

شناسایی ژن نورامینیداز ویروس آنفلونزای پرندگان (H9N2) جدا شده از شیوع اخیر بیماری در ایران

سارا صمدی^۱ (M.Sc)، مهدی کیانی زاده^۲ (Ph.D)، رضا طرقی^۳ (Ph.D)، سید داوود موسوی نسب^۳ (M.Sc)، زهرا گوهری^۲ (M.Sc)، امیرمحمد حسین نیا دواتگر^۴ (M.Sc)، سمیه دری اردبیلی^۵ (M.Sc)، نایعلی احمدی^۶ (Ph.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
۲- موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه شمال شرق، مشهد، ایران
۳- گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۴- دیارتمان کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۵- دانشگاه پیام نور، واحد مشهد، مشهد، ایران
۶- مرکز تحقیقات پروتئومیکس، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: ویروس آنفلونزا باعث بروز بیماری های با پاتوژنیسیته متفاوت در میزبان ها می شود. ویروس های آنفلونزای A بر اساس گلیکوپروتئین های نورامینیداز و هم‌گلوکتینین به تحت تیپ های مختلفی تقسیم می شوند. ویروس آنفلونزای پرندگان به طور معمول باعث بیماری در انسان نمی شود اما عفونت های اسبورا دیک آن در انسان گزارش شده است. هدف این مطالعه، شناسایی و تعیین توالی ژن نورامینیداز ویروس آنفلونزای H9N2 جدا شده از اپیدمی اخیر بیماری در ایران، و مقایسه این ایزوله ها با سویه های سایر کشورها بود.

مواد و روش ها: ایزوله های ویروسی بر روی تخم مرغ های جنین دار پاساژ داده شد و RNA آن ها توسط کیت تجاری RNX استخراج گردید. تکثیر ژن نورامینیداز با روش RT-PCR انجام شد. محصول پس از الکتروفورز و خالص سازی، سکانس گردید. یافته ها: توالی های نوکلئوتیدی ژن نورامینیداز شش سویه ویروس آنفلونزای H9N2 جدا شده از نواحی مختلف ایران شناسایی و در پایگاه داده GeneBank به ثبت رسید. آنالیز مقایسه ای این توالی ها با توالی نمونه های فرانس انجام شد. هیچ نوع جهشی در ناحیه سیتوپلاسمی مشاهده نشد، اما چهار جهش در بخش عبوری از غشا اتفاق افتاده است. که دو جهش آن از نوع خاموش بوده و دو جهش دیگر به جایگزینی اسید آمینه آب گریز با اسید آمینه آب گریز دیگر منجر شده است. نتیجه گیری: آنالیز توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن نورامینیداز ویروس آنفلونزای H9N2 حاصل از ایزوله های ایران، دارای شباهت زیادی به سویه های گزارش شده از کشورهای همسایه همانند پاکستان و عربستان بودند. به نظر می رسد آن ها دارای منشاء و تبار یکسان هستند.

واژه های کلیدی: آنفلونزای پرندگان، H9N2، نورامینیداز، آنالیز نوکلئوتید، ایران

مقدمه

ویروس آنفلونزا متعلق به خانواده ارتومیکسو ویروس ها می باشد و بر اساس تفاوت های آنتی ژنی موجود در پروتئین های ماتریکس (M1، M2) و نوکلئوپروتئین (NP) به

انواع A، B و C تقسیم بندی می شود. ویروس های آنفلونزای A مطابق طبیعت آنتی ژنی گلیکوپروتئین های نورامینیداز (N) و هم‌گلوکتینین (H) به تحت تیپ های مختلفی تقسیم می شوند [۱-۳]. در ارتباط با آنتی ژن های اصلی تحت تیپ تاکنون ۱۸

تعیین طیف میزبان، میزان ویروانس ویروسی و نیز تجمع پروتئین‌های ویروسی نیز نقش دارد [۱۱-۱۳]. هدف مطالعه حاضر، بررسی و آنالیز ژن نورامینیداز ویروس آنفلونزای H9N2 جدا شده از طیور طی اپیدمی‌های اخیر بیماری در ایران و همچنین مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی این ایزوله‌ها با برخی سویه‌های سایر کشورهای جهان بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه. نمونه‌های ویروسی مورد نظر شامل ایزوله‌های ویروسی IR430/98 (اصفهان) IR738/99 (قزوین) IR496/99 (آذربایجان شرقی) IR327/00 (گیلان) IR261/01 (مازندران) و IR675/01 (خراسان) می‌باشند. این تعداد ویروس از گونه‌های متفاوت طیور و از نقاط مختلف کشور در موسسه سرم‌سازی رازی گردآوری شده‌اند.

