

تعیین هویت مولکولی و مطالعه شجره شناسی بر اساس ژن ماتریکس (M) ویروس آنفلوآنزای پرندگان (H₉N₂) در ایران بین سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۷۷

شهرام کریمی^۱ و وحید کریمی^۲ آرش قلیان چی لنگرودی^{۳*} امید مددگار^۲ حمیده نجفی^۳ حسین مقصودلو^۴

(۱) دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(۲) گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(۳) گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(۴) سازمان دامپزشکی کشور، تهران-ایران

(دریافت مقاله: ۲۹ بهمن ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۷ فروردین ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: در دهه گذشته موارد متعددی از بیماری آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H₉N₂ بصورت پانزوتیک رخ داده و از سال ۱۳۷۷ موارد متعددی از بیماری آنفلوآنزای پرندگان (تحت تیپ H₉N₂) در صنعت طیور ایران گزارش شده است و از آن زمان واکسن کشته H₉N₂ برای کنترل بیماری در ایران استفاده شد. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی تعیین هویت مولکولی و شجره شناسی بر اساس ژن ماتریکس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H₉N₂ جدا شده از گله‌های گوشتی استان تهران از سال ۱۳۷۷-۱۳۸۷ می‌باشد. **روش کار:** در این مطالعه منطقه کد کننده ژن ماتریکس هشت ویروس آنفلوآنزای پرندگان H₉N₂ جداسازی شده از گله‌های گوشتی استان تهران از سال ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۷ به طور کامل تعیین توالی گردید. **نتایج:** تجزیه و تحلیل حاصل از بررسی توالی مناطق ژن ماتریکس و مطالعه شجره شناسی ویروس‌های مورد مطالعه بیانگر این است که توالی ژنی این منطقه از ویروس‌های جداسازی شده در مقایسه با توالی سویه استاندارد که در بانک ژن وجود دارد، تفاوتی‌هایی را در سطوح مختلف نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل سکناس ژن ماتریکس نشان از جهش‌هایی در این ژن می‌باشد. مطالعه شجره شناسی نشان می‌دهد که این ویروس‌های جداسازی شده مربوط به تحت دودمان G1 می‌باشند. در این مطالعه نشان داده شده است که سویه‌های ایران بر اساس این ژن به دو گروه تقسیم گردیده‌اند. همچنین در این مطالعه نشان داده شده است ژن ماتریکس ویروس‌های H₉N₂ سویه‌های ایران در بین سال‌های مورد مطالعه بیشترین شباهت را به سویه‌های پاکستان، فلسطین اشغالی و امارت متحده عربی دارد. **نتیجه‌گیری نهایی:** این مطالعه نشان می‌دهد که ژن ماتریکس سویه‌های در حال گردش در ایران دچار تغییر شده و حفاظت در مورد این ژن رخ نداده است. نتایج این مطالعه بر پایش دقیق و ادامه دار در زمینه بیماری آنفلوآنزای پرندگان در کشور را تأکید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: مطالعه شجره شناسی، ژن ماتریکس، H₉N₂

مقدمه

Influenza (HPAI) و آنفلوآنزای غیر حاد پرندگان (NHPAI) (Non-Highly Pathogenic Avian Influenza) تقسیم می‌شوند که دسته اخیر خود به چهار گروه بیماریزا، بیماریزایی ملایم، کم بیماریزا و غیر بیماریزا تقسیم می‌گردد (۲). *Vasfi marandi* و همکاران در اوایل تیرماه سال ۱۹۹۸ توانستند برای اولین بار این تحت تیپ را گزارش کنند (۱۲). تشخیص نهائی بر مبنای جداسازی ویروس از نمونه‌های بافت‌های آسیب دیده پرندگان مبتلا، توسط مرکز تشخیص دانشگاه ویرجین انگلستان صورت گرفت. مشخصات ویروس جدا شده *9W/101-A/Chicken/ZMT* تحت تیپ H₉N₂ بود. تحت تیپ جدا شده از ایران در آزمایش‌های ویروس شناسی، نه چندان بیماریزا شناخته شد (۱۲، ۱۰). دو دودمان مجزای ویروس‌های آنفلوآنزای H₉N₂ تعریف شده است: دودمان آمریکای شمالی و دودمان اور آسیایی که از دو زیرگروه اصلی تشکیل شده است که توسط سویه‌های پروتوتیپ بیان می‌شوند: زیرگروه G1 که ویروس پروتوتیپ آن *9W/quail/Hong Kong/G1* و زیرگروه Y280 که ویروس پروتوتیپ آن *9W/duck/Hong Kong/Y280* است (۳). قطعه هفتم ژنوم ویروس آنفلوآنزا کد کننده دو پلی پپتید به نام‌های پروتئین ماتریکس M1

