

## تعیین هویت مولکولی و مطالعه شجره شناسی بر اساس ژن ماتریکس (M) ویروس آنفلوآنزای پرندگان (H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>) در ایران بین سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۷۷

شهرام کریمی<sup>۱</sup> و وحید کریمی<sup>۲</sup> آرش قلیان چی لنگرودی<sup>۳\*</sup> امید مددگار<sup>۲</sup> حمیده نجفی<sup>۳</sup> حسین مقصودلو<sup>۴</sup>

(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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> بصورت پانزوتیک رخ داده و از سال ۱۳۷۷ موارد متعددی از بیماری آنفلوآنزای پرندگان (تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>) در صنعت طیور ایران گزارش شده است و از آن زمان واکسن کشته H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 سکانس 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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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، H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>

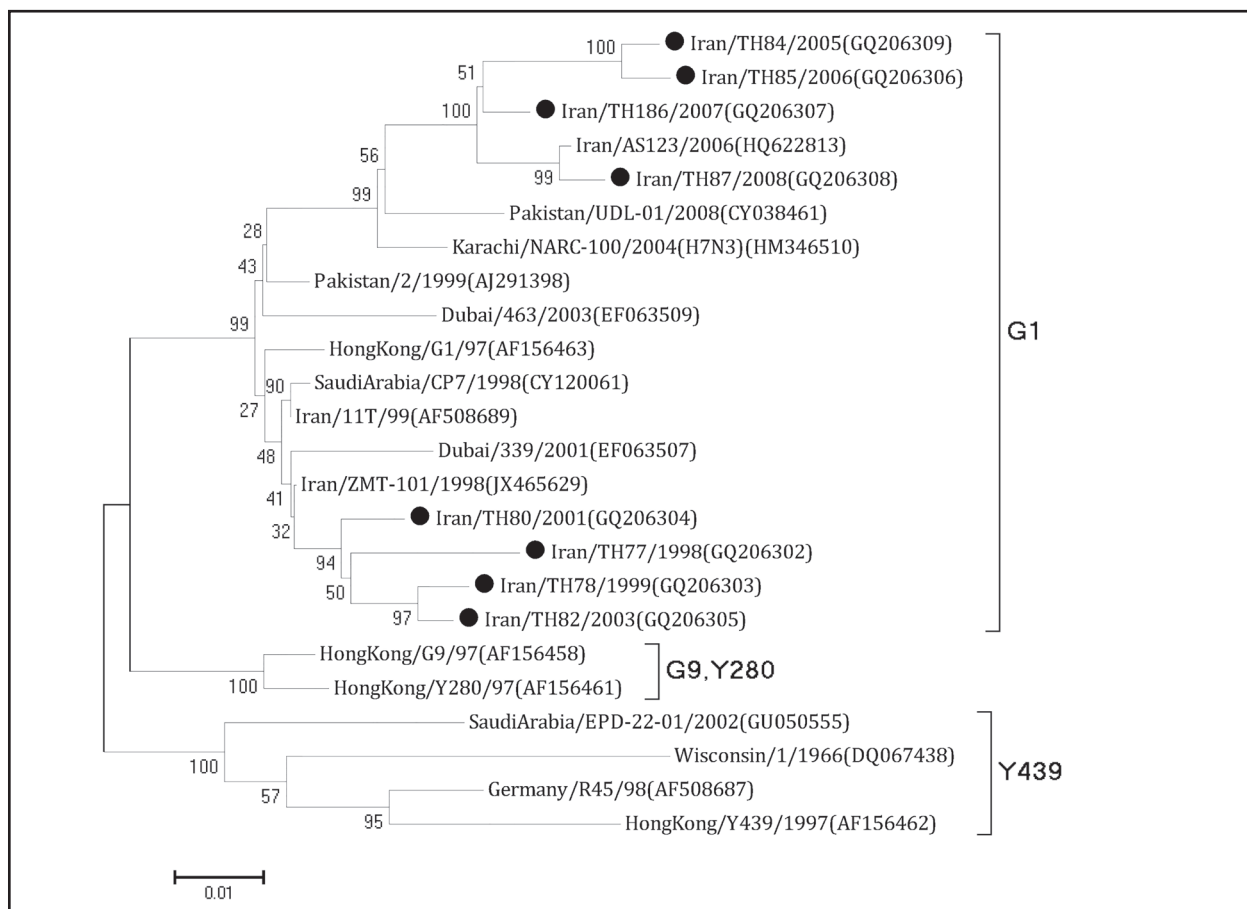
### مقدمه

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 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> بود. تحت تیپ جدا شده از ایران در آزمایش‌های ویروس شناسی، نه چندان بیماریزا شناخته شد (۱۲، ۱۰). دو دودمان مجزای ویروس‌های آنفلوآنزای H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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







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.