پاساژ ویروس و استخراج ژنوم. به منظور پاساژ هر ایزوله ویروسی از ۲-۳ عدد تخم مرغ جنین دار ۹ روزه عاری از عوامل بیماری‌زا (Pathogen free) استفاده گردید. ویروس‌ها با استفاده از نرمال سالین یا فسفات بافر سالین (PBS) به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده و ۲ میلی‌لیتر محلول حاوی ویروس به تخم‌مرغ‌های جنین دار عاری از عوامل بیماری‌زا تزریق گردید. سپس تخم‌مرغ‌ها درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت تخم‌مرغ واجد جنین‌های تلف شده حذف و بقیه تخم‌مرغ‌ها به درون انکوباتور انتقال یافت. بعد از گذشت ۴۸ ساعت مایع آلتوتویک حاوی ویروس از تخم‌مرغ‌ها برداشته شد و برای استخراج ژنوم ویروس از کیت تجاری RNX (CinnaGEN.IRAN) بر اساس دستورالعمل سازنده کیت استفاده گردید.

طراحی پرایمر اختصاصی. جهت تکثیر ناحیه ژن نورامینیداز، طراحی پرایمر با استفاده از هم‌ردیفی سکانس ایزوله‌های رفرنس‌های ثبت شده در GenBank انجام گردید. برای افزایش حساسیت و ویژگی فرایند تکثیر از روش Nested-PCR استفاده گردید که برای PCR اول از پرایمرهای N550F

نوع هماگلوتینین و ۱۱ نوع نورامینیداز متمایز نشان داده شده است [۱،۴]. نسبت گلیکوپروتئین‌های هماگلوتینین به نورامینیداز در ویروس آنفلونزا از ۱ تا ۴ متغیر می‌باشد [۵]. این ویروس‌های پوشش‌دار، دارای قطر ۸۰ تا ۱۲۰ نانومتر و با اشکال کروی، رشته‌ای، یا پلی‌مورفیک می‌باشند. ویروس‌های رشته‌ای قطری مشابه با انواع کروی دارند، ولی به میزان زیادی طویل شده‌اند. فاکتورهای ژنتیکی قادر است بر شکل ویروس تأثیر گذارند. مطالعات نشان می‌دهد که ژن‌های ماتریکس، هماگلوتینین و نورامینیداز در تعیین شکل ویروس نقش دارند [۱،۲].

آنفلونزا ویروس هر ساله بین انسان‌ها شیوع یافته و باعث سرفه و عطسه، سردرد، تب شدید، دردهای عفونی و موضعی در بدن بشود ولی معمولاً تلفات قابل ملاحظه‌ای ندارد. اولین درگیری با تلفات زیاد توسط این ویروس مربوط به سال ۱۹۱۸ میلادی است که در اثر آن به طور تقریبی ۲۰ میلیون نفر در جهان جان باختند [۵]. تغییرپذیری توالی ژنومی ویروس از ویژگی‌های ژنتیکی بارز ویروس آنفلونزا است به طوری که یک ویروس نسبتاً ضعیف و بی‌ضرر می‌تواند به ویروسی تبدیل شود که در همان نوع حیوان و یا حیوانات دیگر عوارض شدیدی ایجاد نماید [۶]. عواملی از قبیل تفاوت در شاخه‌های ویروانس ویروس، عفونت‌های میکروبی رایج، استرس‌های محیطی، سن و جنس پرنده می‌تواند در بروز نوع بیماری ایجاد شده دخیل باشد. بیماری آنفلونزا در سال ۱۸۷۸ در ایتالیا توسط پرونستیتو به عنوان یک بیماری جدید معرفی شد [۷،۸،۹]. ژنوم ویروس آنفلونزا قطعه قطعه می‌باشد و قطعه شش این ویروس، وظیفه سنتز پروتئین نورامینیداز را بر عهده دارد. این پروتئین به هم‌راه گلیکوپروتئین هماگلوتینین، گلیکوپروتئین‌های غشایی و نیز دومین‌های آنتی‌ژنی اصلی سطح ویروس را تشکیل می‌دهد [۱۰]. گلیکوپروتئین نورامینیداز در رهاسازی ویروس از سطح سلول در هنگام خروج نقش داشته و باعث تسهیل انتشار ویروس می‌گردد. توالی سکانس ژن نورامینیداز مرتب در حال تغییر بوده است. در مطالعات مختلف گزارش شده است که این پروتئین در

سیکل حرارتی واکنش PCR به صورت ۴ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در پایان ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. برای انجام Nested PCR دو میکرولیتر از محصول مرحله اول با حفظ شرایط و با همان برنامه ترموسیکلر استفاده گردید.

