

# آنالیز فیلوژنتیک ژن نورآمینیداز ویروس آنفلوانزای پرندگان زیرتیپ H5N1 شناسایی شده در ایران در سال ۱۳۹۰

ابراهیم کرد<sup>۱</sup>، عبدالحمید شوشتری<sup>۱\*</sup>، هادی فامیل قدکچی<sup>۱</sup>، رضا محمدی<sup>۲</sup>، ابوالقاسم هادی‌نیا<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> بخش بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، کرج، ایران، <sup>۲</sup> مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، <sup>۳</sup> مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۸

## چکیده

**زمینه و هدف:** در بین زیرتیپ‌های مختلف آنفلوانزای پرندگان، ویروس‌های با قدرت بیماری‌زایی بالا زیرتیپ H5N1 از اهمیت بالایی برخوردار است. هدف این مطالعه آنالیز فیلوژنتیک ژن نورآمینیداز ویروس آنفلوانزای پرندگان زیرتیپ H5N1 شناسایی شده در ایران در سال ۱۳۹۰ بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی تعداد دو سوآپ گرفته شده از جوجه‌های دارای علائم مشکوک، از نظر آنفلوانزای پرندگان با تکنیک‌های توصیه شده سازمان بهداشت جهانی بررسی شدند. سپس ژن نورآمینیداز نمونه مثبت با تکنیک RT-PCR تکثیر شد و پس از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزارهای Megalign و MEGA5 مورد بررسی فیلوژنتیک قرار گرفت.

**یافته‌ها:** آنالیزهای فیلوژنتیک نشان دادند که این ویروس متعلق به Clade 2.3.2.1 است و بیشترین شباهت را به ویروس‌های شناسایی شده در مغولستان در سال ۲۰۱۰ دارد. همچنین، در ساقه‌ی پروتئین نورآمینیداز این ویروس ۲۰ اسیدآمینو در موقعیت ۴۹-۶۹ حذف شده است.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌های این مطالعه، به نظر می‌رسد که این ویروس‌ها به وسیله پرندگان وحشی مهاجر و از منشاء ویروس‌های مغولستان وارد ایران شده‌اند.

**واژه‌های کلیدی:** آنفلوانزا، پرندگان، نورآمینیداز

\* نویسنده مسئول: دکتر عبدالحمید شوشتری، کرج، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش بیماری‌های طیور

Email: hamid1342ir@yahoo.com



## مقدمه

ویروس‌های آنفلوانزا عضوی از خانواده اورتومیکسوویریده هستند. ویروئین این ویروس‌ها با قطر ۸۰-۱۲۰ نانومتر به شکل پلی‌مورفیک دیده می‌شود. ژنوم این ویروس‌ها RNA تک رشته‌ای سنس منفی و قطعه قطعه است (۱). پروتئین نورآمینیداز به وسیله قطعه ششم ژنوم ویروس کد می‌شود و پس از گلیکوزیله شدن در سطح ویروئین قرار می‌گیرد. این پروتئین با جدا کردن اسیدسیالیک از هم‌گلوکوتینین (HA)، رهایی ویروس‌های تازه تولید شده را تسهیل کرده و به انتشار ویروس‌ها کمک می‌نماید. NA پس از HA مهم‌ترین گلیکوپروتئین سطحی ویروس است و همانند HA متحمل تغییرات آنتی‌ژنیک می‌شود. این تغییرات می‌توانند بر خصوصیات بیولوژیک ویروس اثر بگذارند (۲-۴).

