

Original Article

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

Masoud Moghaddam Pour^{1*}, Abdulhamid Shushtri², Shahin Masoudi¹, Morteza Taghizadeh Tarnabi³, Mahdieh Jafari⁴

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

Received: 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



Authors retain the copyright and full publishing rights.

Published by [Razi Vaccine & Serum Research Institute](#) This article is an open access article licensed under the [Creative Commons Attribution 4.0 International \(CC BY 4.0\)](#)

بررسی فنوتیپی ویروس های در گردش آنفلوآنزای طیور به وسیله آزمایش مهار هماگلوتیناسیون ویژه

مسعود مقدم پور^{۱*}، عبدالحمید شوشتری^۲، شهین مسعودی^۱، مرتضی تقی زاده طرنابی^۳، مهدیه جعفری^۴

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.

۴- بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور، تهران، ایران.



تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳-۰۴-۲۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲-۱۰-۰۲

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴-۰۴-۰۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳-۰۴-۱۹

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

چکیده

مقدمه: محققان جدایه های جدید ویروس آنفلوآنزای در گردش را ثبت می کنند. **هدف:** اثبات جدید بودن عملکرد فنوتیپ ویروس در برابر آنتی سرم استاندارد با آزمایش HI ویژه قابل بررسی است. اگر آنتی سرم استاندارد نتواند ویروس جدید را به طور کامل خنثی کند، یعنی تغییرات ژنوتیپی به حدی زیاد است که باعث تغییر فنوتیپ شده است. **روش کار:** در تحقیقی روش شناسایی فنوتیپی سویه های (H9N2) جدید آنفلوآنزا نخستین بار در ایران طبق دستورالعمل مرکز CDC انجام شد. سه ویروس جدایه آنفلوآنزای طیور (سویه H9N2) به نام های A، B و C و ویروس سویه واکسینال (شاخص) به منظور تازه سازی به روش کشت در تخم مرغ جنین دار SPF پاساژ داده شد. مؤسسه رازی سرم پلی کلنال علیه ویروس سویه واکسینال آنفلوآنزای طیور H9N2 جدایه اولیه (۱۳۷۷) را فراهم کرد. به وسیله آنتی ژن های تازه شده و سرم پلی کلنال، آزمایش ویژه سنجش مهار هماگلوتیناسیون انجام و میزان خنثی شدن ویروس ها در مقابل آنتی سرم پلی کلنال ارزیابی شد. از سه ویروس جدایه فقط نمونه C در مقایسه با ویروس شاخص پنج گوده اختلاف نشان داد. نتایج جدایه های 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. **نتیجه گیری:** نتایج این تحقیق صحت کاربردی بودن روش آزمایش ویژه ممانعت از هماگلوتیناسیون را برای شناسایی فنوتیپی جدایه های جدید اثبات کرد. توصیه می شود آزمایشگاه های رفرنس آنفلوآنزای طیور کشور از این روش استفاده کنند.

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

مقدمه

بیماری آنفلوآنزای طیور یکی از بیماری‌های واگیردار تنفسی ویروسی طیور است که قدرت انتشار سریعی دارد. عامل بیماری ویروسی متعلق به خانواده اورتومیکسوویروس‌ها و در طیور متعلق به تیپ A ویروس آنفلوآنزاست. از آنجاکه ماده ژنتیکی اسید ریبونوکلوئیک (RNA) این ویروس، ۸ قطعه‌ای است، لذا با تغییر ژنومی، می‌تواند خاصیت پادگنی خود را تغییر دهد. همان‌طور که بیان شده است گلیکوپروتئین هم‌اگلوتینین (HA) خاصیت پادگنی دارد و در قدرت بیماری‌زایی ویروس آنفلوآنزا نقش اصلی را ایفا می‌کند (۱، ۲، ۳، ۴، ۵). در ایران بیماری آنفلوآنزا 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 (دریافت) ژن‌های مختلف ویروس آنفلوآنزای 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 از طرف دیگر تغییرات کشف‌نشده سویه‌های فیلد می‌تواند باعث شکست واکسیناسیون شود (۶، ۷). اعتقاد بر این است که یکی از مکانیسم‌های پیدایش سویه‌های بسیار بیماری‌زای ویروس آنفلوآنزای 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^۱ بیان کرده شواهدی از دریافت 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 جدایه انسانی در سال ۲۰۱۸، A/Anhui-Lujiang/39/2018، نشان داد که سویه فوق قدرت تکثیر بالا و شکست سد بین‌گونه‌ای و همچنین پتانسیل ایجاد هم‌گیری در انسان را دارد (۱۲). توماس پی. پیکاک^۲ با تحلیل نتایج آزمایش مهار هم‌اگلوتینین پروتئین H1 و تغییرات آن نشان داد برای تهیه واکسن علیه آنفلوآنزای H9N2 پرندگان باید مطالعات زیادی انجام شود. این گزارش نشان می‌دهد که انتقال تنفسی آئروسول منحصراً به زیرگروه‌های آنفلوآنزای H1، H2 و H3 انسانی نیست و می‌تواند در سایر سویه‌ها، از جمله

