مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ٤: از ٤٣-٥١
زمستان ۱۳۸۹

بررسی خصوصیات مولکولی و آنالیز فیلوژنیتک ژن نوکلئوپروتئین ویروس آنفولانزای پرندگان (H9N2) ایران

مسعود سلطانی[1*]، عبدالحمید شوشتری[2]، مجید مروتی[3]، محمدحسین قارونی[4]، علی دلیران‌نیا[5]، فرشاد اکبرنژاد[1]

۱- مربی، گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، خوزستان، ایران
۲- استادیار، آزمایشگاه ملی رفرانس آنفلوانزا، موسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
۳- استادیار، گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، خوزستان، ایران
۴- استادیار، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران
۵- مربی، گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، لرستان، ایران

دریافت مقاله: ۸۹/۰۵/۲۶ پذیرش مقاله: ۸۹/۰۸/۱۹

چکیده

هدف: بررسی مولکولی ژن نوکلئوپروتئین در ویروس‌های آنفلوانزای (H9N2) پرندگان و تعیین رابطه ژنتیکی آن با ویروس‌های سایر نقاط ایران و آسیا

مواد و روش‌ها: کل ژن نوکلئوپروتئین در ٤ ویروس از جدایه‌های سال ۱۳۸۷ با روش RT-RCR تکثیر و تعیین توالی شد و برمبنای قطعه قابل تبدیل به پروتئین، درخت فیلوژنتیک رسم شد.

نتایج: بررسی نوکلئوتیدهای ژن نوکلئوپروتئین نشان می‌دهد که هیچ‌گونه حذف یا اضافه شدنی 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 همانند دیگر سویه‌های قبلی ایران چندین جهش نقطه‌ای را در طول این ژن نشان می‌دهند. تشابه ۹٦/۷- ۹۹/٦ درصد بین اسیدهای آمینه ویروس‌های مورد مطالعه وجود دارد. میزان شباهت ژن نوکلئوپروتئین ویروس‌های مورد مطالعه با ویروس‌های H9N2 جدا شده از انسان درهنگ کنگ، برای ویروس A/Hk/2108/2003 ۹۱/۵- ۹۲ درصد و برای ویروس A/HK/1073/99 ۹۱/۹- ۹۲/۳ است. براساس آنالیز فیلوژنیتیک، ژن نوکلئوپروتئین ویروس‌های آنفلوانزای (H9N2) در زیرشاخه ویروس‌های A/Quail/Hong Kong/G1/97 که به‌نظر می‌رسد دهنده شش ژن داخلی به ویروس آنفلوانزای فوق حاد H5N1 است، قرار می‌گیرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد در طول سال‌های شیوع ویروس آنفلوانزا ژن نوکلئوپروتئین ویروس‌های آنفلوانزای (H9N2) کشور به‌خوبی حفظ شده است و تغییرات ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 کشور احتمالاً در اثر تجمع جهش‌های نقطه‌ای، رخ داده است.

کلیدواژگان: آنالیز فیلوژنیتک، ژن نوکلئوپروتئین، آنفولانزای پرندگان H9N2، ایران

۱- مقدمه

آنفلوانزای پرندگان یکی از مهم‌ترین و خطرناک‌ترین بیماری‌های ویروسی است که از سراسر نقاط دنیا گزارش شده است [۱].

ویروس‌های آنفلوانزا تیپ A براساس پروتئین‌های سطحی

*نشانی مکاتبه: خوزستان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، دانشکده کشاورزی، گروه دامپزشکی، کدپستی: ٦٤٥١٧٤١١١٧
Email: soltaniphd@yahoo.com

