

آنالیز مولکولی ژن NS از ساب تایپ H9N2 ویروس آنفلوآنزای A در صنعت طیور ایران طی سال‌های ۲۰۱۶-۲۰۰۷

زهرا کیوانلو^۱، عبدالحمید شوشتری^۲

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس‌شناسی پزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
 ۲. استادیار بخش تحقیقاتی بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۰۸
 تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۱۱

زمینه و هدف ویروس آنفلوآنزای H9N2 با توجه به دامنه میزبانی بسیار وسیع و به‌علت بازآرایی ژن اهمیت زیادی دارد که احتمال رد شدن از سد بین‌گونه‌ای را تسهیل می‌کند. این مطالعه اطلاعات مفیدی را درباره همگن بودن ژن H9N2 ویروس آنفلوآنزای پرندگان ایران با دیگر ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان کشورهای پاکستان و اسرائیل در سال‌های متوالی نشان می‌دهد. این اطلاعات بر ضرورت نظارت مستمر بر ژن‌های ویروس آنفلوآنزا و بررسی تکامل سویه‌های آن در منطقه تأکید می‌کند.

مواد و روش‌ها تحقیق حاضر دربارهٔ سکانس ژن NS ده‌جدایهٔ ویروس آنفلوآنزای تحت تیپ H9N2 از سال ۲۰۱۶-۲۰۰۷ انجام شد و پس از تکثیر با روش RT-PCR و استخراج ژنوم، ژن‌ها به‌طور کامل توالی‌یابی (با همان پرایمری که برای تکثیر ژن‌ها استفاده شده بود، انجام شد) و پس از آن مورد آنالیز فیلوژنتیک قرار گرفت.

نتیجه‌گیری تمام این ۱۰ جدایه در ال A و در تحت دودمان Korean با موتیف اسید آمینه در لیگاند KSEI PDZ قرار گرفت که این مسئله قرابت ژن‌های ویروس‌های پاکستانی را به جدایه‌های ایران نشان می‌دهد. ویروس‌های H9N2 از نظر ایجاد بیماری‌زایی فوق حاد نیستند؛ اما با انتقال به گونه‌های پستاندار، مثل انسان، بیماری خفیفی را ایجاد می‌کنند. این ویروس‌ها علاوه بر اتصال به گیرنده‌های اختصاصی طیور، این توانایی را دارند که با تغییراتی در اسید آمینه، به گیرنده‌هایی شبیه به استرین نوع انسانی اتصال یابند.

کلیدواژه‌ها:

ویروس آنفلوآنزا، بازآرایی، ژن NS، RT-PCR، آنالیز فیلوژنتیک.

۱. مقدمه

برای ساب‌تایپ‌های متعدد ویروس‌های آنفلوآنزای A هستند. از قطعهٔ هشتم ژنوم، دو پروتئین NS1 و NS2 به‌وسیلهٔ برش در انتهای ۳' و ایجاد Pseudoknot در ساختار ژنوم ویروس ساخته می‌شود. [۲] پروتئین NS1 به طول ۲۳۰ اسید آمینه یک پروتئین دایمر است و پروتئین NS2 دارای ۱۲۱ اسید آمینه است. NS کوچک‌ترین قطعهٔ RNA ویروسی است که دارای ۸۹۰ نوکلئوتید و ORF است و mRNA از ژن NS1 به‌طور مستقیم این پروتئین را کد می‌کند؛ درحالی که mRNA از NS2 حاوی اینترون ۴۷۳ نوکلئوتید است. پروتئین NS1 پروتئینی چندمنظوره است که

خانوادهٔ اورتومیکسوویریده شامل ویروس‌هایی است که ژنوم RNA تک‌ رشته با پلاریتهٔ منفی و قطعه‌قطعه درون پوشش لپیدی دارند. در این خانواده، هفت جنس مختلف وجود دارد که شامل آنفلوآنزای A، آنفلوآنزای B، آنفلوآنزای C، آنفلوآنزای D [۱]، *Thogotovirus*، *Isavirus* و جنس *Quarantivirus* است. تاکنون ۱۸ ساب‌تایپ HA و ۱۱ ساب‌تایپ NA در ویروس‌های A شناسایی شده است و پرندگان آبزی وحشی میزبان‌های طبیعی

* نویسندهٔ مسئول: زهرا کیوانلو

نشانی: بخش تحقیقاتی بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

تلفن: ۰۲۶-۳۴۵۰۲۸۶۰

رایانه: Zahra.keyvanlou@gmail.com

شناسه ORCID: 0000-0001-6740-7567

شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0001-6740-7567

مجلهٔ علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۷، شمارهٔ ۱، فروردین - اردیبهشت ۱۳۹۹، ص ۸۳-۹۲

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

مانند تهران، مرکزی، همدان، سیستان، فارس و... اخذ شد. این نمونه‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند. پس از جمع آوری اطلاعات مربوط به نمونه‌ها که شامل مشخصات گله‌هایی که ویروس از آن‌ها جدا شده و تلفات و علائم بیماری‌های تنفسی بود، در نهایت پس از کالبدشکافی، بافت‌های نای و ریه جداسازی و کدگذاری شد و در مؤسسه سرم‌سازی رازی در بخش تحقیقاتی بیماری‌های طیور فریز گردید.