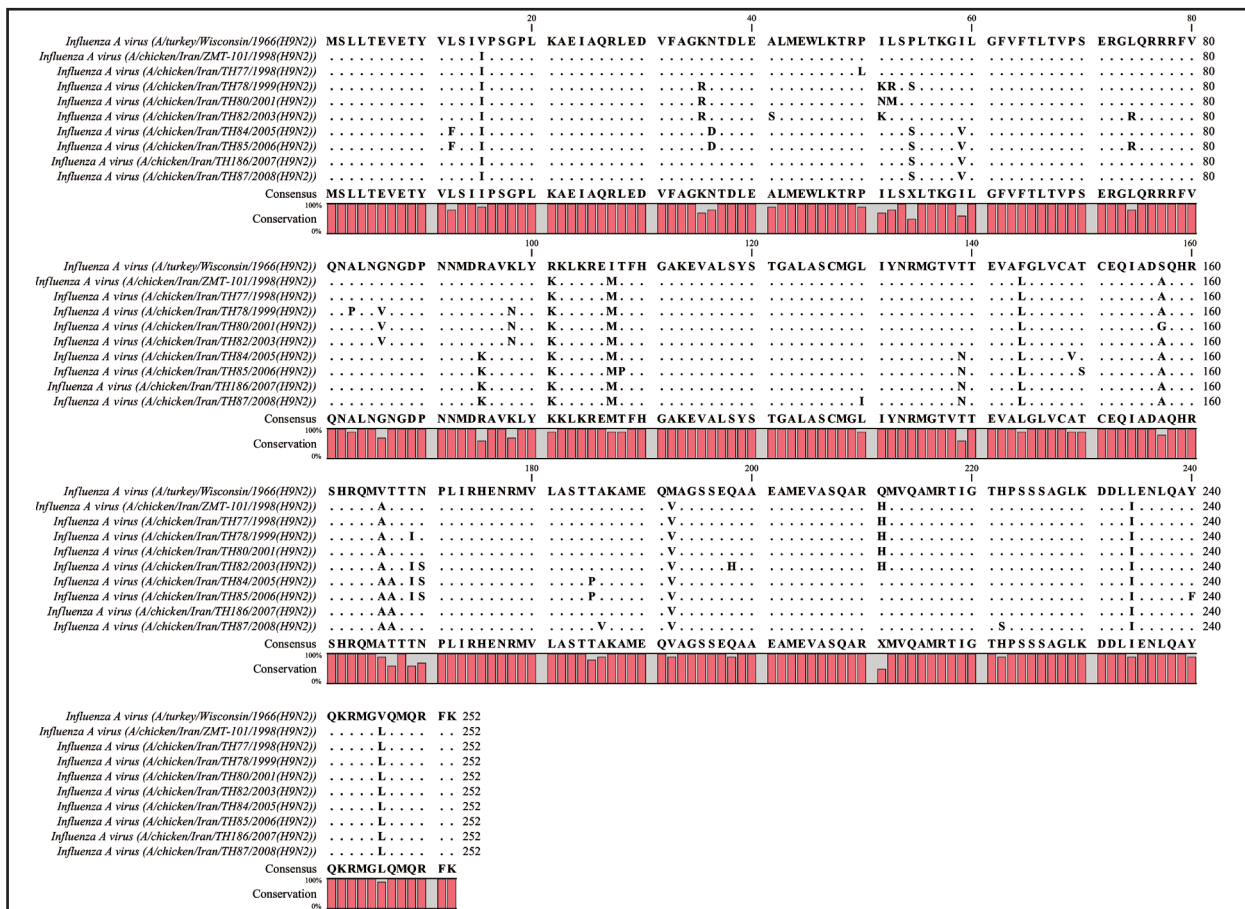
اردک (ST-DK1 و ST-DK2) و جدایه‌های جنوب شرقی نیز اخیراً در تقسیم بندی اضافه گردیده است (۵). ویروس‌های جدا شده از ایران بر اساس ژن ماتریکس (M) در همان تحت دودمان G1 قرار می‌گیرند و در طول این ۱۰ سال هیچ گونه تغییر دودمانی مشاهده نشده است و دودمان‌های آمریکایی و خوکی‌جانی می‌گیرند. جدایه‌های ایران در یک 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 هم‌گلوپتینین (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 HVN3 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.۳۴F و L۲۶F، V۷۷YA، A۳۰T، S۳۱N، G۳۴E. 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 (TH۸۴، TH۸۵، TH۱۸۶) 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)۱۵ و (V)۱۱۵ و (V)۱۲۱ و (I)۱۳۷ (در طول چند سال ثابت بوده و تغییری نکرده بودند. در موقعیت این نوع اسید آمینه‌های (G)۲۰ و (S)۲۰ و (F)۵۵ و (Y)۵۷ و (Q)۷۸ و (V)۸۶) در پروتئین M2 به غیر از اسید آمینه شماره ۱۱ (T به S در جدایه TH۸۵) و (از V به F در جدایه‌های TH۸۴، TH۸۵، TH۱۸۶، TH۸۷) 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، در پرندگان آبری هوکایدو ژاپن از ۲۱۸ مورد ویروس آنفلوآنزا از ۲۸ تحت تیپ مختلف (H۱-NA(N۱) (H۱۳-HA) با تجزیه و تحلیل شجره‌شناسی ژن ماتریکس (M) در ۱۵۱ مورد ویروس آنفلوآنزا، ۶۷ جدایه از تحت تیپ H۱۰ H۱۸ 