آنفلوآنزای پرندگان یکی از بیماری‌های بسیار مسری است که با آسیب‌های اقتصادی و تهدید سلامتی در حیوانات و انسان مرتبط می‌باشد. ویروس آنفلوآنزای پرندگان در طیور سبب علائم بالینی متنوع از عفونت تحت بالینی تا بیماری بسیار حاد با تلفات صدها درصد می‌گردد (۷). ویروس‌های آنفلوآنزا اجزاء خانواده ارتومیکسوویریده طبقه بندی می‌شوند. خانواده ارتومیکسوویریده شامل ویروس‌هایی می‌باشد که ماده ژنتیکی آن RNA، سنس منفی، قطعه قطعه و تک رشته‌ای به صورت مدور و چند شکلی می‌باشد. ژنوم ویروس آنفلوآنزا ده نوع پروتئین مختلف کد می‌نماید. هشت پروتئین (*NP, M1, HA, NA, M2, PA, PB1, PB2*) سازنده ساختمان ویریون و دو پروتئین (*NS1, NS2*) غیر ساختمانی می‌باشند. ویروس‌های این خانواده بر اساس اختلاف پادگنی نوکلئوپروتئین (*NP*) و پروتئین ماتریکس (*M*) به سه تیپ A و B و C تقسیم می‌شوند (۴). ویروس‌های آنفلوآنزای A به طور طبیعی گستره متنوعی از گونه‌های پرندگان، انسان و پستانداران دیگر شامل خوک و اسب را آلوده می‌کنند. ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان به دو دسته کلی ویروس‌های بسیار بیماریزای پرندگان (*Highly Pathogenic Avian*)



شامل مراحل ذیل بود: یک سیکل واسرشت اولیه: 30°C ، 50°C دقیقه، 94°C ، 2 دقیقه، 95°C ، 3 دقیقه، 35°C سیکل (واسرشت اولیه: 95°C ، 45 ثانیه، اتصال: 58°C ، 35 ثانیه، تکثیر: 72°C ، 70 ثانیه) یک سیکل تکثیر نهایی 73°C ، 10 دقیقه. سپس محصول واکنش در ژل آگاروز 1% مورد بررسی قرار گرفت. در این طرح جهت تعیین توالی، نمونه‌ها جهت خالص سازی، تعیین مقدار و توالی یابی به شرکت کرهای Bioneer ارسال گردید. جهت ویرایش و بازسازی توالی‌های تعیین شده از نرم افزار MEGA5 استفاده و جهت تعیین توالی اسید آمینه‌ای مربوط به هر سکانس نوکلئوتیدی نیز از (5/5) CLC Bio Main workbench استفاده گردید. جهت مطالعه شجره‌شناسی و بررسی تکامل مولکولی نرم افزار MEGA5 با استفاده از مدل Neighbor-Joining با آزمون ریشه‌ای (Boot Strap) 1000 تکرار به کار گرفته شد (15). در مطالعه شجره‌شناسی از جدایه‌های مرجع، نمایندگان شاخه‌های مختلف ویروس (Y49، Y28، G1، G9، G1) جدایه‌های کشورهای همسایه و همچنین دو جدایه ایرانی H9N2 پس از استخراج از بانک ژن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت توالی‌های بدست آمده در بانک ژن ثبت گردید و شماره‌های دسترسی جهانی به آنها اختصاص یافت.

نتایج

محصول PCR قطعه مورد نظر بر روی ژل مورد بررسی اولیه قرار گرفت و طول قطعه حدود 1000 جفت باز بود. قطعه 7 (کل پروتئین M) از ویروس آنفلوآنزای A، شامل 1027 نوکلئوتید و 344 اسید آمینه می‌باشد، که از این تعداد 758 نوکلئوتید (78-26) با 252 اسید آمینه مربوط به پروتئین M1 و 291 نوکلئوتید (107-104 + 74-52) با 97 اسید آمینه مختص پروتئین M2 می‌باشد و همانطور که مشاهده می‌شود در دو ناحیه این دو قسمت با هم، همپوشانی نیز دارند. مطالعات شجره‌شناسی ژن ماتریکس جدایه‌های کشور با جدایه‌های دیگر در دنیا نشان داد که جدایه‌های آنفلوآنزای پرندگان H9N2 ایران در دو گروه متفاوت با توجه به سال جدا سازی قرار می‌گیرند (تصویر 1) که در هر دو گروه شباهت بالایی را به ترتیب به جدایه‌های کشور پاکستان، امارات متحده عربی، عربستان سعودی و فلسطین اشغالی نشان می‌دهند. درصد شباهت بین جدایه‌های مورد مطالعه براساس اسید نوکلئیک بین $93/24\%$ (بین TH77، TH78) تا $99/07\%$ بوده است. جدایه‌های اخیر کشور (TH85، TH81، TH90) درصد بالایی از تشابه را جدا یه‌های (Pakistan/UDL) -Karachi/NARC (2004/10) (HVN3) (99/6)٪) نشان می‌دهند. در مقایسه ژن ماتریکس (M) جدایه‌های ایران با ویروس پروتوتایپ تحت تیپ H9N2 در هیچکدام از هشت جدایه مطالعه شده در ناحیه قطعه مورد مطالعه اضافه شدن و یا حذف مشاهده نمی‌شود. در این مطالعه تغییرات موقعیت‌های مهم اسید آمینه‌ای مورد نظر در مقاومت داروی ضد ویروسی و اسید آمینه‌های مرتبط با طیف میزبانی و حدت در