الکتروفورز. محصول حاصل از PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد دارای بافر TBEX5/0 الکتروفورز گردید و سپس توسط محلول اتیدیوم پروماید نمایان گردید. برای تعیین اندازه‌های باند محصول از bp (Fermentas) DNA Ladder ۱۰۰ استفاده گردید.

تهیه محصول PCR و خالص‌سازی آن جهت توالی‌یابی. محصول PCR در حجم ۱۰۰ μ l تهیه شد و پس از بررسی و تایید با الکتروفورز، خالص‌سازی مستقیم DNA از محصول PCR به کمک کیت High Pure PCR Product Purification (شرکت Roche آلمان) انجام شد و جهت توالی‌یابی به کشور آلمان ارسال گردید. نتایج خواندن توالی‌ها و کروم‌گرام‌های هر توالی با کمک نرم‌افزار Chromas خوانده شد. آنالیز و مقایسه توالی‌های حاصل نیز توسط نرم‌افزار BioEdit (version 5.0.9) صورت گرفت.

نتایج

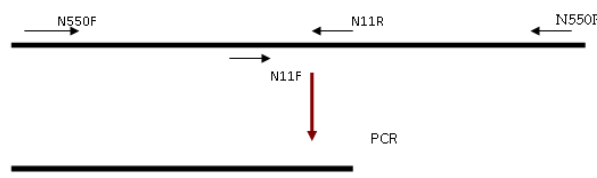
پاساژ ویروس و تست HI (Heamagglutination Inhibition): پس از گذشت ۲۴ ساعت، پاساژ ویروس‌ها در برخی از جنین‌های موجود در تخم‌مرغ‌ها ضایعات خون‌ریزی‌دهنده بسیار زیادی مشاهده گردید که سبب از بین رفتن جنین‌ها و حذف آن‌ها شده بود. پس از طی ۴۸ ساعت و برداشت مایع آلتوتوئیک از تخم‌مرغ‌ها، نتیجه تست هم‌آگلوتیناسیون مثبت بود و تمامی سویه‌های ویروس قادر به آگلوتینه کردن گلبول‌های خون جوجه بودند.

و N550R که به ترتیب پرایمر Sense و Antisense بوده و ناحیه به طول ۸۰۰ جفت باز را تکثیر می‌نماید. در ادامه از پرایمرهای داخلی N11F پرایمر sense و N11R پرایمر (Antisense) به منظور تکثیر محصول حاصل از PCR اول استفاده گردید. محصول حاصل از واکنش تکثیری دوم ۷۰۰ جفت باز طول دارد (جدول ۱). موقعیت پرایمرهای طراحی شده بر روی ژن نورامینیداز در شکل ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش PCR ژن نورامینیداز

ویروس انفلونزای پرندگان

Primer	Sequence
N550F	5' GGAGTAAAGATGAATCCAAATC 3'
N11F	5' CAGAATGCGTTTCATCAATGG 3'
N11R	5' TGAGCACTTCCTGACAGTGG 3'
N550R	5' TCGCCCCATCAGGCCATGA 3'



شکل ۱. موقعیت پرایمرهای طراحی شده بر روی ژن نورامینیداز ویروس انفلونزای H9N2

واکنش RT. جهت تهیه cDNA، مواد مورد نیاز با حجم‌های ۶ میکرولیتر RT Buffer MULV (X1)، ۱/۵، میکرولیتر (۴/۵mM) dNTP، ۱ میکرولیتر (۳PM) Random Primer، یک میکرولیتر (۴۰U/ μ l) RNAase inhibitor، یک میکرولیتر (۰/۰۷۵U/ μ l) آنزیم RT و ۵ میکرولیتر RNA استخراج شده به عنوان الگو با هم مخلوط شدند. این مخلوط به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر برای انجام واکنش قرار گرفت.