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

یعنی هماگلوتینین (Hemagglutinin: HA) و نورآمینیداز (Neuraminidase: NA) تقسیم‌بندی می‌شوند، تاکنون ۱۶ زیرمجموعه HA (Subtype) (H1-16) و ۹ زیرمجموعه NA (N1-9) شناسایی شده است [۲] این ویروس‌ها براساس بیماری‌زایی در پرندگان به دو گروه با بیماری‌زایی بالا و بیماری‌زایی کم طبقه‌بندی می‌شوند. سازگاری این ویروس‌ها در پرندگان آبزی، این پرندگان را به‌عنوان مخزن طبیعی این ویروس‌ها معرفی کرده است. این ویروس‌ها می‌توانند با شکستن سد بین‌گونه‌ای و انتقال به پستاندارانی مثل خوک، اسب و انسان باعث انتقال بیماری شوند. از بین این ویروس‌ها، ویروس‌های آنفلوانزای فوق حاد H5 و H7، ویروس‌های با بیماری‌زایی کم H9 به دلیل انتقال مستقیم آن‌ها به انسان و ایجاد پاندمی جدید آنفلوانزا بیشتر مورد توجه هستند. در سال ۱۹۹۹ و به دنبال آن سال ۲۰۰۳ عفونت با ویروس‌های A/Hk/2108/03 (H9N2) و A/HK/1073/99 در انسان رخ داد که از آن زمان، توجه به ویروس H9N2 به‌عنوان یکی از کاندیداهای ایجاد پاندمی جدید بیشتر شد [۳]. در بررسی‌های انجام گرفته مشخص شد که ژن‌های داخلی این ویروس (H9N2) شباهت زیادی به ویروس H5N1 جدا شده از انسان در سال ۱۹۹۷ دارد. ویروس H5N1 که شش ژن داخلی خود را از ویروس H9N2 گرفته در سطح وسیعی از پرندگان آسیا یافت می‌شود و باعث آلودگی ۱۸ نفر و مرگ ٦ نفر شده است [٤]. بررسی درخت فیلوژنتیک (Phylogenetic Tree) ویروس‌های H9N2 نشان دهنده آن است که دو شاخه مختلف از این ویروس‌ها وجود دارد، شاخه اول ویروس‌های H9N2 آمریکایی و شاخه دوم ویروس‌های H9N2 اروپایی آسیایی (شاخه اوراسیای). ویروس‌های شاخه اروسیای را می‌توان به سه زیرشاخه تقسیم کرد. زیرشاخه اول شامل ویروس‌های جدا شده از کشور کره و ژاپن است که نماینده آن ویروس A/chicken/korea/MS96/96 زیرشاخه دوم که نماینده آن ویروس A/Quail/Hong Kong/G1/97 است شامل ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 جدا شده از انسان در هنگ کنگ و ویروس‌های H9N2 جدا شده از کشورهای خاورمیانه و پاکستان است و زیرشاخه سوم شامل ویروس‌های جدا شده از چین (*Beijing*- Like) است که نماینده آن ویروس‌های A/chicken/*Beijing*/1/94 و A/Duck/Hong Kong/Y280/97 است [۵].

زیرمجموعه H9N2 برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ در ایران با نام A/chicken/Iran/259/1998 در بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور مؤسسه رازی و دانشکده دامپزشکی تهران جداسازی و شناسایی شد [٦]. متأسفانه این بیماری به سرعت در کشور گسترش یافت و با وجود برنامه اولیه حذف گله‌های مادر و تخم‌مرغ‌های آلوده جوجه‌کشی و واکسیناسیون با واکسن‌های کشته از آن زمان تاکنون بیماری به شکل آندمیک حضور داشته و خسارات فراوانی را به صنعت طیور کشور وارد ساخته است. از سوی دیگر؛ در سال‌های اخیر با توجه به مثبت شدن آنتی‌بادی ضد H9N2 در کارکنان صنعت طیور، این ویروس توانایی آلوده کردن بافت پوششی (Epithelial) نای انسان را پیدا کرده است و به‌نظر می‌رسد بروز تغییرات در آن در راستای آلوده نمودن انسان است [۷]. با وجود این‌که در طول دهه اخیر گزارش‌های زیادی در مورد خصوصیات مولکولی و آنالیز فیلوژنیتک ژن‌های HA و NA ویروس آنفلوانزا (H9N2) در کشور ارایه شده است [۸-۱۱] اطلاعات اندکی در مورد خصوصیات مولکولی و آنالیز فیلوژنیتک ژن نوکلئوپروتئین (Nucleoprotein: NP) ویروس آنفولانزای پرندگان (H9N2) کشور در دسترس است. این در حالی است که NP جزء مهم‌ترین پروتئین‌های داخلی ویروس آنفولانزا است به‌طوری که یکی از آنتی‌ژن‌های اختصاصی تیپ است و در تشخیص ویروس‌های آنفولانزای A، B، C به‌کار می‌رود. مطالعات نشان می‌دهد پروتئین‌های داخلی مانند NP جزء مهم‌ترین عوامل تعیین کننده طیف میزبانی ویروس‌های آنفولانزای تیپ A هستند بنابراین بررسی مولکولی این ژن کد کننده پروتئین داخلی در ویروس‌های (H9N2) آنفلوانزای پرندگان در راستای تعیین تغییرات ایجاد شده در این ژن و تعیین رابطه آن با ژن‌های ویروس‌های سایر نقاط ایران و

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

جهان لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه

به‌منظور جداسازی ویروس در فاصله زمانی بین تیر تا دی ماه سال ۱۳۸۷، ۵۰۰ نمونه‌های بافتی (نای و ریه) از مرغداری‌های گوشتی به‌دست آمد. مشخصات گله‌هایی که ویروس از آن ها جدا شده است در جدول ۱ آمده است. پس از معاینه بالینی بافت‌های نای و ریه پرندگان مبتلا جدا و به‌صورت منجمد شده به مؤسسه رازی برای آزمایش‌های بعدی ارسال شد.

