DOI: 10.22092/vj.2024.364030.2101 No 147 Summer 2025

Veterinary Research & Biological Products

Original Article

Phenotypic investigation of circulating avian influenza viruses by specific hemagglutination inhibition test

Masoud Moghaddam Pour[1]*, Abdulhamid Shushtri[2], Shahin Masoudi[1], Morteza Taghizadeh Tarnabi[3], Mahdieh Jafari[4]

1-Department of Research and Production of Poultry Viral Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research Institute (Hesarak), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2-Department of Poultry disease diagnosis and research, Razi Vaccine and Serum Research Institute (Hesarak), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

3-Department of Human vaccine, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

4-Department of Immunology, Pasteur Institute of Tehran, Iran

Recieved: 2023-12-23 **Accepted: 2024-07-11**

Revised: 2024-07-09 **Published: 2025-06-22**

* Email: m.moghaddam@rvsri.ac.ir.com

Abstract

Introduction : Researchers record new isolates of circulating influenza viruses. **Goal :**To prove the novelty of the virus phenotype, it is checked against the standard antiserum with a specific HI test. If the standard serum fails to completely neutralize the isolate, the genotypic change has increased to such an extent that it has caused a phenotypic change. **Method of work** : In a research, the method of investigation and phenotypic identification of new strains of influenza (H9N2) in Iran was carried out according to the instructions of the CDC center. Three isolates of avian influenza virus (strain (H9N2) named A, B and C and the vaccine strain virus were passaged in SPF embryonated eggs for renewal. (1377) with fresh antigens and polyclonal serum, a special hemagglutination inhibition test was performed and the neutralization rate of viruses against polyclonal antiserum was evaluated. Of the three selected isolates, only sample C showed a difference of five wells compared to the vaccinal virus. The results of isolates A and B were similar to influenza vaccine virus. To ensure the accuracy of the results, the experiment was repeated three times, and the results of all three repetitions were similar. **Conclusion :** The results of this research proved the applicability of the special hemagglutination (HI) test method for the phenotypic identification of new isolates under the H9N2 type. It is recommended that the country's avian influenza reference laboratories use this method.

Key words: avian influenza, HI test, phenotypic investigation, vaccine seed, circulating virus

DOI: 10.22092/vj.2024.364030.2101 شماره ۱۴۷ تابستان ۱۴۰۴

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مقاله کامل

بررسی فنوتیپی ویروس‌های در گردش آنفلوانزای طیور به وسیله آزمایش مهار هماگلوتیناسیون ویژه

مسعود مقدم پور[1*]، عبدالحمید شوشتری[2]، شهین مسعودی[1]، مرتضی تقی زاده طرنابی[3]، مهدیه جعفری[4]

۱- بخش تحقیق و تولید واکسن های ویروسی طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران.

۲- بخش تشخیص و تحقیق بیماری های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران.

۳- گروه واکسن های انسانی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران.

٤- بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۰۲-۱۰-۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: ۲۱-۰٤-۱۴۰۳