واکنش PCR. واکنش PCR پس از بهینه‌سازی در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از حجم‌های ۳ میکرولیتر (X3) PCR Buffer، یک میکرولیتر (۳۰۰ μ M) dNTP، نیم میکرولیتر (۳U/ μ l) Taq polymerase، ۵ میکرولیتر (۱۵ ng) cDNA، یک میکرولیتر از هر کدام از Specific Primer و ۱۸/۵ میکرولیتر RNAase free Watter انجام شد. برنامه‌ی

آنالیز توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳ - در انتهای مقاله). آنالیز نشان داد که هیچ نوع جهشی در ناحیه سیتوپلاسمی این ژن رخ نداده است. با این حال، در بخش عبوری از غشا آن چهار جهش اتفاق افتاده است. که دو جهش آن از نوع خاموش بوده و دو جهش دیگر به جایگزینی اسیدآمینه آب‌گریز با اسیدآمینه آب‌گریز دیگر منجر شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

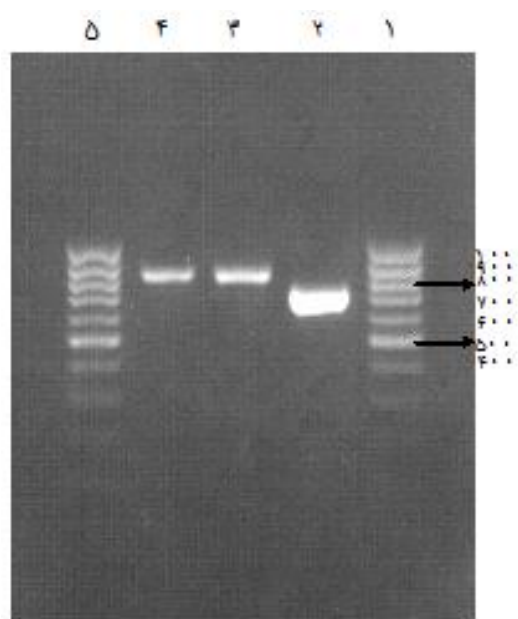
در این مطالعه، ژن نورامینیداز ویروس آنفلونزای H9N2 جدا شده از طیور طی ایبدمی‌های اخیر بیماری در ایران بررسی و همچنین توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی این ایزوله‌ها در مقایسه با برخی سویه‌های سایر کشورهای جهان آنالیز شد. توالی‌های نوکلئوتیدی حاوی ترادف ژن نورامینیداز ویروس آنفلونزای پرندگان (H9N2) مربوط به شش سویه‌ی ویروسی IR430/98 (اصفهان)، IR738/99 (قزوین)، IR496/99 (آذربایجان شرقی)، IR327/00 (گیلان)، IR261/01 (مازندران) و IR675/01 (خراسان) حاصل از گونه‌های متفاوت طیور و از نقاط مختلف کشور شناسایی شد و برای پایگاه داده GeneBank ارسال و ثبت گردید.

برای مقایسه دقیق اطلاعات ژنتیکی و مشخص نمودن تفاوت‌های احتمالی، ترادف ژن نورامینیداز ویروس آنفلونزای پرندگان (H9N2) با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (version 5.0.9) مورد آنالیز قرار گرفت. آنالیز مقایسه‌ای بین توالی‌های ژن نورامینیداز با توالی‌های نمونه‌های فرانس انجام شد و هیچ نوع جهشی در ناحیه سیتوپلاسمی مشاهده نشد. با این وجود، چهار جهش در بخش عبوری از غشا اتفاق افتاده است. که دو جهش آن از نوع خاموش بوده و دو جهش دیگر به جایگزینی اسیدآمینه آب‌گریز با اسیدآمینه آب‌گریز دیگر منجر شده است.

در مطالعه حاضر آنالیز و مقایسه نوکلئوتیدها و پروتئین (آمینواسیدهای) نورامینیداز سویه‌های مورد نظر با برخی از سویه‌های H9N2 از کشورهای آسیایی مانند پاکستان،

مرحله RT. برای تعیین آنزیم مناسب در آزمایش بهینه‌سازی واکنش RT، از دو آنزیم M-MULV و AMV استفاده گردید که محصولات هر دو واکنش مورد PCR قرار گرفته و باند مورد نظر مشاهده گردید. اگرچه باند در واکنش انجام شده با آنزیم AMV قابل رؤیت بود، اما در مورد آنزیم M-MULV باندها واضح‌تر و مناسب‌تر تشخیص داده شد، لذا در آزمایشات بعدی از این آنزیم (M-MULV) جهت تهیه cDNA استفاده شد.