بر اساس نوکلئوپروتئین و پروتئین ماتریکس، این ویروس‌ها به ۵ جنس (تیپ) تقسیم می‌شوند که شامل: آنفلوانزاهای C، B، A و جنس‌های توگوتسوویروس و ایزاوویروس می‌باشند. در تقسیم‌بندی دیگر، ویروس‌های آنفلوانزای A بر اساس تفاوت‌های آنتی‌ژنیک در دو گلیکوپروتئین سطحی HA و NA به زیرتیپ‌ها تقسیم می‌شوند (۲). تاکنون ۱۶ زیر تیپ HA و ۹ زیر تیپ NA تعریف شده است (۳). این ویروس‌ها دارای طیف میزبانی متنوعی هستند. تاکنون همه زیرتیپ‌ها از پرندگان شناسایی شده‌اند، اما تعداد محدودی از آنها در پستانداران شناسایی شده‌اند. لذا معتقدند که مخزن طبیعی اصلی این ویروس‌ها،

پرندگان آبی به ویژه پرندگان متعلق به راسته‌های Anseriforms و Charadriiforms هستند (۵-۷).

ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان بر پایه قدرت بیماری‌زایی در بوقلمون و جوجه‌ها به دو گروه تقسیم می‌شوند. گروه با قدرت بیماری‌زایی پایین<sup>(۱)</sup> که اکثر ویروس‌ها را شامل می‌شود به صورت موضعی در دستگاه تنفس و گوارش پرندگان تکثیر می‌شوند و ممکن است عفونت‌های تحت بالینی یا بیماری خفیف با کاهش تخم‌گذاری و علایم تنفسی ایجاد کنند، البته ممکن است با اضافه شدن عفونت باکتریایی ثانویه علایم شدیدتری ایجاد شود. اما گروه با قدرت بیماری‌زایی بالا<sup>(۲)</sup> که عامل بیماری حاد سیستیک در جوجه‌ها و بوقلمون‌ها هستند می‌توانند سبب مرگ و میر زیادی در گله‌ها در طی چند روز بیماری شوند. این ویروس‌ها به زیر تیپ‌های H5 و H7 محدودند و البته تمام ویروس‌های متعلق به این زیرتیپ‌ها متعلق به گروه با قدرت بیماری‌زایی بالا نیستند (۸ و ۲).

ویروس‌های HPAI H5N1 برای اولین بار در سال ۱۹۹۶ در چین از غازها جداسازی شدند و در سال‌های ۱۹۹۶-۱۹۹۷ به مناطق جنوب شرق چین و هنگ کنگ در مزارع و فروشگاه‌های پرندگان زنده محدود ماندند، اما از سال ۲۰۰۳ به بعد این ویروس‌ها با متحمل شدن تغییرات ژنتیکی وسیع توان تطابق با انواع میزبان‌ها را کسب کرده و به کشورهای همسایه و سپس به مناطق وسیعی از جهان انتشار پیدا کردند

1-Low Pathogenic Avian Influenza(LPAI)  
2- High Pathogenic Avian Influenza(HPAI)

هدف این مطالعه آنالیز فیلوژنتیک ژن نورآمینیداز ویروس آنفلوانزای پرندگان زیرتیپ H5N1 شناسایی شده در ایران در سال ۱۳۹۰ بود.

### روش بررسی

در این مطالعه تجربی پس از مشاهده علائم مشکوک به آنفلوانزای پرندگان در جوجه‌ها در مازندران، تعداد دو نمونه با استفاده از سوآپ از کلوآک جوجه‌ها جمع‌آوری شده و به وسیله روش‌های مولکولی توصیه شده سازمان بهداشت جهانی با استفاده از کیت RT-PCR یک مرحله ای<sup>(۱)</sup> (شرکت روش، آلمان) از نظر زیرتیپ‌های H5N1 و H9N2 آنفلوانزا و همچنین ویروس نیوکاسل مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA با خلوص بالا<sup>(۲)</sup> (شرکت روش، آلمان) بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد.