تاریخ بازنگری: ۱۹-۰٤-۱۴۰۳ تاریخ انتشار: ۰۱-۰٤-۱۴۰۴

*E-mail:m.moghaddam@rvsri.ac.ir

چکیده

مقدمه: محققان جدایه‌های جدید ویروس آنفلوانزاهای در گردش را ثبت می‌کنند. **هدف:** اثبات جدید بودن عملکرد فنوتیپ ویروس در برابر آنتی‌سرم استاندارد با آزمایش HI ویژه قابل بررسی است. اگر آنتی‌سرم استاندارد نتواند ویروس جدید را به‌طور کامل خنثی کند، یعنی تغییرات ژنوتیپی به حدی زیاد است که باعث تغییر فنوتیپ شده است. **روش کار:** در تحقیقی روش شناسایی فنوتیپی سویه‌های (H9N2) جدید آنفلوانزا نخستین بار در ایران طبق دستورالعمل مرکز CDC انجام شد. سه ویروس جدایهٔ آنفلوانزای طیور (سویهٔ H9N2) به نام‌های A، B و C و ویروس سویهٔ واکسینال (شاخص) به‌منظور تازه‌سازی به روش کشت در تخم‌مرغ جنین‌دار SPF پاساژ داده شد. مؤسسه رازی سرم پلی‌کلنال علیه ویروس سویهٔ واکسینال آنفلوانزای طیور H9N2 جدایهٔ اولیه (۱۳۷۷) را فراهم کرد. به‌وسیلهٔ آنتی‌ژن‌های تازه‌شده و سرم پلی‌کلنال، آزمایش ویژهٔ سنجش مهار هماگلوتیناسیون انجام و میزان خنثی شدن ویروس‌ها در مقابل آنتی‌سرم پلی‌کلنال ارزیابی شد. از سه ویروس جدایه فقط نمونهٔ C در مقایسه با ویروس شاخص پنج گوده اختلاف نشان داد. نتایج جدایه‌های A و B تقریباً مشابه ویروس شاخص بودند. برای اطمینان از صحت نتایج آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج هر ۳ تکرار تقریباً مشابه بود. **نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق صحت کاربردی بودن روش آزمایش ویژهٔ ممانعت از هماگلوتیناسیون را برای شناسایی فنوتیپی جدایه‌های جدید اثبات کرد. توصیه می‌شود آزمایشگاه‌های رفرانس آنفلوانزای طیور کشور از این روش استفاده کنند.