در این مرحله با استفاده از روش RT-PCR تکثیر ژن نورامینیداز انجام شد. محصول نمونه‌های مورد بررسی، بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز گردید و قطعات اول و دوم ژن به ترتیب با طول ۸۰۰ و ۷۰۰ جفت باز مطابق شکل ۲ در ژل مشاهده شد.



شکل ۲. قطعات حاصل از PCR ژن نورامینیداز ویروس های آنفلونزای H9N2 جدا شده از طیور ایران. ستون ۲ قطعه دوم ژن با طول ۷۰۰ جفت باز؛ ستونهای ۳ و ۴ قطعه اول ژن با طول حدود ۸۰۰ جفت باز، ستونهای ۱ و ۵ مارکر (۱۰۰ bp).

مقایسه توالی سویه‌های مورد نظر. ژن نورامینیداز ویروس‌های آنفلونزای H9N2 جدا شده از ایران با نمونه‌های فرانس به کمک نرم‌افزار (BioEdit Version 5.0.9) جهت

اسید آمینه‌های باردار پوشانده شده است. این اسید آمینه‌ها در توالی پروتئین نورامینیداز انواع آنفلونزا A و B حفظ شده می‌باشند. این واحدها متشکل از Glu425, Lys350, Asp330 Arg152, Asp198, Arg224, Glu227, Asp243, His274, Glu276, Glu277, Arg292, Asp151, Glu119, Arg118 هستند. بعلاوه برخی واحدهای آب‌گریز در اطراف مکان فعال آنزیم وجود دارند که در تمامی توالی‌های شناخته شده حالت حفظ شده دارند و شامل Tyr121, Leu134, Trp178 می‌باشند [۱۶، ۲۲، ۱۷]. مطالعه حاضر نشان داد هیچ یک از سویه‌های ایرانی دارای جهش‌های مقاوم به ممانعت‌کننده‌های نورامینیداز نبوده‌اند. بررسی تکامل ویروس‌های آنفلونزای پرندگان در خاورمیانه و شبه قاره هند در طی سال‌های ۲۰۰۹-۱۹۹۴، تنوع جایگاه‌های آنتی ژنی هماگلوترین را نشان می‌دهد [۲، ۱]. جایگاه‌های آنتی ژنی برای نورامینیداز نیز بیانگر تنوع زیاد حتی گاهی اوقات در یک الگوی سالانه است و این امر تاییدکننده ارتباط بین تنوع آنتی ژنی در ویروس‌های H9N2 با ارتباطات فیلوژنتیکی آن می‌باشد [۲، ۱]. تنوع آنتی ژنی در سویه‌های H9N2 اغلب اثر زیادی بر روی تاثیرپذیری واکسن نیز دارد.

به طور خلاصه، نتایج آنالیز توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن نورامینیداز ویروس آنفلونزای H9N2 حاصل از ایزوله‌های ایران، دارای شباهت زیادی به سویه‌های گزارش شده از کشورهای همسایه در آسیا همانند پاکستان و عربستان بودند. توالی ژن نورامینیداز این سویه‌ها در طی زمان‌های مختلف و نواحی جغرافیایی متفاوت به خوبی حفظ شده، و نمایانگر داشتن تبار و منشاء یکسان آن‌هاست.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از تمام کسانی که در مراحل مختلف این پژوهش همکاری و مساعدت نموده‌اند صمیمانه تقدیر و سپاس‌گزاری نمایند.