۲.۲. روش نمونه‌گیری

ابتدا بافت‌های نای و ریه در زیر هود پس از برش و خرد شدن با محلول PBS به صورت سوسپانسیون درآورده و پس از آن در لوله استریل در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور RPM ۱۵۰۰ قرار داده و پس از آن مایع رویی برای تزریق به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار SPF ده‌روزه برداشت شد.

۲.۳. ویروس‌ها

نمونه‌های مشکوک به منظور تکثیر ویروس آنفلوانزا به تخم‌مرغ‌های SPF ده تا یازده‌روزه بارور تلقیح شدند. مایع آلانتوئیک استخراج شد و برای آزمایش‌های بعدی، یعنی تأیید وجود ویروس و تعیین ساب‌تایپ ویروس، استفاده گردید. تعیین ساب‌تایپ ویروس‌ها با آزمایش‌های HI (سرم‌های مثبت آنفلوانزا، شرکت انگلیسی CVL (Central Veterinary Laboratory) و NI (سرم‌های مثبت NA، شرکت انگلیسی CVL) بر روی آنتی‌سرم انجام شد و پس از آن با آزمایش RT-PCR نوع ساب‌تایپ *H9N2* تأیید شد و مایع آلانتوئیک به عنوان استوک ویروس برای آنالیز ژن *NS* مورد استفاده قرار گرفت.

۲.۴. استخراج RNA و مراحل واکنش RT-PCR (تک‌مرحله

(۱)

RNA ویروس آنفلوانزا از مایع آلانتوئیک تخم‌های جنین‌دار تلقیح شده با استفاده از کیت استخراج RNA^۲ (شرکت روش^۳) به دست آمد و پس از استخراج RNA ویروسی از مایع آلانتوئیک، واکنش RT-PCR تک‌مرحله‌ای با پرایمر طراحی شده <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3> انجام شد (جدول ۱).

به‌عنوان تنظیم‌کننده پس از رونویسی نقش مهمی را در چرخه زندگی ویروس آنفلوانزا در چندین عملکرد ایفا می‌کند: اتصال به RNA ویریون [۳]، poly(A)-containing RNAs [۴]، U6 snRNA و تعدادی از پروتئین‌های سلولی. *NSI* نقش مهمی در حفاظت از ویروس آنفلوانزا در برابر سایتوکاین‌های سلولی دارد. *NS2* (NEP) پروتئین خروج‌هسته‌ای شامل ۱۲۱ آمینو اسید است که به واسطه آن RNP‌های تازه سنتز شده را از هسته به سیتوپلاسم انتقال می‌دهد. [۵] پروتئین *NS2* با پروتئین ماتریکس ویروسی (M1) و با Exportin سلولی (خانواده‌ای از پروتئین‌های سلولی) که واسطه خروج هسته‌ای است، تعامل دارد. [۶] در سال‌های اخیر، نقش اصلی *NSI* به‌عنوان جلوگیری از پاسخ ایمنی میزبان مخصوصاً در محدودیت هر دو نوع تولید اینترفرون و اثرات ضدویروسی از پروتئین‌های الفاشده ناشی از اینترفرون مانند RNA دورشته‌ای وابسته به PKR و الیگو آدینلات سنتتاز ۵'-۳' RNase L توصیف شده است. در مطالعه حاضر، سکانس ژن *NS* ویروس آنفلوانزای ساب‌تایپ *H9N2* طی ۱۰ سال مورد بررسی قرار گرفت. ویروس‌های مختلف طی سال‌های ۲۰۱۶-۲۰۰۷ انتخاب شد و پس از تکثیر با روش RT-PCR و عملیات استخراج ژنوم، مورد سکانس و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ماهیت چندمنظوره *NSI* بسیار زیاد است و همان‌طور که به‌نظر نمی‌رسد فعالیت آنزیمی ذاتی داشته باشد، احتمال دارد به‌صورت آرایه‌هایی از اپی‌توپ‌های کوچک اتصال پروتئین ایجاد شود که با سایر قسمت‌های مختلف تعامل برقرار کند. این اتصالات ممکن است هم‌تراز با تعاملات دیگر قسمت‌های ژنوم در ایجاد انتقال سوبیه‌های جدید و پاتوژنز نقش داشته باشد. در این مطالعه، با بررسی اطلاعاتی درباره تغییرات ژنوم سوبیه‌های ایران در طی ۱۰ سال، دریافت شد که میزان تشابه نزدیک با سوبیه‌های کشورهای همسایه نشان‌دهنده تبادل ژنی است که این تغییرات در حدت بیماری‌زایی تأثیرگذار است و کنترل بر این تغییرات برای قطع گسترش ویروس اهمیت دارد.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. جمع‌آوری نمونه