کلمات کلیدی: آنفلوانزای طیور، تست HI، بررسی فنوتیپی، بذر واکسن، ویروس در گردش

مقدمه

بیماری آنفلوانزای طیور یکی از بیماری‌های واگیردار تنفسی ویروسی طیور است که قدرت انتشار سریعی دارد. عامل بیماری ویروسی متعلق به خانوادهٔ اورتومیکسوویروس‌ها و در طیور متعلق به تیپ A ویروس آنفلوانزاست. ازآنجاکه مادهٔ ژنتیکی اسید ریبونوکلئویک (RNA) این ویروس، ۸ قطعه‌ای است، لذا با تغییر زنومی، می‌تواند خاصیت پادگنی خود را تغییر دهد. همان‌طور که بیان شده است گلیکوپروتئین هماگلوتینین (HA) خاصیت پادگنی دارد و در قدرت بیماری‌زایی ویروس آنفلوانزا نقش اصلی را ایفا می‌کند (۱، ۲،۳، ٤، ٥). در ایران بیماری آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 از سال ۱۳۷۷ که در صنعت طیور شناسایی شده و تاکنون خسارات عمده‌ای بر اثر ایجاد و تشدید علائم تنفسی، مرگ‌ومیر، کاهش وزن و افت تولید تخم‌مرغ بر جای گذاشته است. در مقالات فارسی و انگلیسی تغییرات جزئی و نقطه‌ای (دریفت) ژن‌های مختلف ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 گزارش شده است و آنچه باعث حساسیت محققان، به‌ویژه در ایران در سال‌های اخیر بوده است این است که با تغییرات ژنومی احتمالی، خطر انتقال بین‌گونه‌ای از طیور به انسان مقدور بوده و ازطرف‌دیگر تغییرات کشف‌نشدهٔ سویه‌های فیلد می‌تواند باعث شکست واکسیناسیون شود (٦، ۷). اعتقاد بر این است که یکی از مکانیسم‌های پیدایش سویه‌های بسیار بیماری‌زای ویروس آنفلوانزای A، از جمله زیرگروه H5 تغییرات زیاد ژنوتیپی و فنوتیپی است (۸، ۹). محققان آثار فنوتیپی زیادی از تغییرات ژنوتیپی را در مقالات خود گزارش کرده اند. جی. کاتولی[1] بیان کرده شواهدی از دریفت آنتی‌ژنی وجود دارد که موجب جایگزینی اسید آمینه در اطراف گلیکوپروتئین هماگلوتینین (HA RBS) و کاهش عیار آنتی‌بادی در آزمایش مهار هماگلوتیناسیون (HI) شده است (۱۰، ۱۱). ویروس جدایهٔ انسانی در سال ۲۰۱۸، A/Anhui-Lujiang/39/2018، نشان داد که سویهٔ فوق قدرت تکثیر بالا و شکست سد بین‌گونه‌ای و همچنین پتانسیل ایجاد هم گیری در انسان را دارد (۱۲). توماس پی. پیکاک[2] با تحلیل نتایج آزمایش مهار هماگلوتینین پروتئین H1 و تغییرات آن نشان داد برای تهیهٔ واکسن علیه آنفلوانزای H9N2 پرندگان باید مطالعات زیادی انجام شود. این گزارش نشان می‌دهد که انتقال تنفسی آئروسل منحصر به زیرگروه‌های آنفلوانزای H1، H2 و H3 انسانی نیست و می‌تواند در سایر سویه‌ها، از جمله H9N2 اتفاق بیفتد (۱۳). بنا بر موتاسیون‌ها و دریفت‌های مکرر گلیکوپروتئین هماگلوتینین (HA) ویروسی، واکسن‌های آنفلوانزای پرندگان در طول زمان کارایی خود را از دست می‌دهند، ازاین‌رو، محققان استفادهٔ گسترده از واکسن‌های طیور را عامل ایجاد دریفت آنتی‌ژنی دانسته و با تلقیح مکرر واکسن مخالف‌اند (١٤، ١٥، ١٦، ١٧، ١٨). در ایران در سال‌های اخیر محققان متعدد جدایه‌های ویروس آنفلوانزای H9N2 طیور را بررسی کرده‌اند (۲، ۱۹، ٦، ۰۲). بیماری آنفلوانزای طیور در دنیا اهمیت بسیار زیادی دارد، ازاین‌رو، کمیته‌ای متشکل از متخصصان آنفلوانزا از سازمان‌های جهانی، از جمله سازمان جهانی بهداشت (WHO)، سازمان کشاورزی (FAO) و سازمان جهانی بهداشت دامی (OIE) گردهمایی‌ای برگزار کردند و دستورالعمل بررسی و پیگیری واکسن و نحوهٔ برخورد با بیماری را در سال ۲۰۱۰ در مجله *آنفلوانزا* به چاپ رساندند (۲۱). تأثیر بعدی تغییرات ژنوتیپی و فنوتیپی ویروس آنفلوانزا در چالش بی‌اثری، بی‌کیفیتی و ناکارآمدی واکسن‌های آنفلوانزا خود را نشان می‌دهد. در این مقاله نتایج بررسی فنوتیپی جدایه‌های سال‌های اخیر ویروس آنفلوانزای طیور که در آن‌ها تغییرات موتاسیونی نقطه‌ای ژنوم اثبات شده، ارائه می‌شود و در پی آن روشی کم‌هزینه برای تشخیص سریع جدایه‌های جدید آنفلوانزای طیور ارائه خواهد شد.

روش‌ها

۱- تازه‌سازی ویروس

جدایه‌های ویروس آنفلوانزا در بافرفسفات (PBS) رقیق شدند و هرکدام در چند تخم‌مرغ SPF جنین‌دار ده‌روزه کشت داده شد. مایع کوریوآلانتوئیک تخم‌مرغ‌ها برای وجود ویروس آنفلوانزا با آزمایش هماگلوتیناسیون سریع بررسی و موارد مثبت، جمع‌آوری ومستقیماً در آزمایش استفاده شدند (۲۲).