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 A۲۷۷/۱۰/۸۸-Ck/IR/EBGV دارای موتاسیون A۲۷۷ می‌باشد که بیانگر مقاومت این ویروس نسبت به این داروها می‌باشد که الگویی متفاوت از جهش‌های مقاومت با امانتادین (S۳۱N) 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)	.....L	.....G.R.	.....V.	.....	40
Iran/TH77/1998(ACR56258)	.....L	.....G.R.	.....V.	.....	40
Iran/TH78/1999(ACR56260)	.....L	.....G.R.	.....V.	.....	40
Iran/TH80/2001(ACR56262)	.....L	.....G.R.	.....V.	.....	40
Iran/TH82/2003(ACR56264)	.....L	.....G.R.	.....V.	.....	40
Iran/TH84/2005(ACR56272)	.....L	.....G.R.	.....F.	NV.....	40
Iran/TH85/2006(ACR56266)	.....L	S.....G.R.	.....F.	NV.....	40
Iran/TH186/2007(ACR56268)	.....L	.....G.R.	.....F.	NV.....	40
Iran/TH87/2008(ACR56270)	.....L	.....G.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. (2<sup>th</sup> 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.<sup>1</sup>, Karimi, V.<sup>2</sup>, Ghalyanchi Langeroudi, A.<sup>3\*</sup>, Madadgar, O.<sup>3</sup>, Najafi, H.<sup>3</sup>, Maghsoudlo, H.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

<sup>2</sup>Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

<sup>4</sup>Iran 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.

