مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۱، ۵۲-۴۷

شجره شناسی ویروس آنفلوانزای پرندگان H_9N_2 جدا شده از گله‌های گوشتی ایران براساس ژن پلی مراز *PB1*

آرش قلیان چی لنگرودی[1*] وحید کریمی[2] مسعود هاشم زاده[3] امید مددگار[1] بهار نیری فسایی[1] آزاده شجاعی استبرق[4]

۱) گروه میکرو بیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، کرج - ایران.
۴) بخش کنترل کیفیت واکسن، انستیتو پاستور ایران، کرج - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۷ خرداد ماه ۱۳۹۱ ، پذیرش نهایی: ۱۴ شهریور ماه ۱۳۹۱)

چکیده

زمینه مطالعه: آنفلوانزای پرندگان H9N2 برای اولین بار از بوقلمون در سال ۱۹۶۶ در ایالات متحده جدا و سپس در اروپا و آسیا انزئوتیک گردید. این ویروس برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۷۷ در جوجه‌های گوشتی استان قزوین جداسازی گردید و هم اکنون در کشور اندمیک است. پروتئین پلی مراز PB1 یکی از پروتئین‌های این ویروس است که نقش مهمی در حدت و تعیین محدوده میزبان ایفا می‌کند. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی شجره‌شناسی براساس ژن پلی مراز ۱ (*PB1*) ویروس آنفلوانزای H9N2 جداشده از گله‌های گوشتی در ایران طی سال‌های ۱۳۷۷ تا ۱۳۹۰ بود. **روش‌کار:** در این مطالعه قطعه‌ای از ژن *PB1* چهار جدایه H9N2 جداشده از گله‌های گوشتی طی سالهای ۱۳۷۷ تا ۱۳۹۰ تکثیر و توالی یابی گردید. سپس نتایج حاصله باسایر جدایه‌های اخذشده از بانک ژن مورد تجزیه و تحلیل و مطالعات شجره‌شناسی قرار گرفت. **نتایج:** براساس مطالعات شجره شناسی، جدایه‌های H9N2 در ایران دو گروه جداگانه تشکیل دادند و گروه ویروس‌های حاضر در کشور در گروه جدید خاورمیانه و هند قرار گرفتند. بر اساس توالی اسیدآمینه، تغییراتی در سطح آنها مشابه جدایه‌های عادت یافته به موش و انسان مشاهده شد که این نگرانی را از افزایش تمایل جدایه‌های کشور به میزبان پستاندار بر می‌انگیزد. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ژن *PB1* ویروسی آنفلونزای پرندگان H9N2 در طی چرخش ویروسی در سال‌های متمادی در کشور ثابت باقی نمانده است.

واژه‌های کلیدی: آنفلوانزای پرندگان، پلی مراز ۱، H9N2، مطالعه شجره‌شناسی، ایران.