جدول ۱ مشخصات گله‌هایی که نمونه‌گیری از آن‌ها صورت گرفته است.

نام نمونه	تاریخ معاینه	محل جداسازی	سن گله (روز)	ظرفیت	تعداد تلفات	واکسن H9N2	واکسن برونشیت
A/chicken/Iran/RZ28/2008	۸۷/۵/۵	خرم آباد	۳٤	۱۰۰۰۰	۱۰۰۰	–	+
A/chicken/Iran/RZ37/2008	۸۷/٦/۲۰	بروجرد	٤٤	۱۰۰۰۰	۱۸۰	–	+
A/chicken/Iran/RZ42/2008	۸۷/۷/۲۰	دورود	۲۸	٦۰۰۰	۳۰	–	+
A/chicken/Iran/RZ53/2008	۸۷/۹/۱	خرم آباد	۳۸	۱۲۰۰۰	٦۰	–	+

۲-۲- جداسازی ویروس

ابتدا بافت‌های نای و ریه در زیر هود، برش طولی داده شد و توسط هاون استریل چینی خرد شد و به‌صورت سوسپانسیون در آمد. سپس سوسپانسیون حاصل، توسط سرنگ در لوله اپندروف (Eppendorf) استریل ریخته شد. لوله اپندروف با دور ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی برای تزریق به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار عاری از هرگونه عامل بیماری‌زا (Specific Pathogen Free: SPF) ۱۰ روزه برداشت شد. به هرکدام از تخم‌مرغ‌ها ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول برداشت شده به حفره آلانتوییک (Allantoic Cavity) تزریق شد. تلفات بین ٢٤ تا ٩٦ ساعت پس از تزریق، جمع‌آوری و در یخچال به‌مدت ٦ تا ۱۲ ساعت نگهداری شد. با استفاده از روش هماگلوتیناسیون (Hemagglutination) سریع، وجود ویروس با فعالیت هماگلوتیناسیون در مایع آلانتوییک جمع‌آوری شده از جنین‌های تلف شده تأیید شد. سپس با کمک آزمایش HI (Hemagglutination Inhibition) نوع ویروس دارای فعالیت هماگلوتیناسیون مشخص شد.

۲-۳- استخراج RNA و تکثیر ژنوم با استفاده از RT-PCR

برای جداسازی RNA ویروس از مایع آلانتوییک از کیت (Roche, Germany) High pure viral Nucleic Acid Kit استفاده شد. برای تکثیر ژن NP برمبنای توالی ژن NP موجود در بانک ژن (Gene Bank) گزارش شده از ایران اقدام به طراحی یک جفت آغازگر (Primer) با استفاده از نرم‌افزار (DNASTER Software package Version 5.2) Genrunner شد. آغازگر طراحی شده کل ژن NP را به طول ۱۵٦۰ جفت‌باز تکثیر نمود. RT-PCR با استفاده از کیت Titan one step tube RT- PCR system شرکت Roche آلمان انجام شد. مخلوط RT-PCR در مجموع ۵۰ میکرولیتر بود که حاوی ۱۰ میکرولیتر بافر ۵X، ۱ میکرولیتر آنزیم نسخه‌برداری معکوس، ۲/۵ میکرولیتر ممانعت کننده RNase، ٤ میکرولیتر مخلوط جفت آغازگر، ٤ میکرولیتر RNA ویروسی مورد نظر و ۲۷/۵ میکرولیتر آب عاری از آنزیم‌های مخرب RNA بود.

شرایط دمای RT-PCR برای تکثیر ژن NP عبارت بود از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

٤٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٥ دقیقه برای انجام نسخه‌برداری معکوس (Reverse Transcription)، ٩٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢ دقیقه برای واسرشتگی اولیه (Primary Denaturation) و ٣٥ تکرار از ٩٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١/٥ دقیقه برای واسرشتگی، ٥٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١ دقیقه برای اتصال (Annealing) و ٦٨ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٧ دقیقه برای بسط (Extension) که در نهایت با ٦٨ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٠ دقیقه برای بسط نهایی (Late Extension) پایان یافت و محصول واکنش در ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مشخصات آغازگرهای استفاده شده برای ژن NP شامل:

آغازگر جلویی (Forward primer) (١٥٦٠ جفت‌باز):

5'- CAGTACTGGGCATAAGAC CTG -3'

آغازگر برگشتی (Reverse primer) (١٥٦٠ جفت‌باز):

5'- GCATTGTCTCCGAAGAAATAAG TTT -3'

٢-٤- استخراج و خالص‌سازی محصول RT-PCR

محصول به‌دست آمده RT-PCR با استفاده از کیت (Roche, Germany) High pure product purification با روش برداشت DNA از داخل ژل خالص شد. بدین منظور ابتدا محصول RT-PCR روی ژل آگارز، لود (Load) و در مجاورت نشانگر به‌مدت ١ ساعت الکتروفورز شد.