و پروتئین کانال یونی M2 می‌باشد. پروتئین M1 یک پروتئین ویروس آنفلوآنزا می‌باشد که لایه درونی پوشش ویروس را تشکیل می‌دهد. پروتئین M2 ویروس‌های آنفلوآنزای A، یک پروتئین تترامری نوع سوم سراسری غشاء می‌باشد. عملکرد کانال M2 می‌تواند بوسیله داروهای ضد ویروسی آمانتادین و ریمانتادین مهار گردد، که از غلبه ویروس بر سلول میزبان جلوگیری می‌نمایند (8). با توجه به وضعیت درگیری بیماری آنفلوآنزا در کشورهای همسایه بخصوص پاکستان، عربستان سعودی، ترکیه و عراق و گسترش ویروس‌های H9N2 در منطقه، در کشور کنترل و بررسی دائمی خصوصیات این ویروس و بیماری حاصل از آن ضرورت می‌یابد (1). در کشور ما نیز درگیری با ویروس تحت تیپ H9N2 از تیر 1998 تا کنون ادامه داشته و به طور مداوم خسارات بسیار سنگینی به پیکر صنعت طیور وارد آورده است، لذا کنترل مداوم این ویروس‌ها بسیار ضروری است و بدین منظور باید تغییرات احتمالی در ویروس مزبور مورد بررسی قرار گیرد. هدف از این مطالعه بررسی شجره‌شناسی براساس ژن ماتریکس ویروس آنفلوآنزای H9N2 جدا شده از گله‌های گوشتی در کشور از سال‌های 1998 تا 2010 می‌باشد.