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان از مهمترین بیماریهای ویروسی پرندگان می‌باشد و ویروس آن در خانواده ارتومیکسوویریده قرار دارد. این خانواده دارای پنج جنس به نام‌های آنفلوانزای C, B, A، توگوتوویروس و آیزاویروس است که گاهی اصطلاحاً آن را آنفلوانزای D نیز می‌نامند(۵). ژنوم ویروس آنفلوانزا ده نوع پروتئین مختلف را رمزگذاری می‌نماید. هشت پروتئین (PB2, PA, *PB1*, HA, NA, M2, M1, NP) سازنده ساختمان ویریون و دو پروتئین (NS2, NS1) غیر ساختمانی می‌باشند (۱۳). ویروس‌های آنفلوانزای A به طور طبیعی گستره متنوعی از گونه‌های پرندگان، انسان و پستانداران دیگر شامل خوک و اسب را آلوده می‌کنند (۵). ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان به دو دسته کلی ویروس‌های بسیار بیماریزا ((HPAI) Highly Pathogentic Avian Influenza) و آنفلوانزای غیر حاد طیور ((Non-Highly Pathogenic Avian Influenza (NHPAI) تقسیم می‌شوند که دسته اخیر خود به چهار گروه بیماریزا، بیماریزای ملایم، کم بیماریزا و غیر بیماریزا تقسیم می‌گردد (۹). سه قطعه از بزرگترین قطعات ژنومی مولکول RNA پروتئین‌های *PB1*، PB2 و PA را کد می‌کنند (۵). دو پروتئین PB2 و PB1 بازی و پروتئین PA اسیدی می‌باشند. تعداد اسیدهای آمینه دو پروتئین PB2 و PB1 بسیار نزدیک به هم می‌باشند (۵). مقایسه ویروس‌های بازآرایی شده در مطالعات صورت گرفته برروی حیوانات نشان داده است که حدت ویروس آنفلوانزا ممکن است با ترکیب‌هایی متفاوت از ژن‌های پلی مراز و نوکلئوپروتئین افزایش یا کاهش یابد (۵،۱۳). در اواسط تیرماه سال ۱۳۷۷ این تحت تیپ خود را در مرغداری‌های اطراف تهران و قزوین بصورت بیماری ناشناخته نشان داد (۱۷). Vasfi-Marandi و Bozorgmehri در سال ۱۳۷۷ با ارسال ویروس جداسازی شده به آزمایشگاه وبریج انگلستان برای اولین بار آن را شناسایی و تحت عنوان A/Chicken/ZMT-101/98 نامگذاری نمودند (۱۷). تاکنون مطالعه‌ای برروی ژن *PB1* ویروس H9N2 در ایران با توجه به چرخش ویروس‌های مختلف در کشور، پاساژ فراوان ویروس در مزارع و همچنین استفاده از واکسیناسیون جهت کنترل بیماری جهت بررسی تغییرات احتمالی صورت نگرفته بود. هدف از این مطالعه بررسی شجره شناسی براساس ژن پلی مراز ۱ (*PB1*) ویروس آنفلوانزای H9N2 جدا شده از گله‌های گوشتی در کشور طی سال‌های ۱۳۷۷ تا ۱۳۹۰ می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه و جداسازی: در این مطالعه چهار نمونه ویروس آنفلوانزای

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۹۱-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: ghalyana@ut.ac.ir

H9N2 مورد بررسی قرار گرفتند. سه 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 تهیه نمونه سال ۱۳۹۰ تعدادی نمونه بافتی شامل نای، ریه و روده از گله‌های گوشتی مشکوک و تحت نظر و تایید 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 بوسیله آزمون‌های استاندارد تایید گردید (۳).

استخراج RNA: چهار نمونه ویروسی در این مرحله از کیت ستونی استخراج RNA (Bioneer, South Korea) مطابق روش ارائه شده بوسیله شرکت سازنده استفاده گردید. RNA استخراج شده در $-70^{o}C$ تا زمان استفاده ذخیره سازی گردید (۲۰).

واکنش نسخه برداری معکوس و آزمون زنجیره‌ای پلی مراز (RT-PCR): از کیت دو مرحله‌ای شرکت (Vivantis, Malaysia) جهت واکنش نسخه برداری معکوس و آزمون زنجیره‌ای پلی مراز (RT-PCR) استفاده شد. آغازگر اختصاصی uni-12 (5'AGC AAA AGC AGG 3') جهت واکنش نسخه برداری معکوس استفاده گردید. جهت بدست آوردن قطعه مورد نظر از یک جفت آغازگر استفاده گردید.

آغازگرهای مورد استفاده در واکنش دارای توالی‌های (TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA Bm-PA-1: و *PB1*-1262R: TRAACATGCCCATCATCAT) بودند. شرایط دمایی و زمانی ترمال سایکلر جهت انجام واکنش شامل مراحل ذیل بود: یک سیکل واسرشت اولیه $95^{o}C$ ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل (واسرشت اولیه $95^{o}C$ ۴۵ ثانیه، اتصال $55^{o}C$، ۳۵ ثانیه، تکثیر $72^{o}C$، ۷۰ ثانیه) و یک سیکل تکثیر نهایی $72^{o}C$، ۱۰ دقیقه (۷).

مطالعات بیوانفورماتیک: در این طرح جهت تعیین توالی، نمونه‌ها جهت خالص سازی، تعیین مقدار و توالی یابی به شرکت South Korea Bioneer، ارسال گردید. جهت ویرایش و بازسازی توالی‌های تعیین شده از نرم افزار MEGA5 استفاده و جهت تعیین توالی اسید آمینه‌ای مربوط به هر یک از سکانس‌های نوکلئوتیدی نیز از CLC Bio Main workbench (۵/۵) استفاده گردید. جهت مطالعه شجره شناسی و بررسی تکامل مولکولی نرم افزار MEGA5 با استفاده از مدل Neighbor-Joining با آزمون ریشه‌ای (Boot Strap) ۱۰۰۰ تکرار به کار گرفته شد. در مطالعه شجره شناسی از جدایه‌های مرجع، نمایندگان شاخه‌های مختلف ویروس (G1, G9, Y-280, Y439, SD-1, SD-2)، جدایه‌های کشورهای همسایه و همچنین دو جدایه ایرانی H9N2 (۳۳ جدایه) پس از استخراج از بانک ژن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۲).

