشور در جمعیت پرندگان اهلی و وحشی آبی برای درک بهتر از روند انتقال بین گونه‌ای (انتقال ویروس‌های H9N2 از پرندگان به انسان) و اکولوژی ویروس آنفلوانزا تأکید دارد.

### تشکر و قدردانی

نگارندگان بدین وسیله از مرکز تحقیق و تشخیص بیماری‌های پرندگان موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر به خاطر تامین منابع مالی و انسانی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

### References

1. Abbas, M.A., Swayne, D.E., Ahmed, Z., Sarmento, L., Siddique, N., Naeem, K.h., et al. (2010) Sequence and phylogenetic analysis of H7N3 avian influenza viruses isolated from poultry in Pakistan 1995-2004 *Virology*. 7: 137-146.
2. Alexander, D.J. (2007) An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*. 25: 5637-5644.
3. Alexander, D.J., Spackman, D. (1981) Characterization of influenza A viruses isolated from turkeys during March-May 1979. *Avian Pathol*. 10: 281-293.
4. Cardona, C.J., Xing, Z., Sandrock, C.E., Davis, C.E. (2009) Avian influenza in birds and mammals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. 32: 255-

همین اساس ویروس‌های ایران به دو دسته قابل تقسیم هستند به طوری که میزان تفاوت، بین ویروس‌های هر یک از گروه‌ها بیشتر از ۴٪ نیست در حالی که تفاوت بین ویروس‌های گروه‌های مختلف بین ۸ تا ۱۱٪ می‌باشد این شباهت و نزدیکی در درخت فیلوژنتیکی هم دیده می‌شود به طوری که در آنالیز فیلوژنتیک ژن‌های *PBI* ویروس‌های ایران و ویروس‌های H5N2 و H7N3 آلمان و پاکستان کنار هم قرار می‌گیرند که علت این موضوع را می‌توان وجود مخازن ژنتیکی ویروس آنفلوانزا در پرندگان آبی مهاجر و گسترش سریع این ویروس دانست. به نظر می‌رسد حضور همزمان تحت تیپ‌های H9N2، H5N2 و H7N3 در بازارهای فروش پرندگان یا تالاب‌های کشورمان یا کشورهای همسایه زمینه ساز تبادل ژنتیکی بین این تحت تیپ‌ها را فراهم کرده است (۱). با توجه به شباهت ژنتیکی ویروس‌های H9N2 ایران به ویروس‌های H5، H7 و حضور ژن *PBI* در زیر دودمانی که هنوز تعریف نشده و جدا از گروه‌های کره، Y280 و G1 است به نظر می‌رسد که ژن *PBI* ویروس‌های H9N2 آنفلوانزای ایران متحمل بازآرایی ژنتیکی با تحت تیپ‌های دیگر از جمله H5 و H7 شده است.

Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای که به بررسی خصوصیات مولکولی ژن نوکلئوپروتئین (NP) ویروس آنفلوانزای پرندگان (H9N2) ایران پرداخته بیان کردند در طول سال‌های شیوع ویروس آنفلوانزا H9N2 ژن (NP) جدیدی از کشورهای چین و کره وارد کشور نشده است و تغییرات ویروس‌های آنفلوانزای کشور در اثر تجمع جهش‌های نقطه‌ای، رخ داده است (۱۷).

مطالعات قبلی که بر روی پروتئین‌های سطحی (هماگلوترینین و نورآمینیداز) ویروس آنفلوانزا (H9N2) صورت گرفته ویروس‌های G1 را بهترین دودمان استقرار یافته در ایران می‌دانند و بیان می‌دارند که هیچگونه بازآرایی بین ویروس‌های ایران علی‌رغم چرخش وسیع و همزمان ویروس‌های H5N1 و H9N2 دیده نشده است (۱۴، ۱۵، ۱۶). بر خلاف نتایج مطالعات قبلی نتیجه مطالعه حاضر نشان می‌دهد ویروس‌های ایران متحمل بازآرایی مستقیم ژنتیکی شده‌اند به طوری که ویروس‌های که دارای پروتئین‌های سطحی (هماگلوترینین و نورآمینیداز) از خانواده G1 هستند ژن‌های کدکننده پروتئین‌های داخلی ایشان (مثل PB1) در گروه‌های غیر از G1 قرار می‌گیرند لذا بر اساس تفاوت در رابطه فیلوژنتیک ژن *PBI* و با توجه به اطلاعات موجود از مطالعات ژن‌های دیگر همین ویروس‌ها که در مطالعات قبلی ما به آن پرداخته شده (۱۷، ۱۶) ویروس‌های H9N2 ایران حداقل داری ۲ ژنوتیپ G و F می‌باشند که این ژنوتیپ‌ها محصول بازآرایی بین ویروس‌های H9N2، H7N3، H5N2 می‌باشد.