٢-٥- تعیین توالی نوکلئوتیدی (Sequencing)

تعیین توالی نوکلئوتیدی نمونه‌های ویروسی (٤ نمونه) با استفاده از همان آغازگرهایی که برای تکثیر ژن‌ها استفاده شده بود، با روش کامفورت رید (Comfort Read) انجام شد.

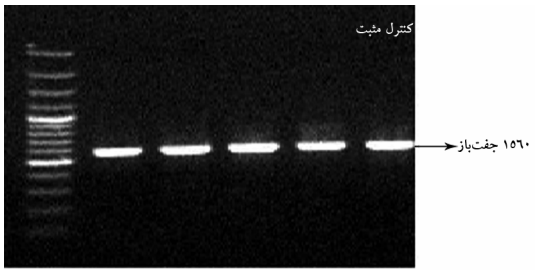
٢-٦- آنالیز فیلوژنتیک

تمام اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی توسط نرم‌افزارهای (DNASTER Sofware package Version 5.2) Editseq ویرایش شد. قطعه قابل ترجمه به پروتئین (Open Reading Frame: ORF) ژن‌های مذکور با استفاده از روش ClustalW با سایر ژن‌های ثبت شده در بانک ژن از ایران، کشورهای منطقه، آسیا و جهان همتراز شد. درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار MegAlin رسم شد.

٣- نتایج

٣-١- محصول RT-PCR

بعد از واکنش RT-PCR و الکتروفورز، محصول باند مورد نظر بدون باند غیراختصاصی ظاهر شد و تشکیل باند در کنترل مثبت و عدم ایجاد باند در کنترل منفی نشانگر صحت واکنش RT-PCR بود (شکل ١).



شکل ١ تصویر مربوط به قطعه ١٥٦٠ جفت‌بازی ژن NP

٣-٢- آنالیز توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای NP

قطعه ١٥٦٠ جفت‌بازی به‌دست آمده شامل کل ژن NP ویروس‌های مورد مطالعه است. با حذف قسمت‌های پیشین و پسین قطعه ORF به‌دست آمده که قطعه‌ای به‌طول ١٤٤١ جفت‌باز است و شامل ٤٦٧ اسید آمینه است.

در بررسی کل نوکلئوتیدهای ژن NP ٤ ویروس مورد مطالعه هیچ‌گونه حذف یا اضافه شدنی در ژن NP مشاهده نمی‌شود ولی سویه‌های مطالعه حاضر همانند دیگر سویه‌های ایران چندین جهش نقطه‌ای را در طول این ژن نشان می‌دهند.

تشابه٩٦/٧- ٩٩/٦ درصد بین اسیدهای آمینه ویروس‌های مورد مطالعه وجود دارد. میزان شباهت ویروس‌های جدا شده در مطالعه با ویروس‌های دیگر مناطق ایران ٩٠/٠- ٩٧/٨ است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