1 G. Cattoli
2 Thomas P. Peacock

H9N2 اتفاق بیفتد (۱۳). بنا بر موتاسیون‌ها و دریافت‌های مکرر گلیکوپروتئین هم‌اگلوتینین (HA) ویروسی، واکسن‌های آنفلوآنزای پرندگان در طول زمان کارایی خود را از دست می‌دهند، از این‌رو، محققان استفاده گسترده از واکسن‌های طیور را عامل ایجاد دریافت آنتی‌ژنی دانسته و با تلقیح مکرر واکسن مخالف‌اند (۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸). در ایران در سال‌های اخیر محققان متعدد جدایه‌های ویروس آنفلوآنزای H9N2 طیور را بررسی کرده‌اند (۲، ۱۹، ۶، ۲۰). بیماری آنفلوآنزای طیور در دنیا اهمیت بسیار زیادی دارد، از این‌رو، کمیته‌ای متشکل از متخصصان آنفلوآنزا از سازمان‌های جهانی، از جمله سازمان جهانی بهداشت (WHO)، سازمان کشاورزی (FAO) و سازمان جهانی بهداشت دامی (OIE) گرد همایی‌ای برگزار کردند و دستورالعمل بررسی و پیگیری واکسن و نحوه برخورد با بیماری را در سال ۲۰۱۰ در مجله *آنفلوآنزا* به چاپ رساندند (۲۱). تأثیر بعدی تغییرات ژنوتیپی و فنوتیپی ویروس آنفلوآنزا در چالش بی‌اثری، بی‌کیفیتی و ناکارآمدی واکسن‌های آنفلوآنزا خود را نشان می‌دهد. در این مقاله نتایج بررسی فنوتیپی جدایه‌های سال‌های اخیر ویروس آنفلوآنزای طیور که در آن‌ها تغییرات موتاسیونی نقطه‌ای ژنوم اثبات شده، ارائه می‌شود و در پی آن روشی کم‌هزینه برای تشخیص سریع جدایه‌های جدید آنفلوآنزای طیور ارائه خواهد شد.

روش‌ها

۱- تازه‌سازی ویروس

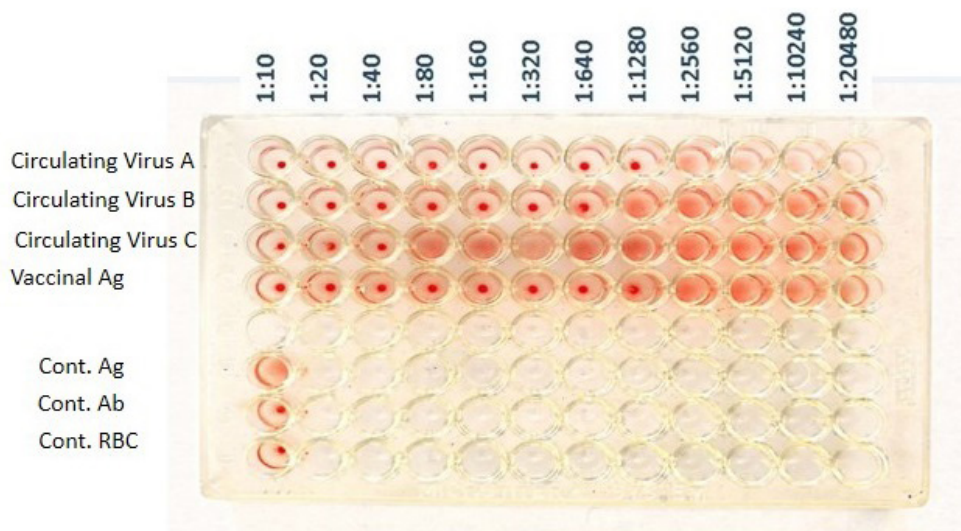
جدایه‌های ویروس آنفلوآنزا در بافر فسفات (PBS) رقیق شدند و هرکدام در چند تخم‌مرغ SPF جنین‌دار ده‌روزه کشت داده شد. مایع کوریوآلتوئیک تخم‌مرغ‌ها برای وجود ویروس آنفلوآنزا با آزمایش هم‌اگلوتیناسیون سریع بررسی و موارد مثبت، جمع‌آوری و مستقیماً در آزمایش استفاده شدند (۲۲).