آزمایش RT-PCR به صورت تک مرحله‌ای جهت تکثیر قطعه ژنی نورآمینیداز با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به وسیله هافمن و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد (۱۴). محلول واکنش به حجم ۵۰ میکرولیتر به صورت مخلوطی از ۲۷/۵ میکرولیتر آب مقطر دی‌یونیزه، ۱۰ میکرولیتر بافر PCR، ۲/۵ میکرولیتر DTT، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۱ میکرولیتر DNA

و در کشورهای مختلف از گونه‌های مختلفی شامل؛ انواع پرندگان آبزی اهلی و وحشی و پستاندارانی مانند انسان شناسایی شده‌اند (۱۰ و ۹). انتشار به وسیله پرندگان مهاجر و جابه جایی ماکیان یا محصولات آنها، دومکانیسم عمده انتشار جغرافیایی این ویروس‌ها است. انتقال از پرنده به پرنده با تماس مستقیم با ترشحات تنفسی و فضولات آلوده حیوان رخ می‌دهد. همچنین، این ویروس‌ها در برخی پرندگان آبزی ایجاد عفونت‌های بدون علامت می‌کنند و حیوان بدون بروز علائم به انتشار ویروس می‌پردازد و دیگر حیوانات حساس ممکن است از طریق آب آلوده با فضولات حیوان مبتلا شوند. این مکانیسم‌های انتشار ویروس به مناطق جدید با آنالیزهای فیلوژنتیک و ترسیم مسیرهای شناخته شده مهاجرت پرندگان و نیز الگوهای دامپروری و تجارت محصولات دامی بررسی می‌شوند (۱۱، ۸، ۲).

انتقال ویروس‌های HPAIH5N1 به انسان با میزان مرگ و میر بالا به یکی از تهدیدات مهم سلامت جوامع انسانی تبدیل شده است. اولین انتقال به انسان در سال ۱۹۹۷ در هنگ کنگ گزارش شد و ۱۸ نفر به این ویروس مبتلا شدند که ۶ نفرشان جان باختند. عفونت‌های انسانی با این ویروس‌ها نادرند و به صورت اسپورادیک رخ می‌دهند، اما میزان مرگ و میر بالایی دارند (۱۲).

در ایران، ویروس‌های HPAIH5N1 در سال‌های ۲۰۰۶ و ۲۰۰۸ گزارش شدند (۱۳). مجدداً در سال ۲۰۱۱ این ویروس‌ها در شمال ایران شناسایی شدند.

1-One Step RT-PCR  
2-High Pure Viral RNA kit

## یافته ها

جوجه‌هایی که مشکوک به آنفلوانزای پرندگان بودند علائمی هم‌چون افسردگی شدید، عدم تعادل و هماهنگی، لرز و تکان خوردن‌های بدون کنترل، ناتوانی در ایستادن، کاهش توانایی برداشت آب و غذا، ورم صورت و تورم سیانوتیک شان‌ها و ساق‌ها را نشان می‌دادند.

نمونه‌ها از نظر H9N2 و نیوکاسل منفی بودند و فقط یکی از نمونه‌ها از نظر H5N1 مثبت بود.

بر اساس نتایج به دست آمده از آنالیز فیلوژنتیک توالی ژن نورآمینیداز، ویروس مورد مطالعه در Clade 2.3.2.1 قرار گرفت. درخت فیلوژنتیک رسم شده در تصویر ۱ نشان داده شده است.