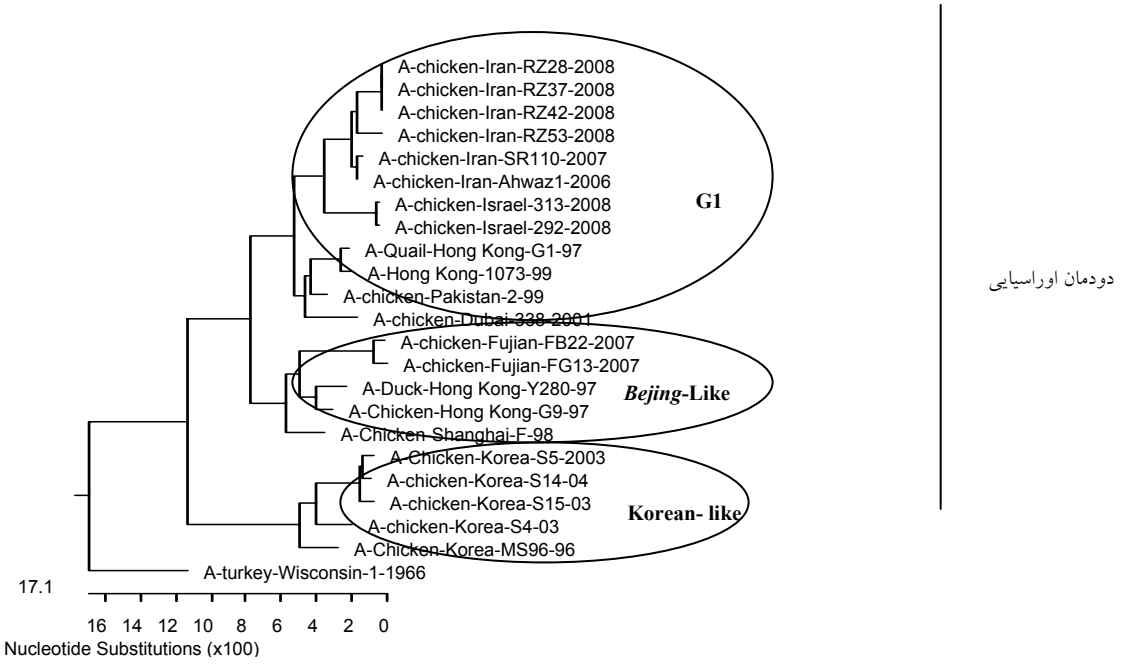
میزان شباهت ژن NP ویروس‌های مورد مطالعه با ویروس‌های H9N2 جدا شده از انسان در هنگ کنگ، برای ویروس A/Hk/2108/2003 ۹۱/۵- ۹۲ و برای ویروس A/HK/1073/99 ۹۱/۹- ۹۲/۳ است.

نتایج مقایسه اسیدهای آمینه ویروس‌های مورد مطالعه با ویروس‌های قبلی ایران و دیگر نقاط جهان نشان می‌دهد که تعداد ۸ اسید آمینه در موقعیت‌های ۱۲ (V to I) ۳٦ (A to T)، ۱۱۲ (M toL) ۲۷۸ (R to k)، ۲۸۳ (N to S)، ۳۳۲ (D to N)، ٤۱۰ (R to k)، ٤۳۵ (H to L)، مخصوص ٤ ویروس مورد مطالعه است. با بررسی ردیف اسیدهای آمینه ویروس‌های جدا شده در ایران مشخص گردید که این ویروس‌های در این جایگاه‌ها با ٤ اسید آمینه اختصاصی ویروس‌های G1 (A/Quail/HongKong/G1/97) و انسانی H9N2 (A/Hong Kong/1074/99) شباهت کامل دارند (جدول ۲).

بررسی درخت فیلوژنتیک ویروس‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که تمام سویه‌های متعلق به ایران به همراه سویه‌های جدا شده در مطالعه حاضر در زیرشاخه ویروس‌های A/Quail/HongKong/G1/97 قرار می‌گیرند (شکل ۲).

جدول ۲ مقایسه جایگاه‌های مشترک آمینواسیدی پروتئین NP ویروس‌های A/Hong Kong/1074/99 و A/Qail/Hong Kong/G1/97 با ویروس‌های جدا شده از ایران و دیگر جدایه‌های H9N2

ویروس	۵۲	۳۷۱	۳۷۳	٤۳۰
A/Hong kong/1074/99	Q	V	A	K
A/Qail/Hong kong/G1/97	Q	V	A	K
A/chicken/pakestan /2/99	Q	V	A	K
A/chicken/Iran/RZ28/2008	Q	V	A	K
A/chicken/Iran/RZ37/2008	Q	V	A	K
A/chicken/Iran/RZ42/2008	Q	V	A	K
A/chicken/Iran/RZ53/2008	Q	V	A	K
A/chicken/Iran-Ahwaz-1/2006	Q	V	A	K
A/chicken/Dubai /338/01	Q	V	A	K
A/Duck/Hong kong/Y280/97	Y	M	T	T
A/chicken/korea/MS96/96	Y	M	T	T



شکل ۲ برحسب آنالیز فیلوژنیتیک ژن NP، تمام سویه‌های ایرانی در دودمان A/Quail/HongKong/G1/97 قرار می‌گیرند.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