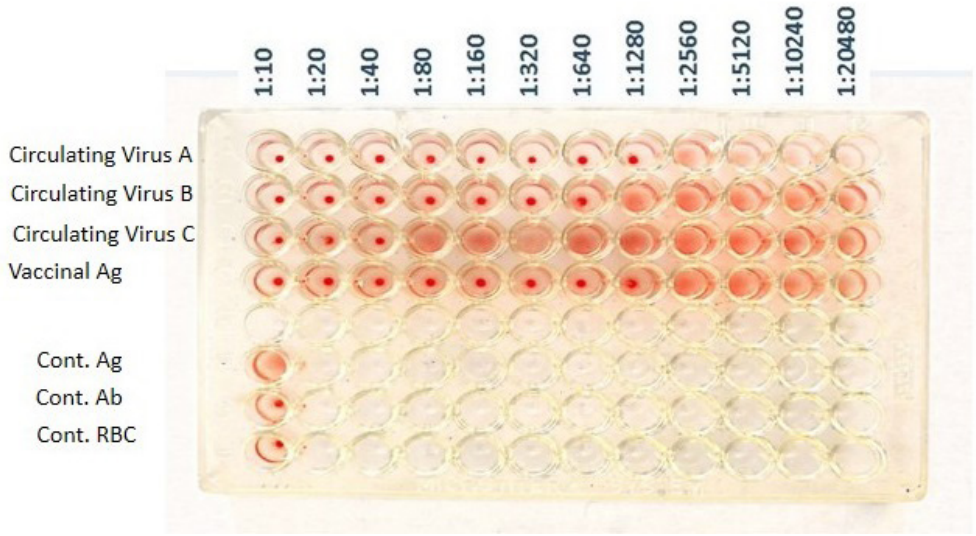
۲- آماده‌سازی آنتی‌سرم پلی‌والان

ویروس آنفلوانزای سویهٔ واکسینال به جوجه‌های SPF تلقیح و پس از ۲۱ روز، آنتی‌سرم‌های پلی‌والان جداشده از خون در آزمایش استفاده شد.

۳- آزمایش سنجش مهار هماگلوتیناسیون HI

به‌منظور انجام آزمایش سنجش مهار هماگلوتیناسیون ویژه (HI) با روش میکرو از پلیت ۹٦ گوده Uشکل و آنتی‌ژن ٤ واحدی (۲۳) و همچنین گلبول‌های قرمز ۱/٥ درصد طیور استفاده شد و برای اطمینان بیشتر از نتایج، سه تکرار برای هر آزمایش صورت گرفت

1 G. Cattoli
2 Thomas P. Peacock



شکل ۱- نتایج آزمایش IH ویروس‌های آنفلوانزای واکسینال و جدایه‌ها

(۷، ۸، ۲۲، ۴۲، ۵۲).

نتایج

اختلاف نتایج سنجش مهار هماگلوتیناسیون (HI) بین سه جدایهٔ جدید ویروس آنفلوانزای H9N2 در مقایسه با ویروس سویهٔ واکسینال به‌عنوان نمونهٔ مثبت بررسی شد. ویروس سویهٔ واکسینال دارای عیار HA1024 (log2=10) بود.

در این تحقیق ویروس اولیهٔ آنفلوانزای جداشده از فیلد که بعداً با آن واکسن تهیه شد، به‌عنوان ویروس شاخص در نظر گرفته شد. بدیهی است که تغییرات فنوتیپی جدایه‌های جدید در مقایسه با ویروس شاخص ارزیابی شد. ویروس اولیه در آزمایش ویژهٔ مهار هماگلوتیناسیون در مقابل آنتی‌سرم پلی‌کلنال مؤسسه رازی (حاصل از واکسیناسیون مرغان SPF با واکسن غیرفعال آنفلوانزا تحت تیپ H9N2) تا گودهٔ هشتم (۱/۱۲۸۰) عیار داشته و جواب مثبت نشان داد (شمای ۱).

ویروس آنفلوانزای جدایهٔ اول (A) در آزمایش ویژهٔ مهار هماگلوتیناسیون در مقابل آنتی‌سرم پلی‌کلنال مؤسسه رازی تا گودهٔ هشتم (عیار ۱/۱۲۸۰) جواب مثبت داشت (٦) (شمای ۱).