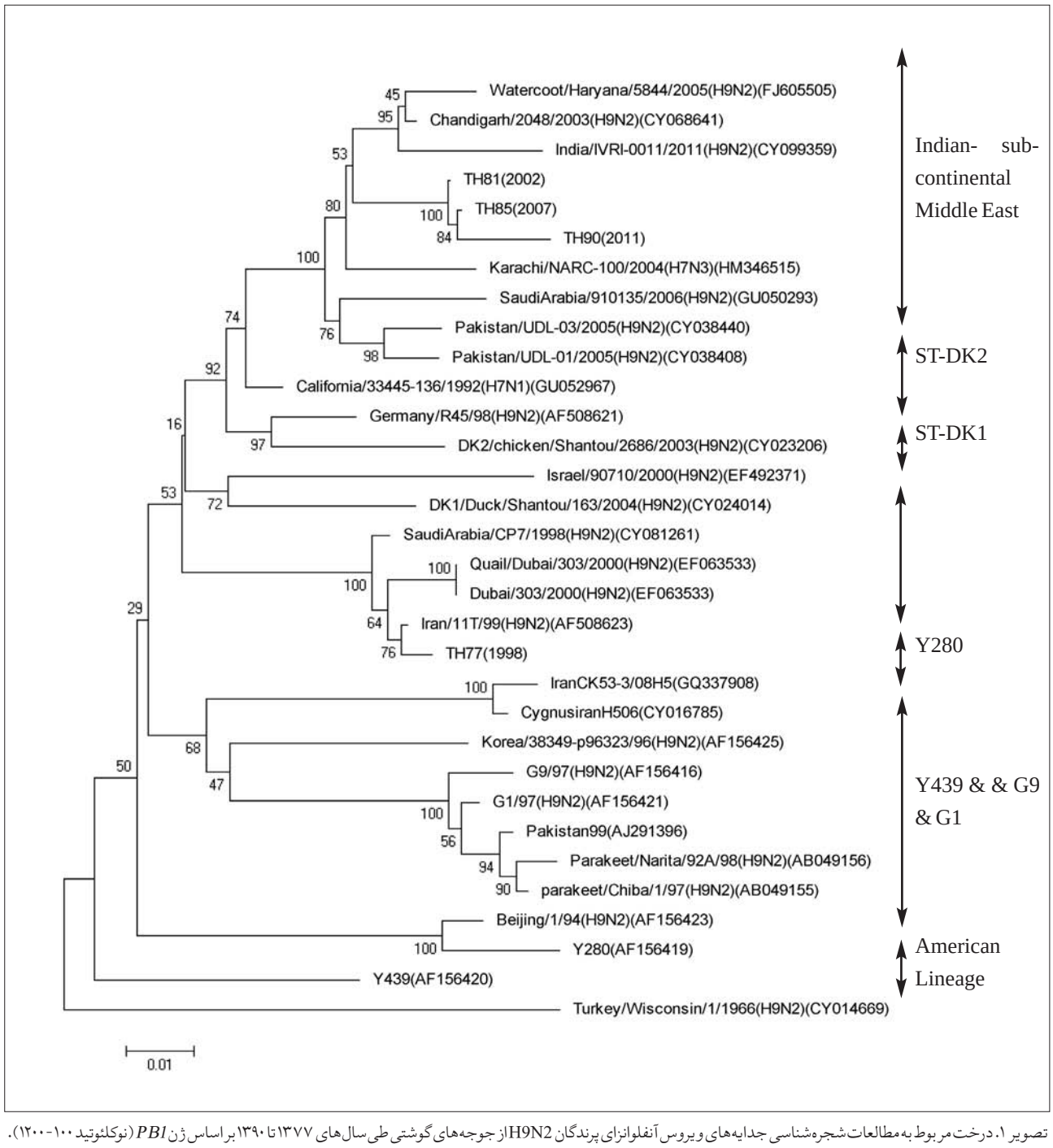
ثبت ژن: توالی‌های بدست آمده در پایگاه جهانی GenBank ثبت گردید و شماره‌های دسترسی JQ314408.1 تا JQ314411.1 به آن اختصاص یافت.