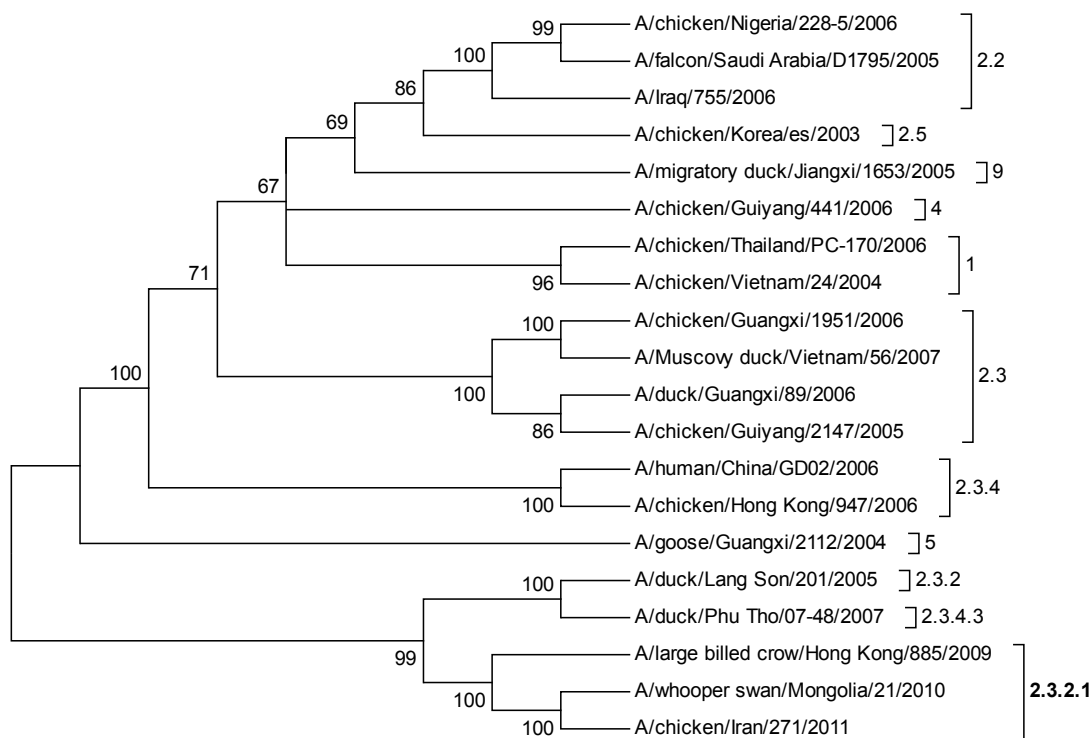
در بررسی همولوژی انجام شده، این ویروس بیشترین تشابه را با ویروس جدا شده در مغولستان (A/whooper swan/Mongolia/21/2010) نشان داد. توالی پروتئین نورآمینیداز این ویروس با توالی این پروتئین در ویروس A/goose/Guangdong/1/96 مقایسه شد که حذف ۲۰ اسیدآمینو ای (در موقعیت ۴۹-۶۹) در ساقه NA را نشان داد. اسیدآمینوهای مهم این پروتئین در موقعیت‌های مؤثر بر خصوصیات آن مثل مقاومت‌های دارویی در این ویروس‌ها به صورت E119, Y274, C292, R293, D294 بودند و موتاسیون‌های H274Y و N294D در توالی این پروتئین مشاهده شدند.

پلی‌مرز (High fidelity Expand DNA polymerase)، ۴ میکرولیتر RNA، ۲ میکرولیتر پرایمر جلو (Forward) ۲ میکرولیتر پرایمر معکوس (Reverse) تهیه شد. برنامه حرارتی شامل مرحله رونویسی معکوس با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه، دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۲۵ سیکل شامل دناتوراسیون به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر به مدت یک دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، گسترش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد و در انتها، گسترش انتهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد با استفاده از ترموسایکلر (شرکت اپندروف) انجام شد.

محصول واکنش RT-PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و عمل استخراج DNA از روی ژل با استفاده از کیت استخراج محصول PCR با خلوص بالا<sup>(۱)</sup> (شرکت روش، آلمان) انجام شد.

برای ویرایش توالی‌ها و نیز ترجمه آنها به پروتئین از نرم افزار BioEdit استفاده شد. تشابه توالی به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن از طریق Multiple alignment با استفاده از برنامه Megalign بررسی شد. همچنین با استخراج توالی از بانک ژن از نرم افزار MEGA5 استفاده و به روش Neighbor-Joining (NJ) distance-based درخت فیلوژنتیک ترسیم شد.

1- High Pure PCR Product Purification Kit



تصویر ۱: درخت فیلوژنتیک ژن نورآمینیداز (NA) ویروس HPAIH5N1 شناسایی شده در ایران در سال ۱۳۹۰ (این درخت با استفاده از نرم افزار MEGA 5 و با روش Distance-based Neighbor- Joining (NJ) ترسیم شده است).