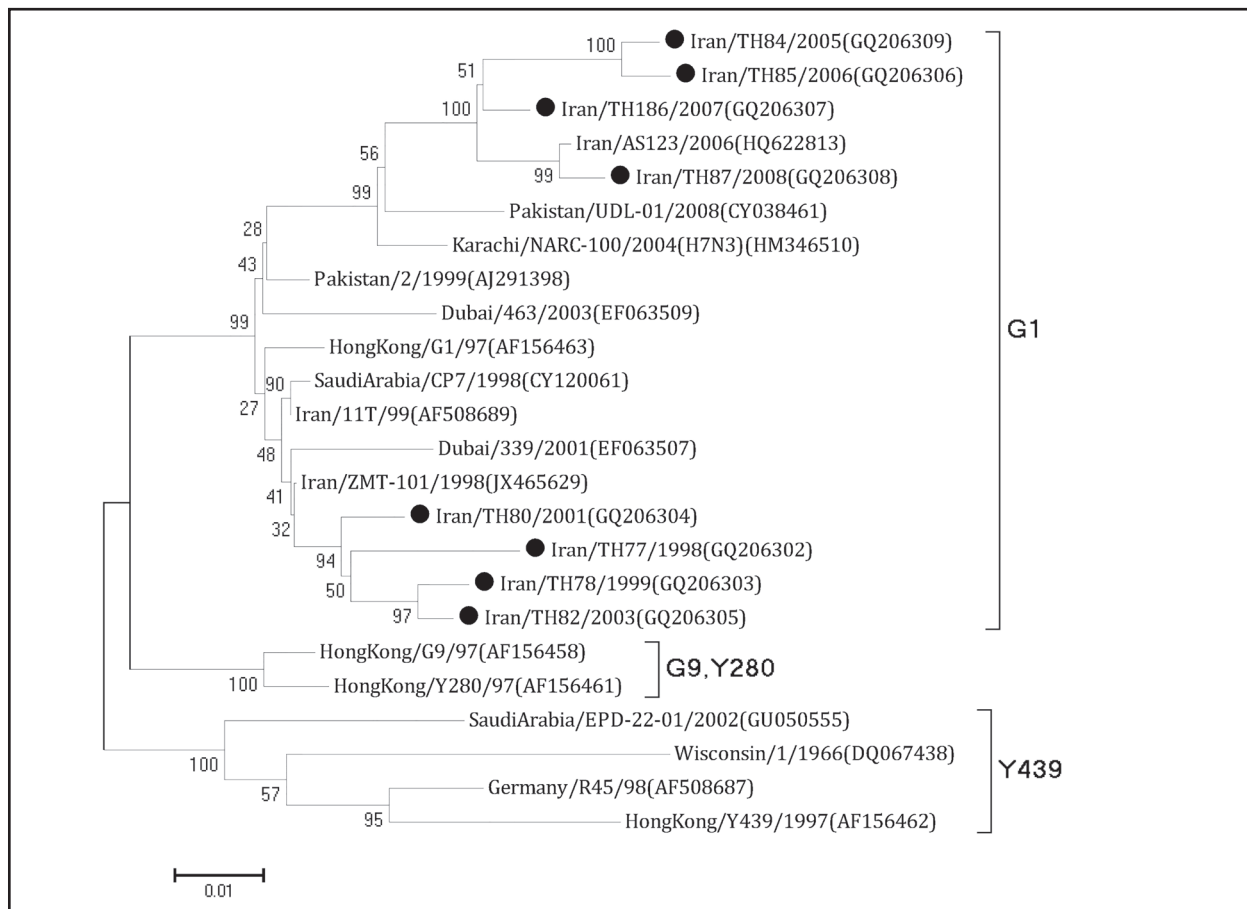
مواد و روش کار

در این مطالعه هشت نمونه ویروس آنفلوآنزای پرندگان H9N2 مورد بررسی قرار گرفتند. هفت نمونه مربوط به سال‌های قبل، از بخش ویروس شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در مطالعات قبلی مورد استفاده قرار گرفته بودند، اخذ گردید. جهت نمونه سال 1998 تعدادی نمونه بافتی شامل نای، ریه و روده از گله‌های گوشتی مشکوک و تحت نظر و تأیید سازمان دامپزشکی کشور از استان قزوین جهت جداسازی ویروس مورد استفاده قرار گرفت. نمونه در کیسه آلانتوئیک تخم مرغ جنین دار نه روزه کشت و پس از استخراج مایع آلانتوئیک توسط آزمون‌های استاندارد تأیید گردید (14، 13). جهت استخراج RNA نمونه‌های آلانتوئیک، از کیت استخراج RNA بنام High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Co., Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. RNA استخراج شده در 70°C - تا زمان استفاده ذخیره سازی گردید. جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز به روش نسخه برداری معکوس، از کیت Titan One Tube RT-PCR System (Roche Co., Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه عبارت بودند از:

M2UF: 5' GGA ATT CCA TAT GAG TCT TCT AAC)3'
3'(CGA G
M2LR: 5' GGA ATT CCT TAC TCC AGC TCT ATG)3'
3'(TTG

شرایط دمایی و زمانی ترموسایکلر جهت واکنش زنجیره ای پلیمرز





تصویر ۱. درخت مربوط به مطالعات شجره‌شناسی جدایه‌های ویروس آنفلوآنزای پرندگان H9N2 از جوجه‌های گوشتی طی سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۱۰ بر اساس ژن ماتریکس M. درخت فوق با نرم افزار MEGA5 با روش Neighbor-Joining و از منو ریشه‌ای ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شده است جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه با دایره توپر مشکی مشخص گردیده است.