نتایج

پس از ویرایش توالی‌ها، از نوکلئوتید ۱۰۰ تا ۱۲۰۰ در مطالعات مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه ژن *PB1* جدایه‌های ایران با ویروس پروتوتایپ تحت تیپ H9N2 در هیچکدام از چهار جدایه این تحقیق، در ناحیه موردنظر اضافه شدن (Insertion) یا حذف (Deletion) مشاهده نمی‌شود. مطالعات شجره شناسی ژن *PB1* جدایه‌های کشور با ۳۳ جدایه دیگر در دنیا بر اساس مدل NJ نشان داد که جدایه‌های آنفلوانزای پرندگان H9N2 ایران در دو گروه متفاوت با توجه به سال جداسازی قرار می‌گیرند (تصویر ۱). درصد شباهت ژن *PB1* ویروس‌های مورد مطالعه با گروه (۸۹-۹۱٪ G1) و (۸۶-۹۰٪ G9) و (۸۹-۹۰٪) Y-439 پایین بوده است. جدایه‌های اخیر کشور (TH85, TH81, TH90) درصد بالایی از تشابه را با جدایه‌های (Pakistan/UDL-01/2005 H9N2) (۹۶٪) و (H7N3 Karachi/NARC-100/2004) (۹۷٪) نشان می‌دهند. در این مطالعه تغییرات موقعیت‌های مهم اسید آمینه‌ای (۳۹،۵۴،۱۵۷،۱۸۷،۲۴۷ بر اساس نظام شماره گذاری اسید آمینه‌ای مرجع تحت تیپ H3) که در اختصاصیت میزبان نقش و در محدوده توالی یابی این مطالعه قرار داشته، مورد بررسی قرار گرفتند.

بحث

با توجه به شیوع آنفلوانزای پرندگان H9N2 در ایران در سال ۱۳۷۷ و گذشت ۱۳ سال از شیوع بیماری در کشور، مطالعه‌ای برروی ژن پلی مراز ۱ (*PB1*) که از عوامل مهم در بیماریزایی ویروس است، طراحی گردید. در مطالعه‌ای که توسط Fereydouni در سال ۱۳۸۳ برروی پرندگان آبزی مهاجر ایران صورت گرفت علاوه بر ویروس تحت تیپ H9N2، سایر تحت تیپ‌های H8N4, H7N3, H3N8 و H10N7 نیز جدا سازی گردید (۴). همچنین نخستین بار در کشور ژنوم ویروس H5N1 در بهمن ماه ۱۳۸۴ که سبب مرگ ۱۳۵ قو در بندر انزلی شد، مورد تائید قرار گرفت. در دی ماه ۱۳۸۶ نیز دومین گزارش رسمی از تشخیص H5N1 توسط سازمان دامپزشکی کشور (روستای درزی نقیب در بابلسر) اعلام گشت (۱۸). با توجه به چرخش تحت تیپ‌های مختلف ویروس آنفلوانزا در ایران، در این طرح چهار جدایه ویروسی در طول سال‌های شیوع این بیماری از مزارع گوشتی کشور (استان‌های تهران و قزوین) جدا گردیده بود، انتخاب و قسمتی از ژن *PB1* (بطول ۱۰۰۰ نوکلئوتید) توالی یابی گردید و مطالعه شجره شناسی برروی آنها انجام گرفت. دودمان‌های تحت تیپ H9N2 به دو دودمان آمریکای شمالی و آسیایی-اروپایی تقسیم می‌شوند و دودمان اخیر نیز خود به سه زیر شاخه G1، G9 و Y439 تقسیم بندی می‌شود. اگر چه زیر شاخه‌ای مختلفی از اردک (ST-DK1 و ST-DK2) و جدایه‌های جنوب شرقی نیز اخیرا در تقسیم بندی اضافه گردیده‌اند (۲). در مطالعه شجره شناسی حاضر جدایه‌های ایران در با توجه به زمان‌های جدا سازی در دو



تصویر ۱. درخت مربوط به مطالعات شجره‌شناسی جدایه‌های ویروس آنفلوانزای پرندگان H9N2 از جوجه‌های گوشتی طی سال‌های ۱۳۷۷ تا ۱۳۹۰ بر اساس ژن *PB1* (نوکلئوتید ۱۰۰-۱۲۰۰). درخت فوق با نرم افزار MEGA5 با روش Neighbor-Joining و آزمون ریشه‌ای ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شده است. جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه با دایره توپر مشکی مشخص گردیده است.