آنتی‌سرم پلی‌کلنال مؤسسه رازی در آزمایش ویژهٔ مهار هماگلوتیناسیون در مقابل ویروس آنفلوانزای جدایهٔ دوم (B) توانست تا گودهٔ هفتم (۱/٦٤٠) ویروس را غیرفعال کند و شکل دکمه را نشان دهد (۰۲) (شمای ۱).

آنتی‌سرم پلی‌کلنال مؤسسه رازی در آزمایش ویژهٔ مهار هماگلوتیناسیون علیه ویروس جدایهٔ (**C**) تا گودهٔ سوم (۱/٤٠) توانست ویروس مورد نظر را غیرفعال کند و حالت دکمه را نشان دهد.

مقایسهٔ نتایج آزمایش ویژهٔ مهار هماگلوتیناسیون بین ویروس شاخص با ویروس **C** چهار گوده و با جدایهٔ **A** بدون اختلاف و با سویهٔ **B** یک گوده اختلاف دیده شد (۱۹) (شکل ۱).

بحث

تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزای طیور براساس توانایی آن‌ها در ایجاد بیماری به دو گروه آنفلوانزای پرندگان کم‌حدت (LPAI) و پرحدت (HPAI) تقسیم شده‌اند (٦٢)، که.ویروس‌های H9N2 در گروه ویروس‌های کم‌حدت قرار دارند و در اواسط دههٔ ۱۹۸۰ در چندین گونه پرندگان در آسیا، خاورمیانه، آفریقا و اروپا پانزئوتیک شده و انتقال آن به انسان نیز گزارش شده است (۲۷). بروز و شیوع ویروس H9N2 در طیور به‌طور مستمر اتفاق می‌افتد (۸، ۲۳، ۲۸) و همان‌طور که واضح است اتصال، ورود و تکثیر ویروس به سلول هدف از طریق رسپتور سطح سلول، علاوه‌براینکه به گلیکوپروتئین هماگلوتینین (HA) وابسته است، به دیگر گلیکوپروتئین‌های ویروسی، به‌خصوص گلیکوپروتئین نورآمینیداز (NA) بستگی دارد و گفته شده است تمایل اتصال به گیرندهٔ سطح سلولی با تغییرات در طول ساقهٔ گلیکوپروتئین NA و فعالیت سیالیداز تغییر می‌کند (۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳٤، ۳۵). آلودگی گستردهٔ طیور به ویروس سویهٔ H9N2 احتمال جهش و بازآرایی را افزایش می‌دهد و به همین علت دانشمندان احتمال شکست سد بین‌گونه‌ای را خطر باالقوه بزرگی