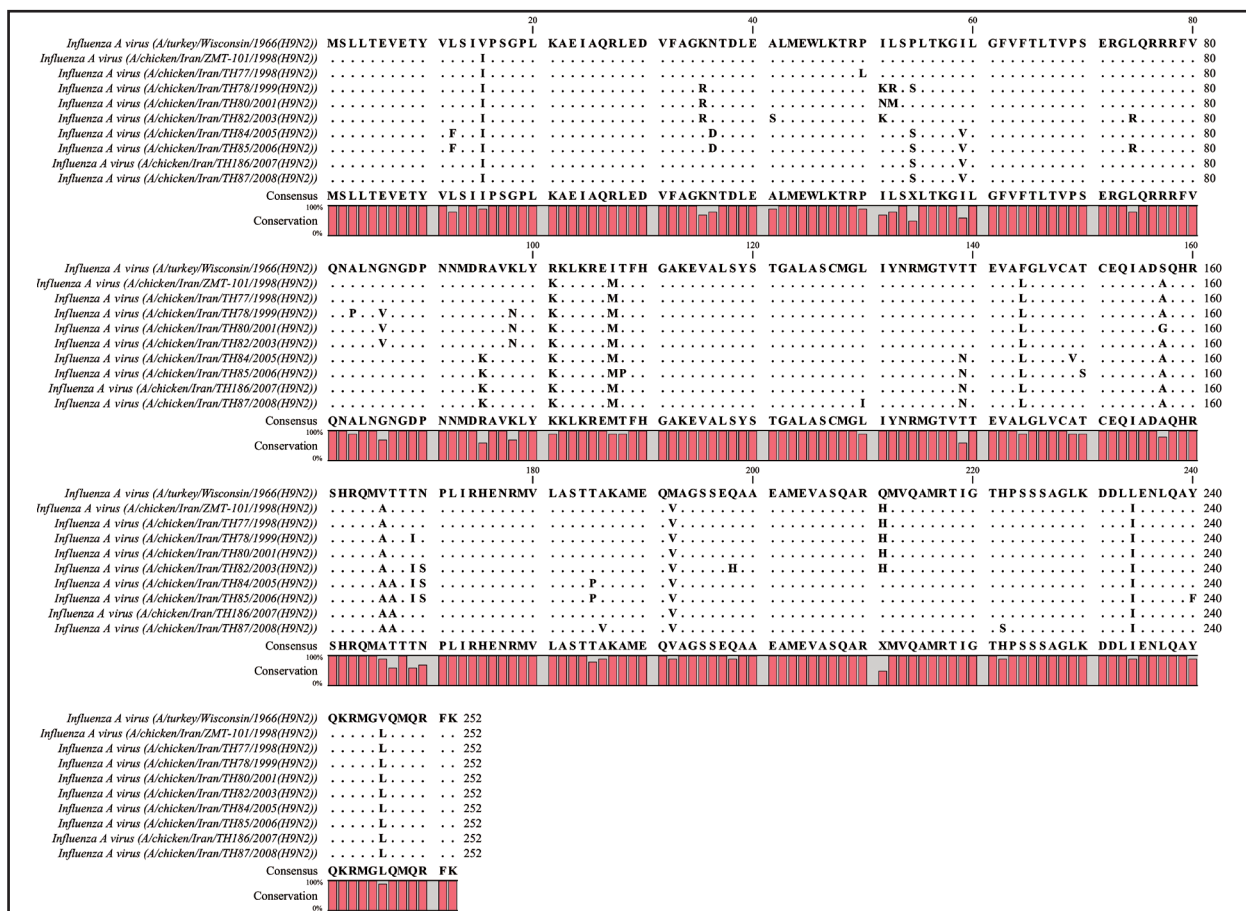
اردک (ST-DK1 و ST-DK2) و جدایه‌های جنوب شرقی نیز اخیراً در تقسیم بندی اضافه گردیده است (۵). ویروس‌های جدا شده از ایران بر اساس ژن ماتریکس (M) در همان تحت دودمان G1 قرار می‌گیرند و در طول این ۱۰ سال هیچ گونه تغییر دودمانی مشاهده نشده است و دودمان‌های آمریکایی و خوکی‌جانی می‌گیرند. جدایه‌های ایران در یک شاخه جداگانه از سایر جدایه‌های ایران که در طول سال‌های ۱۹۹۸-۲۰۰۱ جدا شده بودند، قرار گرفتند. بنظر می‌رسد جدایه‌های ایران از سال ۲۰۰۶ دچار تغییرات شدیدی شده‌اند که شاخه آنها در درخت شجره‌شناسی تغییر نموده است. ژن ماتریکس (M) جدایه‌های بعد از سال ۲۰۰۲ دارای شباهت بالا با سویه Karachi/NARC-۲۰۰۴/۱۰۰- (HVN3) می‌باشند. البته دو گروه شدن ویروس‌های H9N2 ایران در مورد ژن‌های هم‌گلوترین (HA) و غیر ساختاری (NS) نیز گزارش شده است (۶). یکی از روندهای تکامل ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان باز آرای می‌باشد. در حال حاضر، باز آرای ویروس‌های H9N2 با ویروس‌های بسیار بیماریزا H5N1 و H5N3 تنها در چین و پاکستان تشخیص داده شده است. چرخش همزمان این تحت تیپ‌ها در بعضی از کشورها می‌تواند منجر به پدیده باز آرای گردد (۶). تحقیقاتی که توسط Banks و همکارانش در سال ۲۰۰۰ طرقی و

پروتئین‌های M1 و M2 مورد بررسی قرار گرفتند که در قسمت بحث به بررسی دقیق آنها خواهیم پرداخت.