## بحث

پرنده‌گان مهاجریکی از راه‌های اصلی معرفی ویروس به مناطق جدید است (۸ و ۲). بنابراین، این منطقه می‌تواند به عنوان دروازه ورودی این ویروس‌ها به داخل کشور مطرح باشد. این ادعا را شناسایی مجدد این ویروس‌ها در این منطقه در سال‌های ۲۰۰۸ و ۲۰۱۱ تأیید می‌کند. از سویی، در این ناحیه مرغداری‌های صنعتی زیادی وجود دارد که احتمال ورود این ویروس‌ها به مرغداری‌ها و تحمیل خسارت‌های اقتصادی فراوان به صنعت مرغداری افزایش می‌یابد.

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی موارد شیوع HPAIH5N1 در بین پرنده‌گان وحشی و ماکیان از اواسط سال ۲۰۰۸ رو به افزایش گذاشت و

ویروس‌های HPAIH5N1 برای اولین بار در سال ۱۹۹۶ در چین ظاهر شدند (۹)، اما در پی گردش مداوم در بین میزبان‌های مختلف متحمل تغییرات ژنتیکی شده و در سال ۲۰۰۳ به مناطق وسیعی از آسیا، اروپا، خاورمیانه و آفریقا انتشار یافتند (۱۰). در ایران، برای اولین بار این ویروس‌ها در شمال کشور شناسایی شدند (۱۳). وجود دریای خزر با تالاب‌های متنوع در شمال ایران، زیستگاه بسیار مناسبی را برای انواع پرنده‌گان فراهم نموده است. به طوری که گونه‌های مختلفی از پرنده‌گان در این ناحیه زندگی می‌کنند. هم‌چنین، این منطقه یکی از توقف‌گاه‌های اصلی پرنده‌گان مهاجر می‌باشد. انتشار ویروس به وسیله

ویروس مورد مطالعه بیشترین شباهت را از نظر توالی ژن نورآمینیداز با ویروس‌های جدا شده در مغولستان نشان داد. همچنان که قبلاً بیان شد انتشار ویروس‌های HPAI H5N1 به وسیله پرندگان مهاجر یکی از مسیرهای عمده انتشار این ویروس‌ها است (۸ و ۲). لذا به نظر می‌رسد که این ویروس‌ها نیز به وسیله پرندگان وحشی مهاجر وارد ایران شده اند.

تعادل و بالانس بین اتصال به سلول به وسیله هم‌گلوتینین (HA) و رهایی از سلول به وسیله NA برای تکثیر ویروس مهم است (۱۸). در ویروس مورد مطالعه حذف ۲۰ اسیدآمینه ای در موقعیت ۶۹ - ۴۹ در ساقه ی NA همانند سایر ویروس‌های Clade 2.1 مشاهده شد. پیشنهاد شده است که این حذف، برای تعادل بین HA و NA و نیز سازگار شدن ویروس‌های پرندگان آبی به پرندگان زمینی مثل جوجه‌ها دارای اهمیت می‌باشد (۱۹ و ۱۸). بنابراین، حذف این ناحیه در پروتئین NA به ویروس‌های ایران قدرت سازگار شدن و ایجاد آلودگی در ماکیان را داده است.

داروهای اسلتامی‌ویر و زانامی‌ویر که برای پیشگیری و درمان آنفلوانزا استفاده می‌شوند پروتئین نورآمینیداز (NA) را هدف گرفته‌اند. بنابراین تغییرات نورآمینیداز (NA) می‌تواند در ایجاد مقاومت‌های دارویی اثر داشته باشد. از موتاسیون‌هایی که در ایجاد مقاومت دارویی در مقابل مهارکننده‌های نورآمینیداز نقش دارند می‌توان به موتاسیون‌های H274Y, N294S, R293K, E119V اشاره کرد (۲۰ - ۱۸). در

در سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۱ افزایش چشمگیری از شیوع این ویروس‌ها در کشورهای آسیایی گزارش شد. با توجه به افزایش گزارش‌هایی از مناطق مختلف، جهت تسهیل بررسی‌های فیلوژنتیک و اپیدمیولوژیک ایزوله‌های شناسایی شده به گروه‌های ژنتیکی (Clades) تقسیم شدند. بر اساس گزارش گروه نام‌گذاری سازمان بهداشت جهانی در سال‌های ۲۰۰۸-۲۰۰۵ Clade غالب در گردش در آسیا Clade 2.2 بوده است، اما از سال ۲۰۰۸ به بعد Clade 2.3.2.1 به طور فزاینده‌ای از پرندگان وحشی و ماکیان در بسیاری از کشورها جداسازی گردید. این ویروس‌ها از ویروس‌های Clade 2.3.2 که قبلاً در بین ماکیان در شرق آسیا از سال ۲۰۰۵ در گردش بوده‌اند مشتق شده‌اند و واگرایی نوکلئوتیدی بیشتری نسبت به Clade های دیگر دارند که این امر به دلیل سازگار شدن این ویروس‌ها به گونه‌های مختلف پرندگان و نیز معارفه آنها به مناطق جغرافیایی مختلف به وسیله پرندگان وحشی می‌باشد (۱۷-۱۵). بررسی خصوصیات فیلوژنتیک ژن نورآمینیداز ویروس (H5N1) A/Chicken/Iran/271/2011 نشان داد که این ویروس در Clade 2.3.2.1 قرار می‌گیرد و از ویروس‌های قبلی ایران که در Clade 2.2 قرار داشتند متفاوت می‌باشد (۱۵ و ۱۳). همچنان که اشاره شد ویروس‌های Clade 2.3.2.1 اخیراً در بسیاری از کشورهای آسیایی در گردش بوده‌اند و گزارش‌هایی از حضور ویروس‌های این Clade در بین پرندگان وحشی در مغولستان نیز موجود می‌باشد. از طرفی،

است. از زحمات کلیه پرسنل بخش بیماری‌های طیور مؤسسه و آقای هادی فاضل صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نماییم.

ویروس مورد مطالعه موتاسیون H274Y مشاهده شد. بنابراین، این ویروس‌ها درجاتی از مقاومت در برابر اسلتامی‌ویر را کسب کرده‌اند. همچنین اسید آمینه اسید آسپارتیک در موقعیت ۲۹۴ جایگزین آسپارژین (موتاسیون N294D) شده است. اثر این موتاسیون بر بیولوژی و اپیدمیولوژی ویروس بررسی‌های بیشتری را می‌طلبد. سایر موتاسیون‌های ذکر شده در ویروس مورد مطالعه مشاهده نشدند.

### نتیجه‌گیری

از یافته‌های فوق می‌توان نتیجه گرفت که ویروس‌های شناسایی شده در ایران در سال ۱۳۹۰، به وسیله پرندگان مهاجر و احتمالاً از منشأ ویروس‌های مغولستان وارد کشور شده‌اند. بنابراین، با توجه به موارد گزارش شده قبلی و شناسایی مجدد ویروس‌های HPAIH5N1 در این منطقه، به نظر می‌رسد که خطر ورود این ویروس‌ها به وسیله پرندگان مهاجر از شمال ایران و معرفی آنها به مزارع ماکیان و مرغداری‌های صنعتی همیشه وجود دارد. از اینرو، پایش مداوم جمعیت پرندگان وحشی و اهلی این منطقه برای حضور این ویروس‌ها جهت اتخاذ تصمیمات مناسب برای مقابله با شیوع احتمالی آنها امری حیاتی به نظر می‌رسد.

### تقدیر و تشکر

این مطالعه در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کرج و تحت حمایت این مؤسسه انجام شده