گروه مختلف قرار گرفتند (تصویر ۱). گروه اول مربوط به جداسازی سال‌های ۱۹۹۸ (TH77 و 11T) بوده که جدایه‌های H9 کشور امارت (۲۰۰۰) و جدایه‌های H7 کشور پاکستان در سال ۱۹۹۵ واقع شده‌اند. این جدایه دارای یک گره مشترک با نماینده گروه ST-DK1 بوده که معرف جدایه‌های H9 با منشا پرندگان آبزی می‌باشد. گروه دوم ویروس‌های H9N2 در سال ۲۰۰۲ در ایران براساس ژن *PB1* در کنار جدایه‌های کشور پاکستان، هند و جدایه‌های جدید کشور عربستان قرار می‌گیرند. ما این گروه را بر اساس آخرین مطالعه‌های انجام شده، با نام Indian sub-continental and Middle-East مشخص کردیم (تصویر ۱). براساس مطالعات قبلی جدایه‌های H9N2 ایران بر اساس ژن‌های سطحی (هماگلوتنین و نورآمنیداز) و ماتریکس در گروه G1 قرار گرفته‌اند (۶) و (اطلاعات منتشر نشده). محققین مختلف جدایه‌ی H9N2 جدا شده از پاراکیت را منشا

ژنتیکی جدایه‌های ایران می‌دانستند (۱۰). همچنین براساس ژن غیر ساختاری (NS)، جدایه‌های H9N2 ایران، شاخه‌ای ناشناخته همراه با گروه H7 ایتالیایی تشکیل داده بودند(۱۵). Pazani و همکاران در سال ۲۰۱۱ با مطالعه ژن PB2 جدایه ویروس آنفلوانزا که از جوجه های تجاری در استان تهران طی سال های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۷ جدا شده بود، اعلام نمود که همه جدایه‌ها در دودمان اروپائی - آسیایی قرار می‌گیرند که می توان آن را به دو گروه از سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۴ و سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۸ تقسیم کرد(۱۹). با توجه به حضور H7 در کشور پاکستان در سال‌های ۱۹۹۴-۱۹۹۵ در قبل از همه‌گیری ایران در سال ۱۹۹۸، نقش ویروس بازآرایی شده (اخذ ژن *PB1* از منشا غیر از گروه G1) در آغاز همه گیری در کشور محتمل بنظر می‌رسد. مطالعات متفاوت شجره شناسی بر اساس ژن *PB1* برروی ویروس آنفلوانزای پرندگان H9N2 انجام گرفته است. جدایه‌های H9N2 از گله‌های تخم گذار در کشور کره جنوبی براساس ژن *PB1* در گروه شبه کره‌ای قرار گرفتند (۱۱). Tosh و همکاران در سال ۲۰۰۸ با مطالعه برروی جدایه‌های H9N2 در هند اعلام داشتند که این جدایه‌ها در گروهی جداگانه که تاکنون گزارش نگردیده، قرار می‌گیرند واحتمال باز آرایی جدایه‌ها را اعلام نمودند (۲۲). که نتایج این مطالعه نیز بیانگر حضور شاخه‌ای جدید براساس ژن *PB1* در کشور، منطقه خاورمیانه و هند است. در تحقیقی مشابه توسط Amir و همکاران در سال ۲۰۰۰ چنین نتیجه‌گیری شده است که جدایه‌های امارات متحده عربی بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۳ همراه با جدایه‌های ایران در گروه G1 قرار دارند (۱) که نتایج این تحقیق با آن متفاوت است بطوری که مطالعات Iqbal و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دهنده این است که جدایه‌های اولیه ایران (11T و TH77) در گروه G1 قرار نگرفته‌اند و نتیجه گروه تحقیقاتی اماراتی را نقض می‌نماید(۸) . در مورد موقعیت‌های مهم اسید آمینه‌ای که در این مطالعه تعیین توالی شده، تغییرات جهش یافته جالبی مشاهده گردیده است. Li و همکاران در سال ۲۰۰۵ با بررسی جدایه‌ای H9N2 که قابلیت تکثیر در موش را داشتند دریافتند که اسید آمینه شماره ۱۵۷ در جدایه‌هایی که قادر به تکثیر در موش نبودند در این محل ایزولوسین (I) بوده و در مقابل در جدایه‌هایی با قابلیت تکثیر در میزبان موش به اسید آمینه‌های ترئونین/آلانین (T/A) تبدیل گردیده بود (۱۴). در این بررسی هم این اسید آمینه در کل جدایه‌ها از نوع A بوده است. در مطالعه Wu و همکاران در سال ۲۰۰۹ برروی جدایه‌هایی از H9N2 که به موش عادت یافته بودند (آلانین به ترئونین در شماره ۳۹)، (پرولین به لیزین در شماره ۱۸۷) و (گلوتامین به آرژنین در شماره ۲۴۷) تغییر یافته بودند (۲۱). در اسید آمینه شماره ۳۹ (در دو جدایه مورد مطالعه TH81, TH85) نیز این تغییر مشهود بود. اسید آمینه شماره ۵۴ یکی دیگر از اسیدهای آمینه‌ای است که در مطالعه Naffakh و همکاران در سال ۲۰۰۰ در زمینه مقایسه پروتئین پلی مراز آنفلوانزای پرندگان و انسانی مورد توجه قرار گرفت. که در جدایه‌های پرندگان در این موقعیت اسید آمینه لیزین موجود می‌باشد (۱۶) در جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق در این موقعیت اسید آمینه آرژنین قرار دارد که در جدایه‌های آنفلوانزای پرندگان در انسان و جدایه‌های تیپ آ (A) انسانی مشاهده گردیده است.