Wu و همکاران در سال ۲۰۰۹ هفت جایگاه بسیار محافظت شده را در موقعیت‌های Ile 523، The 448، Leu 419، Gln 247، Pro 187، Ala 39، Ile 607 در پروتئین PB1 ویروس‌های H9N2 شناسایی کردند. که تغییر



- 273.
5. Homayounimehr, A.R., Dadras, H., Shoushtari, A.H., Pourbakhsh, S.A. (2010) Sequence and phylogenetic analysis of the haemagglutinin genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commercial chickens in Iran. *Trop. Anim. Health Prod.* 42:1291-1297.
  6. Iqbal, M., Yaqub, T., Reddy, K., Cauley, J.W. (2009) Novel genotypes of H9N2 influenza A viruses isolated from poultry in Pakistan containing NS genes similar to highly pathogenic H7N3 and H5N1 viruses. *PLoS ONE.* 4: 1-8.
  7. Langeroudi, A.G., Karimi, V., Kheiri, M.T., Mahboudi, F., Barin, A. (2008) Nucleotide and amino acid sequence analysis of hemagglutinin protein in cleavage site region of H9N2 isolated from broiler in Tehran Province during 1998-2007. *J. Anim. Vet. Adv.* 7:529-534.
  8. Knipe, D.M., Howely, P.M. (2007) *Orthomyxoviridae in Fields Virology.* (5<sup>th</sup> ed.) Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.
  9. Lee, C.W., Saif, Y.M. (2009) Avian influenza virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32: 301-310.
  10. Lupiani, B., Reddy, S.M. (2009) The history of avian influenza. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32: 311-323.
  11. Moosakhani, F., Kivanfar, H., Shoushtari, A.H., (2006) Characterization of hemagglutinin gene of influenza A H9N2 viruses isolated from industrial poultry of Iran during 2004-2005. *Iranian J. Vet. Sci.* 1: 194-185.
  12. Rahimian, A., Shoshtari, A.H., Pourbakhsh, S.A., Momayez, R., Rahimi, E., Mehrabanpour, M.J (2009) Serological and molecular survey of avian influenza H9N2 infection in human poultry farm industries. *Med. J. Mashhad Univ. Med. Sci.* 52: 133-140.
  13. Plese, P., Bouvier, N.M. (2008) The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 26:49-53.
  14. Portaghi, H., Kivanfar, H., Shoushtari, A.H. (2008) Sequence and phylogenetic analysis of neuraminidase genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commercial broiler chicken in Iran (2003 & 2004) *Iranian J. Vet. Sci.* 2: 391-40.
  15. Shoushtari, A.H., Habl-Alvarid, M.H., Vascellari, M., Hedayati, A. (2007) Mortality of wild swans associated with naturally infection with highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in Iran. *Arch. Razi Inst.* 62: 207-213.
  16. Soltanianlar, M., Shoshtar, H., Bozorgmehrifard, M., Charkhar, S. (2010) Molecular characterization of hemagglutinin, and neuraminidase genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commercial broiler chicken in Iran. *J. Biol. Sci.* 10: 145-50.
  17. Soltanianlar, M., Shoshtari, H., Morovati, M., Gharoni, M., Daliranni, A., Akbarnejad, F. (2011) Sequence and phylogenetic analysis of nucleoprotein gene in Iranian H9N2 avian influenza viruses, *Modares. J. Med. Sci. Pathol.* 13: 43-51.
  18. Sun, Y., Pu, J., Jiang, Z., Guan, T., Xia, Y., Xu, Q. (2010) Genotypic evolution and antigenic drift of H9N2 influenza viruses in China from 1994 to 2008. *Vet Microbiol.* 146: 215-225.
  19. Tosh, C., Nagarajan, S., Behera, P., Rajukumar, K., Purohit, V., Kamal, R.P., et al. (2008) Genetic analysis of H9N2 avian influenza viruses isolated from India. *Arch. Virol.* 153: 1433-1439.
  20. Wu, R., Sui, Z.W., Zhang, H.B., Chen, Q.J., Liang, W.W., Yang, K.L., et al. (2008) Characterization of a pathogenic H9N2 influenza A virus isolated from central China in 2007. *Arch. Virol.* 153:1549-1555.
  21. Wu, R., Zhang, H., Yang, K., Liang, W., Xiong, Z., Liu, Z., Yang, X., Shao, H. (2009) Multiple amino acid substitutions are involved in the adaptation of H9N2 avian influenza virus to mice. *Vet Microbiol.* 138: 85-91.
  22. Xu, K.M., Smith, G.J.D., Bahl, J., Duan, L., Tai, H., Vijaykrishna, D., et al. (2007) The genesis and evolution of H9N2 influenza viruses in poultry from southern China, 2000 to 2005 *Virology.* 81: 10389-10401.