## REFERENCES

1. Naeem K, Ullah A, Manvell R, Alexander D. Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. *Veterinary Record* 1999;145(19): 560.
2. Swayne D, Suarez D. Highly pathogenic avian influenza. *Revue scientifique et technique International Office of Epizootics* 2000; 19(2): 463.
3. Noroozian H, Vasfi Marandi M, Gorashi SA. Analysis of neuraminidase gene in isolated avian influenza viruses of H9N2 subtype from Iran. *J Vet Res* 2010; 65: 311-8.
4. Baum LG, Paulson JC. The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity. *Virology* 1991; 180(1): 10-5.
5. Guan Y, Peiris J, Lipatov A, Ellis T, Dyrting K, Krauss S, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99(13): 8950-5.
6. Nguyen DC, Uyeki TM, Jadhao S, Maines T, Shaw M, Matsuoka Y, et al. Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi, Vietnam, in 2001. *Journal of Virology* 2005;79(7):4201-12.
7. Kianizadeh M, Gohar S, Najafi M, Toroghi R, Pournakhsh S. Neuraminidase gene sequence analysis of avian influenza H9N2 viruses isolated from Iran. *Archives of Razi Institute* 2007; 62(2): 69-74.
8. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology* 2000; 74(1): 3-13.
9. Xu X, Subbarao K, Cox NJ, Guo Y. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* 1999; 261(1): 15-9.
10. Cattoli G, Fusaro A, Monne I, Capua I. H5N1 virus evolution in Europe—an updated overview. *Viruses* 2009;1(3):1351-63.
11. Yee KS, Carpenter TE, Cardona CJ. Epidemiology of H5N1 avian influenza. *Comparative immunology. Microbiology And Infectious Diseases* 2009; 32(4): 325-40.
12. Capua I, Alexander DJ. Avian influenza and human health. *Acta Tropica* 2002; 83(1): 1-6.
13. Shoushtari A, Hablolvarid M, Vascellari M, Hedayati A. Mortality of wild swans associated with naturally infection with highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in Iran. *Archives of Razi* 2008; 62(4): 207-13.
14. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster R, Perez D. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology* 2001; 146(12): 2275-89.
15. Smith G, Donis R. Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. 2012.
16. Donis R, Smith G, Brown I, Capua I, Cattoli G, Chen H, et al. Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: Divergence of clade 2.2 viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2009; 3(2): 59-62.
17. FAO-OIE-WHO. Technical Update: Current evolution of avian influenza H5N1 viruses. 2011.
18. Nimmanpipug P, Jitonnorn J, Ngaojampa C, Hannongbua S, Lee V. A computational H5N1 neuraminidase model and its binding to commercial drugs. *Molecular Simulation* 2007; 33(6): 487-93.
19. de Jong MD, Thanh TT, Khanh TH, Hien VM, Smith GJD, Chau NV, et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *New England Journal of Medicine*. 2005; 353(25): 2667-72.
20. Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, Nguyen TH, Nguyen KHL, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 2005; 437(7062):1108.

# Phylogenetic analysis of Neuraminidase gene of avian influenza H5N1 subtype detected in Iran in 1390(2011)

Kord E<sup>1</sup>, Shoushtari A<sup>1\*</sup>, Ghadakchi H<sup>1</sup>, Mohammadi R<sup>2</sup>, Hadinia A<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of avian disease, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran, <sup>2</sup>Plant Medicine Research Center, Yasuj University of Medical sciences, Yasuj, Iran, <sup>3</sup>Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 07 Feb 2013

Accepted: 03 Dec 2013

## Abstract

**Background & aim:** Among the various subtypes of avian influenza viruses, an H5N1 subtype virus with high pathogenicity is of great importance. The aim of this study was to determine the Phylogenetic analysis of neuraminidase gene of avian influenza virus subtype of the H5N1 in Iran in 1390.

**Methods:** In this experimental study, two swab samples from chickens with suspected symptoms of avian influenza were tested by the World Health Organization recommendation. The neuraminidase gene of positive samples was amplified by RT-PCR technique. After sequencing the phylogenetic studies were analyzed using MEGA5 and Megalign.

**Results:** Phylogenetic analysis showed that the virus belongs to the Clade 2.3.2.1 which is highly similar to the viruses that are identified in Mongolia in 2010. Also in the stem of this virus neuraminidase protein a number of 20 amino acid has been deleted at position 69-49.

**Conclusion:** Due to findings of this study, it seems that the virus has entered by migratory wild birds with the origin of Mongolia.

**Key words:** Influenza, Avian, Neuraminidase

---

\*Corresponding Author: Shoushtari A, Department of avian disease, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran  
Email: hamid1342ir@yahoo.com