عربستان سعودی، چین و ژاپن انجام گرفت. این مقایسه نشان داد که سویه‌های مورد نظر شباهت زیادی به سویه‌های کشورهای پاکستان و عربستان سعودی دارد [۱۴-۱۷]. پروتئین نورامینیداز دارای طولی معادل ۴۷۰ اسید آمینه است که بسیار شبیه به اندازه سایر نورامینیدازها می‌باشد. از نظر مقایسه با سایر تحت تیپ‌ها، ۶ بنیان اسید آمینه در انتهای نورامینیداز وجود دارد که در همه گونه‌های آنفلونزای A به صورت حفظ شده می‌باشند [۱۴، ۱۸-۲۰]. مقایسه ژن نورامینیداز ویروس آنفلونزای H9N2 حاصل از ایزوله‌های ایران نمایانگر این بود که هیچ نوع جهشی در ناحیه سیتوپلاسمی رخ نداده است. این امر نشان‌دهنده اهمیت و میزان حفظ شدگی بالای این ناحیه در بین سویه‌های مختلف مورد مطالعه می‌باشد. به دنبال ناحیه حفاظت شده در پروتئین نورامینیداز، یک بخش متغیر و آب‌گریز با طول حدود ۳۰ اسید آمینه وجود دارد که باعث قرارگیری پروتئین نورامینیداز در غشا می‌گردد. در این مطالعه، در بخش عبوری از غشا (Transmembrane Domain) چهار جهش مشاهده شد که دو جهش آن از نوع خاموش بوده و دو جهش دیگر منجر به جایگزینی اسید آمینه آب‌گریز با اسید آمینه آب‌گریز دیگر شده است (لوسین به ایزولوسین و بالعکس). توالی به شدت متغیری در بخش ساقه مانند پروتئین نورامینیداز وجود دارد [۱۷، ۱]. ما در این بخش چهار موتاسیون مشاهده کردیم که همگی از نوع خاموش بودند. با توجه به این‌که طول ساقه نورامینیداز در بیماری‌زایی ویروس موثر است، لذا بایستی در مطالعات انجام شده اندازه ساقه نورامینیداز مورد توجه قرار گیرد. در نمونه‌های مورد نظر که از اپیدمی‌های اخیر بیماری در ایران جدا شده است، هیچ‌گونه موتاسیونی از نوع حذف و یا اضافه شدن اسید آمینه در قسمت ساقه نورامینیداز مشاهده نگردید. ناحیه سر نورامینیداز که دارای تمامی فعالیت‌های آنزیمی است و ساختار سه بعدی آن توسط پروناز آزاد می‌شود، مشخص شده است. پروناز ناحیه سر نورامینیداز را در بین Arg80 و Ala81 برش می‌دهد [۱۵، ۲۱]. مکان فعال آنزیم توسط

	10	20	30	40	50	60
Consensus	AKAGVKMNP	QKIITALGSVS	LTIAITICLLM	QIAILATTMT	LHFKQNECTN	PSNNQAVPCE
IR430/98
IR738/99
IR496/99
IR327/00I.....
IR261/01I.....I.....
AR675/01L.....S.....
HK/G9/97	-----I.....I.....S.....V.....
PAK/5/99	-----V.....D.....
PAK/4/99	-----I.....
SA532/99	-----
NAR92/98	-----I.....
	70	80	90	100	110	120
Consensus	PIIIERNITE	IVYLNNTTIE	KENCCKVAEY	KNWSKPCQI	TGFAPFSKDN	SIRLSAGGDI
IR430/98
IR738/99G.....
IR496/99G.....
IR327/00G.....
IR261/01G.....L.....
AR675/01
HK/G9/97H.S.L.....I.....D.....	R.....
PAK/5/99H.S.I.....S.....A.....
PAK/4/99H.S.....S.....
SA532/99V.....H.....R.....
NAR92/98R.....
	130	140	150	160	170	180
Consensus	WVTREPYVSC	GLGKCYQFAL	GQGTTLNKH	SNGTTHDRSP	HRTLLMNELG	VPFHLGTRQV
IR430/98
IR738/99Q.....
IR496/99Q.....
IR327/00Q.....
IR261/01Q.....
AR675/01NHFG.....Q.....
HK/G9/97E.....A.....T.....A.Q.....
PAK/5/99S.....S.....
PAK/4/99S.....H.....S.....
SA532/99S.....YVSC.....	GLSKCYQFAL	GQGTTL.....
NAR92/98S.....
	190	200	210	220	230	240
Consensus	CIAWSSSSCH	DGKAWLHVCV	TGDDRNATAS	IYDGMLTDS	IGSWSKSLR	TQESECVGIN
IR430/98
IR738/99
IR496/99
IR327/00A.....I.....
IR261/01A.....I.....
AR675/01
HK/G9/97I.V.....N.....
PAK/5/99R.....
PAK/4/99
SA532/99SSCR.....N.....
NAR92/98