بحث

آلودگی به ویروس آنفلوآنزای پرندگان در صنعت طیور ایران نخستین بار توسط تحت تیپ H9N2 در سال ۱۹۹۸ در استان قزوین تشخیص داده شد و از آن زمان به بعد در کشور به شکل اندمیک در آمده است (۱۲). در طول شیوع بیماری، اکثر گله‌های گوشتی و تخم‌گذار توسط ویروس H9N2 آلوده شدند. اگرچه این ویروس، در رده ویروس‌های نه‌چندان بیماریزا تقسیم بندی شد، اما گهگاهی سبب تلفات بالا تا ۶۵٪ و کاهش شدید تولید تخم مرغ می‌گردید. در پاسخ به چرخش این ویروس در کشور و کاهش اثرات اقتصادی این بیماری، برنامه واکسیناسیون در برابر این ویروس اجرا گردید. علی‌رغم استفاده از واکسن غیر فعال، ویروس‌های H9N2 در ایران و سایر کشورهای آسیایی و خاورمیانه ریشه کن نشده است (۶). دودمان‌های تحت تیپ H9N2 به دو دودمان آمریکای شمالی و آسیایی - اروپایی تقسیم می‌شود. دودمان اخیر نیز خود به سه زیر شاخه G1، G9، و Y439 تقسیم بندی می‌شود. اگر چه زیر شاخه‌ای مختلف از





تصویر ۲. هم‌ردیفی توالی‌های اسید آمینه‌ای پروتئین M1 جدایه‌های ویروس آنفلوآنزای پرندگان H9N2 در ایران طی سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۱۰.

پروتئین M2 که مقاومت دارویی نسبت به آمانتادین را بیان می‌کنند عبارتند از: $I.3AF$ ، $L26F.V7YA$ ، $A30.T.S31N.G34E$. با مقایسه آمینو اسیدها در جایگاه ۳۱ مشاهده گردید که، اسید آمینه سرین (S) که در توالی مورد توافق در جدایه‌های اولیه قرار داشت، در جدایه‌های جدید (TH84، TH85، TH186) به اسپارژین (N) جهش یافته بود، که در نتیجه منجر به مقاومت ویروس نسبت به داروی ضد ویروس آمانتادین گردید. یافته‌های ما بیان می‌کند که بررسی و ارزیابی حساسیت به یک دارو و یا مقاومت به آن لازم و ضروری می‌باشد، بعلاوه نیاز به کنترل مصرف دارو در طی وقوع و شیوع بالای ویروس‌های آنفلوآنزای بیماریزا در انسان و دام ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه، اسید آمینه‌های مرتبط با طیف میزبانی و حدت در پروتئین M1 (V)15 و (V)115 و (V)121 و (I)137 (در طول چند سال ثابت بوده و تغییری نکرده بودند. در موقعیت این نوع اسید آمینه‌های (G)20 و (S)20 و (F)55 و (Y)57 و (Q)78 و (V)86)) در پروتئین M2 به غیر از اسید آمینه شماره ۱۱ (T به S در جدایه TH85) و (از V به F در جدایه‌های TH84، TH85، TH186، TH87) تغییری مشاهده نگردید (تصویر ۳). با توجه به نتایج این مطالعه و سایر نتایج منتشر شده از این گروه و سایر محققین پیشنهاد می‌گردد که پایش منظم بر روی ویروس H9N2 در کل کشور از جدایه‌های مرغداری‌های صنعتی، بومی،

همکارانش در سال ۲۰۰۴، Karimi و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی ژن هم‌گلوکوتینین انجام شد، نشان می‌دهد ویروس‌های ایران، عربستان سعودی، آلمان، پاکستان از لحاظ دودمانی منشأ مشترک دارند. که این مطلب نیز در این مطالعه مورد تأیید قرار گرفته است (۵،۹،۱۶). Manzoor و همکاران در سال ۲۰۰۸ طی مطالعه‌ای از سال ۲۰۰۷-۲۰۰۰، پرندگان آبری هوکایدو ژاپن از ۲۱۸ مورد ویروس آنفلوآنزا از ۲۸ تحت تیپ مختلف (H1-HA(H1) NA(N1) (H13-NA(N1))، با تجزیه و تحلیل شجره‌شناسی ژن ماتریکس (M) در ۱۵۱ مورد ویروس آنفلوآنزا، ۶۷ جدایه از تحت تیپ H10 و NA8 و ۱۸ جدایه از تحت تیپ‌های مختلف، ژن ماتریکس (M) آنها متعلق به دودمان آمریکای شمالی و بقیه ژن‌ها متعلق به دودمان اروپایی-آسیایی می‌باشد (۱۱). Bashashati و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای نشان دادند که دو جدایه H9N2 مربوط به سال‌های ۱۹۹۸ و ۲۰۱۰ ایران متعلق به ایران زیر شاخه G1 می‌باشد. تجزیه و تحلیل توالی پروتئین M2 نشان داد که سویه A/10/88-Ck/IR/EBGV دارای موتاسیون A277 می‌باشد که بیانگر مقاومت این ویروس نسبت به این دارو می‌باشد که الگویی متفاوت از جهش‌های مقاومت با امانتادین (S31N) در این مطالعه می‌باشد (۶). در این مطالعه شجره‌شناسی ویروس آنفلوآنزای H9N2 بر اساس ژن کامل M مورد بررسی قرار گرفت. جهش‌های مشخصی در