۲- آماده‌سازی آنتی‌سرم پلی‌والان

ویروس آنفلوآنزای سویه واکسینال به جوجه‌های SPF تلقیح و پس از ۲۱ روز، آنتی‌سرم‌های پلی‌والان جدا شده 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 ۹۶ گوده U شکل و آنتی‌ژن ۴ واحدی (۲۳) و همچنین گلوبول‌های قرمز ۱/۵ درصد طیور استفاده شد و برای اطمینان بیشتر از نتایج، سه تکرار برای هر آزمایش صورت گرفت



شکل ۱- نتایج آزمایش IH ویروس‌های آنفلوآنزای واکسینال و جدایه‌ها

علیه ویروس جدایه (C) تا گوده سوم ($1/40$) توانست ویروس مورد نظر را غیرفعال کند و حالت دکمه را نشان دهد. (۷، ۸، ۲۲، ۴۲، ۵۲).

مقایسه نتایج آزمایش ویژه مهار هم‌آگلوتیناسیون بین ویروس شاخص با ویروس C چهار گوده و با جدایه A بدون اختلاف و با سویه B یک گوده اختلاف دیده شد (۱۹) (شکل ۱).

نتایج

اختلاف نتایج سنجش مهار هم‌آگلوتیناسیون (HI) بین سه جدایه جدید ویروس آنفلوآنزای H9N2 در مقایسه با ویروس سویه واکسینال به عنوان نمونه مثبت بررسی شد. ویروس سویه واکسینال دارای عیار HA_{1024} ($\log_2=10$) بود.

در این تحقیق ویروس اولیه آنفلوآنزای جدا شده از فیلد که بعداً با آن واکسن تهیه شد، به عنوان ویروس شاخص در نظر گرفته شد. بدیهی است که تغییرات فنوتیپی جدایه‌های جدید در مقایسه با ویروس شاخص ارزیابی شد. ویروس اولیه در آزمایش ویژه مهار هم‌آگلوتیناسیون در مقابل آنتی سرم پلی کلنال مؤسسه رازی (حاصل از واکسیناسیون مرغان SPF با واکسن غیرفعال آنفلوآنزا تحت تیپ H9N2) تا گوده هشتم ($1/1280$) عیار داشته و جواب مثبت نشان داد (شمای ۱).

ویروس آنفلوآنزای جدایه اول (A) در آزمایش ویژه مهار هم‌آگلوتیناسیون در مقابل آنتی سرم پلی کلنال مؤسسه رازی تا گوده هشتم (عیار $1/1280$) جواب مثبت داشت (۶) (شمای ۱).

آنتی سرم پلی کلنال مؤسسه رازی در آزمایش ویژه مهار هم‌آگلوتیناسیون در مقابل ویروس آنفلوآنزای جدایه دوم (B) توانست تا گوده هفتم ($1/640$) ویروس را غیرفعال کند و شکل دکمه را نشان دهد (۰۲) (شمای ۱).