	250	260	270	280	290	300
Consensus	GTCTVVMTDG	SASGRADTRI	LPFIREGKIVH	ISPLSGSAQH	VEECSCYPRY	FEVRCVCRDN
IR430/98						
IR738/99						
IR496/99						
IR327/00						
IR261/01						
AR675/01						
HK/G9/97						
PAK/5/99						
PAK/4/99						
SA532/99						
NAR92/98						
	310	320	330	340	350	360
Consensus	WKGSNRPVLY	INMADYSIDS	SYVCSGLVGD	TPRNDDSSSS	SNCRDPNNER	GGFGVKGWAF
IR430/98						
IR738/99						
IR496/99						
IR327/00						
IR261/01						
AR675/01						
HK/G9/97						
PAK/5/99						
PAK/4/99						
SA532/99						
NAR92/98						
	370	380	390	400	410	420
Consensus	DNGNDVVMGR	TIKKDSRAGY	ETFRVVGWGT	TANSKSKQINR	QVIVDSDNLS	GYSGIFSVEG
IR430/98						
IR738/99						
IR496/99						
IR327/00						
IR261/01						
AR675/01						
HK/G9/97						
PAK/5/99						
PAK/4/99						
SA532/99						
NAR92/98						
	430	440	450	460	470	
Consensus	KSCINRCFYV	ELIRGRPQET	RVWVTSNSII	VFCGTSPTYG	TGSWPDGANI	NFMAI
IR430/98						
IR738/99						
IR496/99						
IR327/00						
IR261/01						
AR675/01						
HK/G9/97						
PAK/5/99						
PAK/4/99						
SA532/99						
NAR92/98						

شکل ۳. مقایسه توالی اسید آمینه هایژن نورامینیداز ویروسهای آنفلوآنزای H9N2 جدا شده از ایران با چند سویه بین المللی.

isolated from chicken in Iran during 2010-2011. Iran J Microbiol 2014; 6: 91-97.

[3] Zhu Y, Hu S, Bai T, Yang L, Zhao X, Zhu W, et al. Phylogenetic and antigenic characterization of reassortant H9N2 avian influenza viruses isolated from wild waterfowl in the East Dongting Lake wetland in 2011-2012. Virol J 2014; 11: 77.

[4] Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. Vet Microbiol 2000; 74: 3-13.

منابع

[1] Fusaro A, Monne I, Salviato A, Valastro V, Schivo A, Amarin NM, et al. Phylogeography and Evolutionary History of Reassortant H9N2 Viruses with Potential Human Health Implications. J Virol 2011; 85: 8413-8421.

[2] Norouzian H, Bashashati M, Marandi MV. Phylogenetic analysis of neuraminidase gene of H9N2 avian influenza viruses

- [14] Wang B, Liu Z, Chen Q, Gao Z, Fang F, Chang H, et al. Genotype Diversity of H9N2 Viruses Isolated from Wild Birds and Chickens in Hunan Province, China. *PLoS One* 2014; 9: e101287.
- [15] Aamir UB, Wernery U, Ilyushina N, Webster RG. Characterization of avian H9N2 influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to 2003. *Virology* 2007; 361: 45-55.
- [16] Monne I, Fusaro A, Al-Blawi MH, Ismail MM, Khan OA, Dauphin G, et al. Co-circulation of two sublineages of HPAI H5N1 virus in the Kingdom of Saudi Arabia with unique molecular signatures suggesting separate introductions into the commercial poultry and falconry sectors. *J Gen Virol* 2008; 89: 2691-2697.
- [17] Pan C, Cheung B, Tan S, Li C, Li L, Liu S, Jiang S. Genomic signature and mutation trend analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus. *PLoS One* 2010; 5: e9549.
- [18] Nili H, Asasi K. Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathol* 2002; 31: 247-252.
- [19] Wu ZQ, Ji J, Zuo KJ, Xie QM, Li HM, Liu J, et al. Cloning and phylogenetic analysis of hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian influenza virus from different isolates in China during 2002 to 2009. *Poult Sci* 2010; 89: 1136-1143.
- [20] Wernery U, Shanmuganatham KK, Krylov PS, Joseph S, Friedman K, Krauss S, Webster RG. H9N2 influenza viruses from birds used in falconry. *Influenza Other Respir Viruses* 2013; 7: 1241-1245.
- [21] Bertran K, Busquets N, Abad FX, De La Fuente JG, Solanes D, Cerdón I, et al. Highly (H5N1) and low (H7N2) pathogenic avian influenza virus infection in falcons via naschoanal route and ingestion of experimentally infected prey. *PLoS One* 2012; 7: e32107.
- [22] Samadi T, Kiani zadeh M, Fathi Najafi M, Mousavi nasab SD, Hossein Nia Davatgar AM, Jafari M, et al. Identification of newcastle disease virus F gene from recent outbreaks in Iran. *J Ilam Univ Med Sci* 2013; 21: 135-142. (Persian).
- [5] Park KJ, Kwon HI, Song MS, Pascua PN, Baek YH, Lee JH, et al. Rapid evolution of low-pathogenic H9N2 avian influenza viruses following poultry vaccination programmes. *J Gen Virol* 2011; 92: 36-50.
- [6] Homayounimehr AR, Dadras H, Shoushtari A, Pourbakhsh SA. Sequence and phylogenetic analysis of the haemagglutinin genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commercial chickens in Iran. *Trop Anim Health Prod* 2010; 42: 1291-1297.
- [7] Qi X, Cui L, Jiao Y, Pan Y, Li X, Zu R, et al. Antigenic and genetic characterization of a European avian-like H1N1 swine influenza virus from a boy in China in 2011. *Arch Virol* 2013; 158: 39-53.
- [8] Banet-Noach C, Panshin A, Golender N, Simanov L, Rozenblut E, Pokamunski S, et al. Genetic analysis of nonstructural genes (NS1 and NS2) of H9N2 and H5N1 viruses recently isolated in Israel. *Virus Genes* 2007; 34: 157-168.
- [9] Cong YL, Wang CF, Yan CM, Peng JS, Jiang ZL, Liu JH. Swine infection with H9N2 influenza viruses in China in 2004. *Virus Genes* 2008; 36: 461-469.
- [10] Panshin A, Golender N, Davidson I, Nagar S, Garsia M, Jackwood MW, et al. Variability of NS1 proteins among H9N2 avian influenza viruses isolated in Israel during 2000–2009. *Virus Genes* 2010; 41: 396-405.
- [11] Lee CH, Byun SH, Lee YJ, Mo IP. Genetic evolution of the H9N2 avian influenza virus in Korean poultry farms. *Virus Genes* 2012; 45: 38-47.
- [12] Liu H, Liu X, Cheng J, Peng D, Jia L, Huang Y. Phylogenetic analysis of the hemagglutinin genes of twenty-six avian influenza viruses of subtype H9N2 isolated from chickens in China during 1996-2001. *Avian Dis* 2003; 47: 116-127.
- [13] Arafa AS, Hagag N, Erfan A, Mady W, El-Husseiny M, Adel A, Nasef S. Complete genome characterization of avian influenza virus subtype H9N2 from a commercial quail flock in Egypt. *Virus Genes* 2012; 45: 283-294.