برای سویهٔ H9N2 می‌دانند (۳۶). الکساندر در ۲۰۰۷ گزارش کرده که برخی از تحت تیپ‌ها مثل H5، H7 و H9 نیز از سد گونه‌ای عبور کرده و باعث بروز بیماری یا عفونت‌های تحت بالینی در انسان و دیگر پستانداران شده‌اند (۳۷). در تحقیقی دیگر با بررسی ژنوم ویروس، مکانیسم فرار از آنتی‌بادی اثبات شده است (۱۱، ۲٤، ۲۵، ۳۸، ۳۹، ٤۰). به‌علت اهمیت تغییرات ژنومی و متعاقباً تغییرات احتمالی فنوتیپی و نهایتاً خطر انتقال بین‌گونه‌ای ویروس آنفلوانزای طیور، علاوه‌بر محققان خارجی، محققان ایرانی هم مقالات متعددی در بررسی ژنومی و فیلوژنی ویروس‌های آنفلوانزای طیور H9N2 در ایران نوشته‌اند. مسعود سلطانی با بررسی نوکلئوتیدهای ژن نوکلئوپروتئین هماگلوتینین نتیجه گرفته هیچ‌گونه حذف یا اضافه در ژن نوکلئوپروتئین ویروس‌های مورد مطالعه در مقایسه با ویروس A/turkey/winconsin/66 که پروتوتیپ ویروس‌های H9N2 است, مشاهده نمی‌شود، ولی جدایه‌های این مطالعه چندین جهش نقطه‌ای را در طول این ژن نشان می‌دهند. او معتقد است در طول سال‌های شیوع ویروس آنفلوانزا ژن نوکلئوپروتئین ویروس‌های آنفلوانزای (H9N2) کشور به‌خوبی با واکسیناسیونحفظ شده و تغییرات ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 کشور احتمالاً در اثر تجمع جهش‌های نقطه‌ای رخ داده است (۲، ٦، ١٤، ١٩، ۲۰). همین محقق در مقاله‌ای در سال ۱۳۹۱ بیان کرده که طی سال‌های اخیر ویروس‌های (H9N2) متحمل بازآرایی ژنتیکی شده‌اند و حاصل آن، حضور ژنوتیپ‌های جدید در ایران است. با توجه به همه‌گیری مداوم گله‌های طیور به ویروس آنفلوانزا H9N2 و پاسازهای متعدد ناخواستهٔ ویروس در گردش و احتمال عبور از سد بین‌گونه‌ای لازم است برای بررسی اثر یا اثرات تغییرات ژنومی، تغییرات فنوتیپی پیگیری شود. با اینکه بررسی تغییر فنوتیپی ویروس آنفلوانزا با استفاده از آزمایش ویژه سنجش مهار هماگلوتیناسیون (HI) هزینهٔ بسیار کمی دارد و در سراسر دنیا ساری و جاری است (۸، ۱۲، ۲٤، ٤۱، ٤۲، ٤۳، ٤٤) و آزمایشگاه‌های مرجع آنفلوانزای انسانی در اولین سنجش خود از تست مذکور برای مقایسهٔ ویروس‌های در حال گردش با ویروس‌های جدایه‌های قبلی (شاخص) استفاده می‌کنند. متأسفانه این امر در مورد سویه‌های جدید آنفلوانزای طیور در کشور به کار گرفته نشده است و در این تحقیق نخستین بار است که گزارش می‌شود. همان‌طور که مشخص است انجام این آزمایش زمان کوتاهی نیاز دارد و نتیجهٔ آن در انتخاب ویروس آنفلوانزا در ساخت واکسن آنفلوانزا کاربرد مؤثری می‌تواند داشته باشد. برای چگونگی ارزیابی نتایج آزمایش ویژهٔ سنجش مهار هماگلوتیناسیون و مشخص کردن تفاوت فنوتیپی، عموماً گفته شده اگر نتیجهٔ آزمایش ویژهٔ مهار هماگلوتیناسیون جدایه ویروسی جدید کمتر از سه گوده با نتیجهٔ ویروس شاخص اختلاف داشته باشد، این را از نظر فنوتیپی مشابه یا «شبیه» ویروس شاخص در نظر می‌گیرند. وجود اختلاف بیش از سه گوده بین نتیجهٔ جدایهٔ جدید و ویروس شاخص، نشان‌دهندهٔ تغییر فنوتیپی بوده و ویروس جداشده جدید است. گفتنی است آزمایشگاه‌های مرجع ویروس آنفلوانزای فصلی انسانی بسیار سختگیرانه‌تر برخورد می‌کنند و اختلاف دو گوده و بیشتر را نشانهٔ تغییر فنوتیپی و جدایهٔ جدید می‌دانند. ولی با توجه به تجربیات فعلی می‌توان جدایهٔ جدید ویروس آنفلوانزای طیور را با اختلاف سه گوده و بیشتر با ویروس شاخص را ملاک تغییرات فنوتیپی ویروس در نظر گرفت و جدید بودن آن را اعلام کرد (۲۳، ۲٤، ۲۵، ٤۰).