٤- بحث

نتایج مطالعه حاضر که به بررسی خصوصیات مولکولی و آنالیز فیلوژنیتک ژن NP ویروس آنفلوانزا (H9N2) کشور پرداخته، نشان می‌دهد ویروس‌های ایران براساس ژن NP در گروه مشترک با ویروس A/Quail/HongKong/G1/97 که به‌نظر می‌رسد دهنده شش ژن داخلی به ویروس آنفلوانزای فوق حاد H5N1 است و ویروس‌های A/ H9N2 HongKong /1073/99 و A/ HongKong /1074/99 که از آلودگی انسان جدا شده اند، قرار می‌گیرند. مطالعات مشابه دیگری نیز در سایر نقاط جهان به‌منظور بررسی خصوصیات مولکولی و آنالیز فیلوژنیتک ژن NP ویروس آنفلوانزا انجام گرفته که نتایج آن‌ها با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه در بسیاری از موارد مطابقت دارد. در بررسی امیر (Amir) و همکاران (۲۰۰۷) روی ویروس‌های H9N2 جدا شده از پرندگان کشورهای امارات، ایران، پاکستان مشخص شد که این ویروس‌ها با ویروس آلوده کننده انسان در هنگ کنگ رابطه نزدیکی داشتند [۱۲]. کامرون (Cameron) و همکاران چهار جایگاه آمینواسیدی را در پروتئین NP به‌عنوان وجه مشترک ویروس‌های H5N1 جدا شده از انسان، ویروس A/Quail/HongKong/G1/97، ویروس‌های H9N2 جدا شده از انسان در هنگ کنگ و ویروس A/chicken/pakistan/2/99 پاکستان مشخص کردند که در دیگر ویروس‌های H9N2 وجود نداشت. این چهار جایگاه آمینواسیدی در ویروس‌های H9N2 امارات هم یافت می‌شود [۱۲، ۱۳] ویروس‌های ایران نیز از نظر جایگاه اختصاصی آمینواسیدی شباهت قابل ملاحظه‌ای با ویروس‌های H9N2 جدا شده از انسان در هنگ کنگ دارند به‌طوری که در تمام جایگاه‌ها کاملاً مشابه ویروس‌های H9N2 جدا شده از انسان، پاکستان و امارات هستند.

برحسب آنالیز فیلوژنتیک، تمام سویه‌های ایرانی در یک دودمان قرار می‌گیرند که این نکته بیانگر منشأ مشترک این سویه‌ها است. ویروس‌هایی که در کشورهای همسایه در حال چرخش بوده و شبیه جدایه‌های اولیه ایران هستند را می‌توان به‌عنوان منشأ احتمالی ویروس‌های ایران در نظر گرفت. طرقی و همکاران (۲۰۰٦) با توجه به رابطه فیلوژنتیک و درصد همولوژی (شباهت) بالا بین ویروس‌های ایران و آلمان منشأ ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 ایران را کشور آلمان می‌دانند و علت آن را ارتباط زیاد بازرگانی ایران با آلمان مطرح می‌نمایند [١٤] در حالی که کریمی و همکارانش (۲۰۰٤) منشأ ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 ایران را کشور پاکستان مطرح نموده‌اند، آن‌ها گزارش جداسازی ویروس H9N2 از طوطی‌های صادراتی پاکستان به ژاپن در سال ۱۹۹۸ را قبل از گزارش آلودگی پاکستان توسط نعیم (Naeam) [۱۵]، دلیل آلوده بودن پاکستان قبل از ایران می‌دانند [۱۰]. سلطانی و همکاران (۲۰۱۰) نیز با توجه شباهت بسیار زیاد ژن‌های HA و NA ویروس‌های اولیه آنفلوانزای ایران با ویروس parakeet/chibal/1/97 و زمان جداسازی این ویروس در سال ۱۹۹۷ (قبل یا آغاز وقوع همه‌گیری آنفلوانزای طیور ایران)، منشأ احتمالی همه‌گیری ایران را حیات وحش پاکستان دانستند [۱۱]. با توجه به مرز زمینی مشترک وسیع بین دو کشور ایران و پاکستان و تجارت طیور و محصولات آن و همچنین تجارت پرندگان زینتی که به سهولت می‌تواند منجر به اشاعه ویروس‌های آنفلوانزای طیور شود، می‌توان نتیجه گرفت که منشأ ویروس‌های ایران از کشور پاکستان بوده است. با مقایسه توالی ژن‌های NP، HA و NA موجود در ژن بانک ایران با ویروس‌های اولیه پاکستان مثل A/chicken/pakistan/2/99 و همچنین parakeet/chiba/1/97 مشاهده می‌شود که شباهت ژن‌های NP، HA و NA جمعیت ویروس‌های ایران به ویروس‌های فوق‌الذکر پاکستان طی سال‌ها پس از ۱۹۹۸ به مرور زمان کاهش یافته است، به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 ایران احتمالاً از پاکستان منشأ گرفته‌اند ولی در سال‌های بعد به‌صورت مستقل تغییر یافته‌اند.