بررسی‌ها برروی جدایه‌های آنفلوانزای پرندگان H9N2 در ایران نشان می‌دهد که از لحاظ مولکولی، جدایه‌های کشور در سطح ژنومی دارای تغییراتی می‌باشند که تمایل به میزبان پستاندار و انسان داشته و این تهدید را متصور می‌کند که می توانند بعنوان یک ویروس مشترک خود را مطرح نماید. بنابراین پایش منظم ویروس‌های H9N2 در کشور با توجه به چرخش آن در مزارع صنعتی و بازار پرندگان زنده باید مورد توجه قرار گیرد و این امر با توجه به حضور تحت تیپ‌های متفاوت ذکر شده بیش از حد حیاتی می‌گردد. همچنین با توجه به مشترک شدن سویه‌های در حال چرخش بین سه کشور پاکستان، هند و ایران لازم می‌باشد که توجه بیشتری برروی موارد قرنطینه‌ای مرزی صورت پذیرد تا از احتمال ورود تحت تیپ جدید مانند H7 به کشور جلوگیری شود.

تشکر وقدردانی

بدینوسیله از زحمات کلیه کارشناسان بخش میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (مهندس غفاری، مهندس اشرافی و آقای اسدی) جهت همکاری در این مطالعه تحقیقاتی تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. 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.
2. Banks, J.S.E., Harris, P.A, Alexander, D.J. (2000) Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. Avian Pathol. 29: 353-360.
3. Capua, I., Alexander, D.J. (2009) Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Guide, Springer-Verlag. Milan, Italy.
4. Fereidouni, S.R., Aghakhan, M., Werner, O., Starick, E., Bozorghmehrifard, M.H. (2005) Isolation and identification of avian influenza viruses from migratory birds in Iran. Vet. Rec. 157: 526.
5. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (2007) Fields virology, (5th ed.). Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.