آنتی سرم پلی کلنال مؤسسه رازی در آزمایش ویژه مهار هم‌آگلوتیناسیون

بحث

تحت تیپ‌های ویروس آنفلوآنزای طیور براساس توانایی آن‌ها در ایجاد بیماری به دو گروه آنفلوآنزای پرندگان کم‌حدت (LPAI) و پرحدت (HPAI) تقسیم شده‌اند (۶۲)، که ویروس‌های H9N2 در گروه ویروس‌های کم‌حدت قرار دارند و در اواسط دهه 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 به طور مستمر اتفاق می‌افتد (۸، ۲۳، ۲۸) و همان‌طور که واضح است اتصال، ورود و تکثیر ویروس به سلول هدف از طریق رسپتور سطح سلول، علاوه بر اینکه به گلیکوپروتئین هم‌آگلوتینین (HA) وابسته است، به دیگر گلیکوپروتئین‌های ویروسی، به خصوص گلیکوپروتئین نورآمینیداز (NA) بستگی دارد و گفته شده است تمایل اتصال به گیرنده سطح سلولی با تغییرات در طول ساقه گلیکوپروتئین NA و فعالیت سیالیداز تغییر می‌کند (۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۴، ۳۵). آلودگی گسترده طیور به ویروس سویه H9N2 احتمال جهش و بازآرایی را افزایش می‌دهد و به همین علت دانشمندان احتمال شکست سد بین‌گونه‌ای را خطر بالقوه بزرگی

هماگلوتیناسیون و مشخص کردن تفاوت فنوتیپی، عموماً گفته شده اگر نتیجه آزمایش ویژه مهار هماگلوتیناسیون جدایه ویروسی جدید کمتر از سه گوده با نتیجه 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 نتیجه جدایه جدید و ویروس شاخص، نشانه‌دهنده تغییر فنوتیپی بوده و ویروس جدا شده جدید است. گفتنی است آزمایشگاه‌های مرجع ویروس آنفلوآنزای فصلی انسانی بسیار سختگیرانه‌تر برخورد می‌کنند و اختلاف دو گوده و بیشتر را نشانه تغییر فنوتیپی و جدایه جدید می‌دانند. ولی با توجه به تجربیات فعلی می‌توان جدایه جدید ویروس آنفلوآنزای 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، ۲۴، ۲۵، ۴۰).

مقالات و مطالعات توالی‌یابی و فیلوژنیک حاکی از تغییرات ژنوتیپی دو جدایه A و B است، ولی نتایج آزمایش ویژه 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 ۴ گوده را با ویروس شاخص نشان داد. می‌توان گفت که تغییرات ژنوتیپی ویروس آنفلوآنزا در طبیعت به‌طور متعدد اتفاق می‌افتد، ولی همه آن‌ها باعث تغییر فنوتیپی نمی‌شوند. از این‌رو، به‌علت گرانی قیمت 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-Aghahosseini 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

برای سویه 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، ۲۴، ۲۵، ۳۸، ۳۹، ۴۰). به‌علت اهمیت تغییرات ژنومی و متعاقباً تغییرات احتمالی فنوتیپی و نهایتاً خطر انتقال بین‌گونه‌ای ویروس آنفلوآنزای طیور، علاوه بر محققان خارجی، محققان ایرانی هم مقالات متعددی در بررسی ژنومی و فیلوژنی ویروس‌های آنفلوآنزای 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 آنفلوآنزا ژن نوکلئوپروتئین ویروس‌های آنفلوآنزای (H9N2) کشور به‌خوبی با واکسیناسیون حفظ شده و تغییرات ویروس‌های آنفلوآنزای H9N2 کشور احتمالاً در اثر تجمع جهش‌های نقطه‌ای رخ داده است (۲، ۶، ۱۴، ۱۹، 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 آنفلوآنزا H9N2 و پاساژهای متعدد ناخواسته 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 آنفلوآنزا با استفاده از آزمایش ویژه سنجش مهار هماگلوتیناسیون (HI) هزینه بسیار کمی دارد و در سراسر دنیا ساری و جاری است (۸، ۱۲، ۲۴، ۴۱، ۴۲، ۴۳، ۴۴) و آزمایشگاه‌های مرجع آنفلوآنزای انسانی در اولین سنجش خود از تست مذکور برای مقایسه ویروس‌های در حال گردش با ویروس‌های جدایه‌های قبلی (شاخص) استفاده می‌کنند. متأسفانه این امر در مورد سویه‌های جدید آنفلوآنزای 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 نتیجه آن در انتخاب ویروس آنفلوآنزا در ساخت واکسن آنفلوآنزا کاربرد مؤثری می‌تواند داشته باشد. برای چگونگی ارزیابی نتایج آزمایش ویژه سنجش مهار

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-Timofeeva T. 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