Characterization of neuraminidase gene of H9N2 influenza virus isolated from recent outbreaks in Iran

Sara Samadi (M.Sc)¹, Mahdi Kianizadeh (Ph.D)², Reza Toroghi (Ph.D)², Seyed Davood Mousavi Nasab (M.Sc)³, Zahra Gohari (M.Sc)², Amir Mohammad Hosseinnia Davatgar (M.Sc)⁴, Somayeh Dorri Ardabili (M.Sc)⁵, Nayeb Ali Ahmadi (Ph.D)*⁶

1- North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

2- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Mashhad, Iran

3- Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

5- Payame Noor University of Mashhad

6- Proteomics Research Center, and Department of Medical Laboratory Technology, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 26 Jun 2015; Accepted: 18 Apr 2015)

Introduction: Influenza viruses cause a variety of infections from high to low pathogenicity in hosts. Influenza virus A is divided into subtypes based on two surface glycoproteins: the hemagglutinin (H) and the neuraminidase (N). Avian flu viruses do not normally infect humans, although, some sporadic human infections have been reported. The aim of this study was to identify and sequence the neuraminidase gene of Avian Influenza (AI) H9N2 virus isolated from recent outbreaks in Iran and comparative analyzing it with strains from other countries.

Materials and Methods: Influenza viruses were passaged in embryonated eggs, and RNA extracted by RNX. TM kit. Using RT-PCR technique, cDNA preparation and amplification of N gene were done. The product was then assessed by electrophoresis and observed with UV, purified and sequenced.

Results: Neuraminidase gene nucleotide sequence from six isolates from different parts of Iran were identified and recorded at the GenBank. Comparative analysis with reference strains carried out for these sequences. No mutation had been observed in cytoplasmic domain, however, four mutations had been occurred at transmembrane domain, which two of them were silent and two were actually substitution of hydrophobic amino acids with similar ones.

Conclusion: Nucleotide and amino acid analysis for the neuraminidase gene of H9N2 influenza virus of isolates obtained from different parts of Iran revealed similarities to other strains described from neighboring countries, such as Pakistan and Saudi Arabia. It seems like that they have common source with the same lineages.

Keywords: Avian Influenza, H9N2, Neuraminidase, Nucleotide Analysis, Iran

* Corresponding author. Tel: +98 21 22718528
nayebalia@yahoo.com