6. Ghalyanchi Langeroudi, A., Karimi, V., Kheiri, M.T., Fard, M.H.B., Mahboudi, F., Barin, A., et al. (2008) Nucleotide and amino acid sequence analysis of hemagglutinin protein in cleavage site region of H9N2 isolated from broilers in Tehran province during 1998-2007. J. Anim. Vet. Adv. 7: 529-534.
7. Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R. (2001) Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch. Virol. 146: 2275-2289.
8. Iqbal, M., Yaqub, T., Reddy, K., McCauley, 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: 5788.
9. Jordan, F.T.W., Pattison, M. (2001) Poultry Diseases (5^{th} ed.). Elsevier Health Sciences Press. Philadelphia, USA.
10. 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. Iranian J. Biol. 8:167-172.
11. Kim, J.A., Cho, S.H., Kim, H.S., Seo, S.H. (2006) H9N2 influenza viruses isolated from poultry in Korean live bird markets continuously evolve and cause the severe clinical signs in layers. Vet. Microbiol. 118: 169-176.
12. Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K. (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief. Bioinform. 9: 299-306.
13. Lee, C.W., Saif, Y.M. (2009) Avian influenza virus. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 32: 301-310.
14. Li, C., Yu, K., Tian, G., Yu, D., Liu, L., Jing, B., et al. (2005) Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. Virology. 340: 70-83.
15. Majidzadeh, K., 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.
16. Naffakh, N., Massin, P., Escriou, N., Crescenzo-Chaigne, B., van der Werf, S. (2000) Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. J. Gen. Virol. 81: 1283-1291.
17. Nili, H., Asasi, K. (2003) Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. Avian Dis. 47: 828-831.
18. OIE (2006) FAO/OIE/WHO Consultation on Avian Influenza and Human Health: Risk Reduction Measures in Producing, Marketing, and Living with Animals in Asia: Meeting Report. OIE publication Center. Paris, France. p.12.
19. Pazani, J., Karimi, V., Bozorgmehri Fard, M., Ghalyanchi Langeroudi, A., Barin, A. (2011) Phylogenetic analysis of PB2 gene of H9N2 subtype of avian influenza viruses isolated from commercial chickens in Tehran province of Iran during 1998-2001. Iran. J. Vet. Res. 12: 324-331.
20. Sambrook, J., Russell, D.W. (2006) The Condensed Protocols from Molecular Cloning: a Laboratory Manual (3^{rd} ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. NewYork, USA.
21. Tosh, C., Nagarajan, S., Behera, P., Rajukumar, K., Purohit, K., Kamal, R.P., et al. (2008) Genetic analysis of H9N2 avian influenza viruses isolated from India. Arch. Virol. 153: 1433-1439.
22. Wu, R., Zhang, H., Yang, K., Liang, W., Xiong, Z., Liu, Z., et al. (2009) Multiple amino acid substitutions are involved in the adaptation of H9N2 avian influenza virus to mice. Vet. Microbiol. 138:85-91.

Phylogenetic study on Iranian Avian influenza H9N2 isolates

Ghalyanchi Langeroudi, A.[1*], Karimi, V.[2], Hashemzadeh, M.[3], Madadgar, O.[1], Naiery Fasaei, B.[1], Shojaee Estabragh, A.[4]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

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

[3]*Department of Research & Production of Veterinary and Poultry Vaccines, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj-Iran.*

[4]*Department of Quality Control, Pasteur Institute of Iran, Karaj- Iran.*

(Received 16 June 2012 , Accepted 4 September 2012)

Abstract:

BACKGROUND: Avian Influenza (AI) H9N2 subtype was first reported to have infected turkeys in the United States in 1966 and has been enzootic in Eurasia. In Iran, the H9N2 virus was first isolated from broiler chickens in 1998 in Ghazvin Province and it is the most prevalent subtype of influenza virus in poultry industry in Iran at the present time. The PB1 protein of influenza A viruses is an important host range and virus virulence determinant. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was phylogenetic analysis of the PB1 gene of H9N2 AI virus isolated from broiler flocks in Iran during the period 1998-2011. **METHODS:** In this study, PB1 genes of 4 H9N2 isolates isolated from commercial chicken farms of Iran during the period 1998 to 2011 were partially amplified, sequenced and their amino acid sequences were assigned. The sequences were analyzed and phylogenetic study was done by comparing them to some deposited sequences of PB1 genes in GenBank. **RESULTS:** According to phylogenetic study on PB1 gene, two different groups can be distinguished among these Iranian H9N2 isolates. The current H9N2 circulating viruses in Iran are located in a new cluster of Middle East and India. The H9N2 isolates that are based on analysis of amino acid sequences of Iranian H9N2 isolates have some substitutions that are found in human and mouse adapted isolates. It seems that H9N2 isolates may show a trend to infect mammalian hosts. **CONCLUSIONS:** The available evidence indicates that PB1 genes of H9N2 influenza virus circulating in Iran have not been well conserved during the past years.

Key words: avian influenza, H9N2, PB1, phylogenetic study, Iran.

Figures Legends and Table Captions

Figure 1. The phylogenetic tree of H9N2 avian influenza virus isolates of broiler chickens during the period 1998 to 2012 based on genes, PB1 (nucleotides 100-1200). 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.

***Corresponding author's email: ghalyana@ut.ac.ir, Tel: 021-61117191, Fax: 021-66933222**