مقالات و مطالعات توالی‌یابی و فیلوژنیک حاکی از تغییرات ژنوتیپی دو جدایهٔ A و B است، ولی نتایج آزمایش ویژهٔ سنجش مهار هماگلوتیناسیون عدم تغییر فنوتیپی را مشخص کرد. بررسی تغییرات ژنوتیپی ویروس C را محققان در مقالات گزارش کرده بودند و نهایتاً با بررسی نتایج تحقیق انجام‌شده این تغییرات در فنوتیپ تأثیر گذاشت و در آزمایش مورد نظر اختلاف بیش از ٤ گوده را با ویروس شاخص نشان داد. می‌توان گفت که تغییرات ژنوتیپی ویروس آنفلوانزا در طبیعت به‌طور متعدد اتفاق می‌افتد، ولی همهٔ آن‌ها باعث تغییر فنوتیپی نمی‌شوند. ازاین‌رو، به‌علت گران‌قیمت بودن آزمایش‌های مولکولی که عمدتاً وابسته به مواد اولیه و آزمایشگاه‌های خارج از کشور است، برای کشف تغییرات ژنومی در قدم اول بهتر است از آزمایش ارزان‌قیمت سنجش مهار هماگلوتیناسیون کمک گرفت و پس از اثبات تغییر فنوتیپی، در صورت لزوم آزمایش‌های تکمیلی مولکولار انجام شود.

منابع

1-Aghahossein Fanni a., Barin A., Moosakhani F., Ghalyanchi Langeroudi A.. Genetical evaluation of resistance to amantadine in h9n2 avian influenza virus in iran between 1998 to 2009. Veterinary Clinical Pathology (veterinary Journal Tabriz) 2012;5(4 (20)):1387-1395

2-Kraidi QA, Madadgar O, Ghalyanchi Langeroudi A, Molecular investigation of hemagglutinin and

neuraminidase genes under type H9N2 of avian influenza virus isolated from meat poultry in southern Iraq, (2016) Faculty of Veterinary Medicine Library registration number: 694 T, (Central Library-Information Hall no. Registration: 78621).

3-Schmidtke M, Zell R, Bauer K, Krumbholz A, Schrader C, Suess J, Wutzler P. Amantadine resistance among porcine H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2001. Intervirology. 2006; 49:286-293.

4-Koel BF, et al., Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution. Science. 2013;342 (6161) 976–979.

5-TimofeevaT. A., Sadykova G. K., Rudneva I. A., Boravleva E. Y., Gambaryan A. S., Lomakina N. F., et al., Changes in the phenotypic properties of highly pathogenic influenza A virus of H5N1 subtype induced by N186I and N186T point mutations in hemagglutinin, Molecular Biology, 2016; 50,755–761.

6-Soltani, M., A. H. Shoushtari, R. Goodarzi, and H. Vosoghi. "Sequence and phylogenetic analysis of (PB1) gene in Iranian H9N2 avian influenza viruses." (2012): 337-344.

7-Webster R., Cox N., and Stöhr K. 2002. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance, 2nd ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

8-Fouchier RAM, Smith DJ, Use of antigenic cartography in vaccine seed strain selection, Avian diseases, 2010; 54, 220-3. doi: 10.1637/8740-032509

9- Mitnaul L.J., Matrosovich M.N., Castrucci MR, Tuzikov AB, Bovin NV, Kobasa D, et al., Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. J Virol. 2000;74: 6015–20

10-Cattoli G, Milani A, Temperton N, Zecchin B, Buratin A, Molesti E, et al. Antigenic drift in H5N1 avian influenza virus in poultry is driven by mutations in major antigenic sites of the hemagglutinin molecule analogous to those for human influenza virus. J Virol. 2011;85,8718–24.

11- Sun Y, Tan Y, Wei K, Sun H, Shi Y, Pu J, et al. Amino acid 316 of hemagglutinin and the neuraminidase stalk length influence virulence of H9N2 influenza virus in chickens and mice. J Virol. 2013; 87(5):2963 –8

12-Sorrell EM, Wan H, Araya Y, Song H, Perez DR. Minimal Molecular Constraints for Respiratory Droplet Transmission of an Avian-Human H9N2 Influenza A Virus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2009; 106(18) 7565-7570