## Sequence and phylogenetic analysis of (*PB1*) gene in Iranian H9N2 avian influenza viruses

Soltani, M.<sup>1\*</sup>, Shoushtari, A.H.<sup>2</sup>, Goodarzi, R.<sup>3</sup>, Vosoghi, H.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Division of Avian Diseases, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University Shoushtar Branch, Khozestan-Iran.

<sup>2</sup>National Reference Avian Influenza Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Tehran- Iran.

<sup>3</sup>Division of Pathology, Faculty of Agriculture Islamic Azad University Broujerd Branch, Lorestan-Iran.

<sup>4</sup>Laboratory campus, Faculty of Agriculture Islamic Azad University Broujerd Branch, Lorestan- Iran.

(Received 12 February 2012 , Accepted 2 May 2012)

### Abstract:

**BACKGROUND:** Viral (H9N2) polymerase complex in Avian influenza viruses is composed of the PB1, PB2, and PA protein subunits. These subunits are crucial for viral transcription and replication. The PB1 subunit forms the core of the polymerase complex. It plays a key role in RNA synthesis. **OBJECTIVES:** Survey on molecular characterization of *PB1* gene in H9N2 viruses and determination of genetic relationship between Iranian H9N2 viruses and other Asian viruses. **METHODS:** Seven H9N2 viruses were isolated from commercial broiler chickens in Iran during 2008-2009 and their *PB1* genes were analyzed by RT-PCR and sequencing. Meanwhile, nucleotide sequences (Open Reading Frame: orf) of the *PB1* genes were used for phylogenetic tree construction. **RESULTS:** Phylogenetic analysis of the *PB1* gene showed that all Iranian viruses form a separate unknown sublineage. On the other hand, while nucleotide sequence comparisons indicated high genetic diversity in Iranian viruses, a close homology (95-96%) was shown with H5 or H7 subtypes when compared with established H9N2 Eurasian sublineages (G1, Korean and Y280-like). **CONCLUSIONS:** The results indicate that H9N2 viruses in Iran have undergone striking reassortment to generate some new genotypes.

**Key words:** phylogenetic analysis, *PB1* gene, avian influenza viruses, Iran.

### Figure Legends and Tabel Captions

**Figure 1.** The *PB1* genes of Iranian viruses indicated greater genetic diversity and shared a high level of similarity to *PB1* genes from either H5 or H7 subtypes.

**Figure 2.** Newly identified genotype of H9N2 viruses. Phylogenetic analysis of the Iranian Polymerase complex genes revealed at least two different genotypes.

**Table 1.** List of the H9N2 viruses isolated in this study.

**Table 2.** Homology of *PB1* genes of Iranian isolates with other avian influenza viruses from GenBank. Abbreviations Qa: Quail, DK: Duck, Ck: chicken, Ir: Iran, Kch: Karachi, ST: Shantou, PS: postdam

**Table 3.** Amino acid residues in *PB1* gene which involved in the adaptation. of H9N2 avian influenza virus to mice. A: Alanine, R: Arginine, Q: Glutamine, L: Leucine, T: Threonine, I: Isoleucine, E: Glutamic Acid, P: Proline, K: Lysine, F: Phenylalanine.