Turkey/Wisconsin/1/1966(AEA04410)	MSLLTEVETP	TRNGWECKCS	DSSDPLVIAA	SIIGILHLIL	40
Iran/ZMT-101/1998(AFQ60227)LG.R.V.	40
Iran/TH77/1998(ACR56258)LG.R.V.	40
Iran/TH78/1999(ACR56260)LG.R.V.	40
Iran/TH80/2001(ACR56262)LG.R.V.	40
Iran/TH82/2003(ACR56264)LG.R.V.	40
Iran/TH84/2005(ACR56272)LG.R.F.	NV.....	40
Iran/TH85/2006(ACR56266)L	S.....G.R.F.	NV.....	40
Iran/TH186/2007(ACR56268)LG.R.F.	NV.....	40
Iran/TH87/2008(ACR56270)LG.R.F.F.	40
Turkey/Wisconsin/1/1966(AEA04410)	WILDRLFFKC	IYRRIKYGLK	RGPSTEGVPE	SMREEYRQEQ	80
Iran/ZMT-101/1998(AFQ60227)F.	80
Iran/TH77/1998(ACR56258)F.	80
Iran/TH78/1999(ACR56260)L.F.	80
Iran/TH80/2001(ACR56262)F.	80
Iran/TH82/2003(ACR56264)F.	80
Iran/TH84/2005(ACR56272)F.A.	80
Iran/TH85/2006(ACR56266)F.A.	80
Iran/TH186/2007(ACR56268)F.	80
Iran/TH87/2008(ACR56270)F.	80
Turkey/Wisconsin/1/1966(AEA04410)	QSAVDVDDGH	FVNI E L E	97		
Iran/ZMT-101/1998(AFQ60227)	. N	97		
Iran/TH77/1998(ACR56258)	. N K	97		
Iran/TH78/1999(ACR56260)	. N V K	97		
Iran/TH80/2001(ACR56262)	. N K	97		
Iran/TH82/2003(ACR56264)	. N V K	97		
Iran/TH84/2005(ACR56272)	. N V K	97		
Iran/TH85/2006(ACR56266)	. N	L K	97		
Iran/TH186/2007(ACR56268)K	97		
Iran/TH87/2008(ACR56270)K	97		

تصویر ۳. هم‌ردیفی توالی‌های اسید آمینه‌ای پروتئین M2 جدایه‌های ویروس آنفلوآنزای پرندگان H9N2 در ایران طی سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۱۰. جهش مقاومت به آماتادین در سه جدایه در موقعیت ۵۳۱N مشخص گردیده است.

بازار پرندگان زنده و پرندگان آبی بصورت سالانه انجام گیرد تا اطلاعات ژنتیکی کشور جهت تعیین هرگونه جهش و نوترکیبی در این ویروس که می‌تواند خسارات اقتصادی و حتی تهدید بهداشت عمومی ایجاد نماید، به روز و کامل گردد. همچنین کنترل و اطلاع رسانی بر روی مصرف داروهای ضد ویروسی در مرغداری‌ها و انجام تحقیقات بر روی داروهای گیاهی ضد ویروسی نیز توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در قالب پایان نامه دکتری عمومی (شماره ۷۵۰۸۰۱۳/۶/۸) قدردانی نمایند.

A viruses of H9 haemagglutinin subtype. Avian Pathol. 29: 353-9.

- Bashashati, M., Vasfi Marandi, M., Sabouri, F. (2013) Genetic diversity of early (1998) and recent (2010) avian influenza H9N2 virus strains isolated from poultry in Iran. Arch Virol. 158: 2089-100.