مطالعات انجام شده توسط پرک (Perk) و همکاران (۲۰۰۹) نشان می‌دهد که ویروس‌های اسرائیل از نظر رابطه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

فیلوژنتیک براساس ژن NP به سه دسته قابل تقسیم هستند. میزان تفاوت بین ویروس‌های هریک از دسته‌ها بیشتر از ٤ درصد نیست در حالی که تفاوت بین ویروس‌های زیرگروه‌های مختلف بین ۵ تا ۱۰ درصد است [١٦]. در مورد ژن NP ویروس‌های ایران با توجه به این‌که توالی ژنتیکی تعداد کمی از ویروس‌های H9N2 جدا شده از ایران در ژن بانک موجود است امکان ترسیم چنین تقسیم‌بندی برای ما وجود نداشت.

برحسب آنالیز فیلوژنیتیک ژن NP، تمام سویه‌های ایرانی در دودمان A/Quail/HongKong/G1/97 قرار می‌گیرند این نکته نشان می‌دهد در طول سال‌های شیوع ویروس آنفلوانزا ژن NP ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 کشور به‌خوبی حفظ شده است و ژن جدیدی از کشورهای چین (شامل دو زیرشاخه A/chicken/Beijing/1/94 و A/Duck/Hong kong/ Y280/97) و کره (زیرشاخه A/chicken/korea/MS96/96) وارد کشور نشده است. بنابراین به‌نظر می‌رسد ویروس‌های H9N2 حاضر حاصل چرخش ویروس‌های قبلی هستند و تغییرات ویروس‌های آنفلوانزای H9N2 کشور احتمالاً در اثر تجمع جهش‌های نقطه‌ای، رخ داده است که این نکته با مطالعات سلطانی و همکاران روی ژن‌های HA و NA همخوانی دارد [١١].

نکته جالب توجه در آنالیز فیلوژنتیک ژن‌های NP، کنار هم قرار گرفتن جدایه‌های این مطالعه (ویروس‌های سال ۲۰۰۸) و ویروس‌های سال ۲۰۰۸ اسرائیل است. به‌نظر می‌رسد در درخت فیلوژنتیک رسم شده از آنالیز فیلوژنتیک، نحوه چیدمان جدایه‌های ویروس آنفلوانزا در یک گروه و گروه‌های مجاور بیشتر مرتبط با زمان جداسازی ویروس‌ها است تا پراکنش جغرافیایی آن‌ها، به این معنی که ویروس‌های آنفلوانزای جدا شده از مناطق مجاور یا حتی غیرمجاور که در یک زمان جدا شده‌اند، در یک گروه قرار می‌گیرند، ولی ویروس‌های جدا شده از یک منطقه در دو زمان مختلف در دو دسته جدا قرار می‌گیرد. علت این موضوع را می‌توان وجود مخازن ژنتیکی این ویروس در پرندگان مهاجر به‌ویژه پرستو و مرغ نوروزی و گسترش سریع آنفلوانزا دانست، چرا که ویروس در یک منطقه محدود نمی‌ماند و سریعاً به مناطق مجاور و حتی غیرمجاور گسترش می‌یابد. آنالیز فیلوژنتیک ژن NP ویروس‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که ویروس‌های این مطالعه از ویروس‌های قبلی ایران جدا شده‌اند و در یک دسته مجزا قرار می‌گیرند که این تغییر در فیلوژنتیک ویروس‌های ایران می‌تواند مربوط به تغییرات ویروس در اثر گردش در جمعیت‌های طیور و احتمالاً جمعیت‌های انسانی باشد.

چوی (Choi) و همکاران (۲۰۰۵) به بررسی ویروس‌های در حال چرخش در بازارهای فروش پرندگان زنده در کره پرداختند و گزارش کردند ویروس‌های H9N2 جدا شده از این بازارها حداقل دارای چهار ژنوتیپ هستند [١٧].

از آن‌جایی که تغییر ژنوتیپ می‌تواند منجر به تغییر خصوصیات زیستی ویروس شود، بررسی ویروس‌های در حال چرخش در بازارهای فروش پرندگان زنده کشور از نظر توالی نوکلئوتیدی تمام قطعات لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد. چرا که نتایج این بررسی وضعیت حضور ژنوتیپ‌ها یا احتمالاً زیرمجموعه‌های جدید را در کشور روشن خواهد کرد. با توجه به این‌که تنها سه ژن از هشت ژن (NP، HA و NA) این ویروس‌ها در این مطالعه و مطالعات قبلی [١١] مورد آنالیز فیلوژنتیک قرار گرفته است، اظهار نظر در مورد حضور ژنوتیپ‌ها یا احتمالاً زیرمجموعه‌های جدید در کشور مشکل به‌نظر می‌رسد؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود به بررسی ویروس‌های در حال چرخش در بازارهای فروش پرندگان زنده کشور پرداخته شود و جدایه‌های ویروس آنفلوانزای به‌دست آمده از این جایگاه‌ها از نظر توالی نوکلئوتیدی تمام قطعات آن بررسی شود.