References

- Aamir, U.B., Wernery, U., Ilyushina, N., Webster, R.G. (2007) Characterization of avian H9N2 influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to 2003. Virology. 361: 45-55.
- Alexander, D.J. (2000) A review of avian influenza in different bird species. Vet Microbiol. 74: 3-13.
- Alexander, P.E., De, P., Rave, S. (2009) Is H9N2 avian influenza virus a pandemic potential? Can J Infect Dis Med Microbiol. 20: e35-6.
- Arafa, A.S., Hagag, N., Erfan, A., Mady, W., El-Husseiny, M., Adel, A., Nasef, S. (2012) Complete genome characterization of avian influenza virus subtype H9N2 from a commercial quail flock in Egypt. Virus Genes. 45: 283-94.
- Banks, J., Speidel, E.C., Harris, P.A., Alexander, D.J. (2000) Phylogenetic analysis of influenza



7. Faruqi, F., Mukundan, D. (2010) 2009 pandemic influenza: a review. *Curr Opin Pediatr.* 22: 530-5.
8. Huang, Y., Hu, B., Wen, X., Cao, S., Xu, D., Zhang, X., Khan, M.I. (2009) Evolution analysis of the matrix (M) protein genes of 17 H9N2 chicken influenza viruses isolated in northern China during 1998-2008. *Virus Genes.* 38: 398-403.
9. Karimi, V., Fard, M.H.B., 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. *Iran Biomed J.* 8: 167-172.
10. Majidzadeh, K., Karimi, V., Soleimanidor, M., Estabragh, A.S., Barin, A., Langeroudi, A.G. (2011) Phylogenetic study on nonstructural (NS) gene of H9N2 isolated from broilers in Iran during 1998-2007. *Pak J Biol Sci.* 14: 838-843.
11. Manzoor, R., Sakoda, Y., Mweene, A., Tsuda, Y., Kishida, N., Bai, G.R., Kameyama, K., Isoda, N., Soda, K., Naito, M., Kida, H. (2008) Phylogenetic analysis of the M genes of influenza viruses isolated from free-flying water birds from their Northern Territory to Hokkaido, Japan. *Virus Genes.* 37: 144-52.
12. Nili, H., Asasi, K. (2003) Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. *Avian Dis.* 47: 828-831.
13. OIE, A. (2012) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* Office International Des Epizooties, Paris, France.
14. Spackman, E. (2008) *Avian Influenza Virus.* Humana Press. (2th ed.) Totowa, NJ, USA.
15. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28: 2731-9.
16. Toroghi, R., Momayez, R. (2006) Biological and molecular characterization of avian influenza virus (H9N2) isolates from Iran. *Acta Virol.* 50: 163-8.



Molecular characterization and phylogenetic study based on matrix gene of avian influenza viruses (H9N2) in Iran during 1998-2008

Karimi, Sh.¹, Karimi, V.², Ghalyanchi Langeroudi, A.^{3*}, Madadgar, O.³, Najafi, H.³, Maghsoudlo, H.⁴

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

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

³Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

⁴Iran Veterinary Organization, Tehran-Iran

(Received 18 February 2015, Accepted 16 April 2015)

Abstract:

BACKGROUND: H9N2 avian influenza viruses (AIV) A have become panzootic in Eurasia over the last decade and have caused several human infections in Iran since 1998 and inactivated vaccine has been used in chickens to control the disease. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to analyze H9N2 viruses that have infected broiler in Tehran Province, Iran between 1998 and 2008 based on Matrix gene. **METHODS:** The complete coding region of Matrix (M) gene from 8 of H9N2 subtype isolated from chicken flocks in Tehran Province during 1998-2007 was amplified and sequenced. **RESULTS:** Sequence analysis and phylogenetic studies of H9N2 viruses on the basis of data of viruses in this study and other selected strains available in the GenBank were conducted and determined variations among these sequences at different levels. Sequence analysis revealed a large number of similar substitution mutations and close evolutionary relation among sequences of M gene. Phylogenetic analysis showed that all our isolates belonged to the G1-like sublineage. In this study, it was determined that Iran's isolates have been in two separate branches and have the most similarity with Pakistan, United Arab Emirate and occupied Palestine's isolates. **CONCLUSIONS:** The available evidence indicates that M genes of H9N2 circulating in Iran during the past years were not well conserved. Our finding emphasizes the importance of reinforcing AIV surveillance.

Keyword: H9N2, matrix gene, phylogenetic study

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. The phylogenetic tree of H9N2 avian influenza virus isolates of broiler chickens during the period 1998 to 2008 based on genes, Matrix. The phylogenetic tree with the Neighbor-Joining method and test software MEGA5 Bootstrap root 1000 replicates is plotted. Isolates investigated in this study are determined by solid black circle.

Figure 2. Amino acid alignment of M1 protein of Avian Influenza (H9N2) of Iranian isolates between 1998- 2008.

Figure 3. Amino acid alignment of M2 protein of Avian Influenza (H9N2) of Iranian isolates between 1998- 2008.



*Corresponding author's email: ghalyana@ut.ac.ir, Tel: 021-61117154, Fax: 021-66431105

J. Vet. Res. 70, 2:147-153, 2015