از آن‌جایی که ویروس‌های H9N2 ایران براساس ژن‌های NP، HA و NA در گروه مشترک با ویروس Qa/HK/G1/97 قرار می‌گیرند و با توجه به گردش وسیع ویروس‌های H9N2 در گله‌های طیور و افرادی که با طیور در تماس هستند، به‌نظر می‌رسد بروز تغییرات در این ویروس‌ها در راستای آلوده نمودن انسان است [٧]، بنابراین بررسی بیشتر و مطالعات مراقبتی مستمر در راستای مبارزه با این ویروس ضروری است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود فرض می‌دانند از ریاست محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر به‌خاطر تـأمین منـابع مالی این تحقیق، تقدیر و تشکر نمایند.

٦- منابع

[1] Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. Vaccine 2007; 25(30): 5637-44.

[2] Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. Vaccine 2008; 26 Suppl 4: D49-53.

[3] Lin YP, Shaw M, Gregory V, Cameron K, Lim W, Klimov A, Subbarao K, Guan Y, Krauss S, Shortridge K, Webster R, Cox N, Hay A. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(17): 9654-8.

[4] Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, Webster RG. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(16): 9363-7.

[5] Lee YJ, Shin JY, Song MS, Lee YM, Choi JG, Lee EK, Jeong OM, Sung HW, Kim JH, Kwon YK, Kwon JH, Kim CJ, Webby RJ, Webster RG, Choi YK. Continuing evolution of H9 influenza viruses in Korean poultry. Virology 2007; 359(2): 313-23.

[6] Vasfi-Marandi M, Bozorgmehrifard MH. An outbreak of non-highly pathogenic avian Influenza in chicken in Iran. Proceedings of 61st Meeting of the Word Veterinary Association. Lyon, France 1999.

[7] Momayez R. Evaluation of influenza H9N2 virus antibody titers in workers of veterinary clinic and laboratory. The 1st Iranian congre of virol, 2000.

[8] Portaghi H, Kivanfar H, Shoushtari AH, Eshratabadi F. Sequence and Phylogenetic Analysis of Neuraminidase Genes of H9N2 Avian Influenza Viruses Isolated From Commercial Broiler Chicken in Iran (2003&2004). Iranian J Vet Sci 2008; 2: 391-400.

[9] Moosakhani F, Kivanfar H, Pourbakhsh A, Shoshtari A. Characterization of hemagglutinin gene of influenza A H9N2 viruses isolated from industrial poultry of Iran during 2004-2005. Iranian J Vet Sci 2006; 1: 194-85.

[10] Karimi V, Bozorogmehri MH, Shahbazzadeh D, Esmaelizade M, Pourbakhsh SA. Sequence analysis and Phylogenetic study of Heamagglutinin gene of H9N2 subtype of avian influenza viruses Isolated during 1998-2000 in Iran. Iran Biomed J 2004; 8(4): 167-72.

[11] Soltani M, Shoshtari H, Bozorgmehrifard M, Charkhkar S. Molecular Characterization of Hemagglutinin, and Neuraminidase Genes of H9N2 Avian Influenza Viruses Isolated From Commercial Broiler Chicken in Iran. J Biol Sci 2010; 10(2): 145-50.

[12] Aamir UB, Wernery U, Ilyushina N, Webster RG. Characterization of avian H9N2 influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

2003. Virology 2007; 361(1): 45-55.

[13] Cameron KR, Gregory V, Banks J, Brown IH, Alexander DJ, Hay AJ, Lin YP. H9N2 subtype influenza A viruses in poultry in pakistan are closely related to the H9N2 viruses responsible for human infection in Hong Kong. Virology 2000; 278(1): 36-41.

[14] Toroghi R, Momayez R, Pourbakhsh A. Biological and molecular characterization of avian influenza virus (H9N2) isolates from Iran. Acta Virol 2006; 50: 163-8.

[15] 15-Naeem K, Hussain M. An outbreak of avian influenza in poultry in Pakistan. Vet Rec 1995, 137(17): 439.

[16] Perk S, Golender N, Banet-Noach C, Shihmanter E, Pokamunsky S, Pirak M, Tendler Y, Lipkind M, Panshin A. Phylogenetic analysis of hemagglutinin, neuraminidase, and nucleo-protein genes of H9N2 avian influenza viruses isolated in Israel during the 2000-2005 epizootic. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2009; 32(3): 221-38.

[17] Choi YK, Seo SH, Kim JA, Webby RJ, Webster RG. Avian influenza viruses in Korean live poultry markets and their pathogenic potential. Virology 2005; 332(2): 529-37.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]