در بازه زمانی ۲۰۱۶-۲۰۰۷، به‌منظور جداسازی ویروس ده نمونه بافتی (نای و ریه) از مرغداری‌های گوشتی استان‌های مختلف ایران

جدول ۱. پرایمر مورد استفاده اختصاصی

Gene	Forward primer	Reverse primer	Expected size
NS	GTGACAAAGACATAATGGAT	AGTAGAAACAAGGGTGT	890

۳. Roche

۱. Central Veterinary Laboratory

۲. High Pure Viral Nucleic Acid Kit

با (www.NCBI.nlm.nih.gov/BLAST) و مشخص شدن میزان شباهت توالی جدایه‌ها با سایر ویروس‌های سویه‌های رفرانس بانک ژن، به منظور آنالیز بیشتر انتخاب شدند. توالی سویه‌ها با بسته نرم افزار DNASTar آنالیز شد. ویرایش توالی سویه‌های مورد مطالعه برای همسان‌سازی طول قطعات توالی سویه‌ها و ترجمه توالی نوکلئوتیدی به توالی اسید آمینه‌ای متناظر به منظور افزایش اعتبار^۱، با برنامه نرم‌افزار Edit Sequence انجام شد.

۲.۶. آنالیز فیلوژنتیک^۲

مرتب‌سازی توالی‌ها و تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای سویه‌ها با نرم‌افزار Meg Align (نسخه ۶) با روش اتصال - همسایگی^۳ انجام شد. براساس هم‌راستایی^۴ توالی‌ها، درخت فیلوژنتیک ترسیم و جایگاه سویه‌های مورد مطالعه در بین سویه‌های رفرانس مشخص شد. سپس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک و بررسی شباهت‌ها و تفاوت‌های سویه‌ها بررسی گردید.

۳. یافته‌های پژوهش

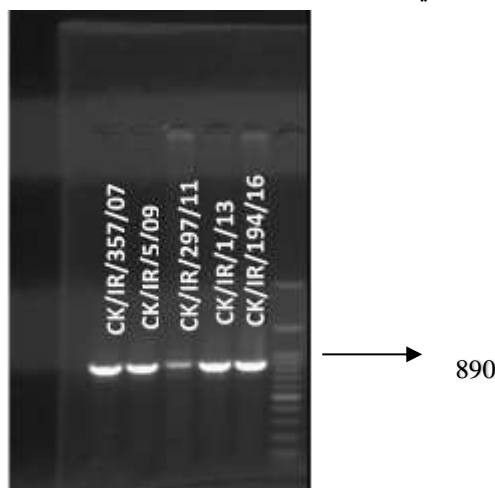
ژن NS از تمام جدایه‌های ویروس آنفلونزای H9N2 در این مطالعه تکثیر و مورد سکانس و آنالیز فیلوژنتیک قرار گرفت. دو پروتئین توسط ژن NS کد می‌شود که شامل پروتئین NS1 و NS2 است. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، محصولات PCR پس از الکتروفورز در محدوده ۸۹۰ bp قرار دارند.

چرخه اولیه برنامه تکثیر شامل یک دوره ۴۵ دقیقه‌ای در ۴۵ درجه سانتی‌گراد به منظور انجام واکنش نسخه برداری معکوس RNA و سنتز cDNA است و پس از آن چرخه‌هایی با شرایط زیر است:

۳۵ سیکل از ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه به منظور دناتوره شدن اولیه cDNA، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه به منظور دناتوره شدن ثانویه cDNA، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه به منظور آنیلینگ DNA، ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و برنامه با یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد (به منظور افزایش محصول ژن‌های بزرگ) به پایان می‌رسد.

۲.۵. آنالیز توالی

محصول PCR متعلق به سویه‌های مورد مطالعه در مورد ژن NS به منظور بررسی و تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای توالی‌یابی شد. بدین منظور ابتدا محصولات PCR با کیت تخلیص DNA (ساخت شرکت روش) براساس دستورالعمل شرکت، از روی ژل آگارز ۱ درصد خالص‌سازی شد و همراه با پرایمرهای اختصاصی ژن NS که در PCR استفاده شده بود، به منظور تعیین توالی به شرکت روش پنزبرگ آلمان فرستاده شد. پس از دریافت توالی‌ها ابتدا توالی نوکلئوتیدی ژن NS با توالی سایر ویروس‌های ثبت شده در ژن بانک با استفاده از جست‌وجوی BLAST در مخزن EMBL/GeneBank مقایسه شد



شکل ۱. الکتروفورز محصول RT-PCR ژن NS ویروس آنفلونزای جدایه در این مطالعه: طول قطعه NS: ۸۹۰ bp

۳. Neighbor Joining

۴. Alignment

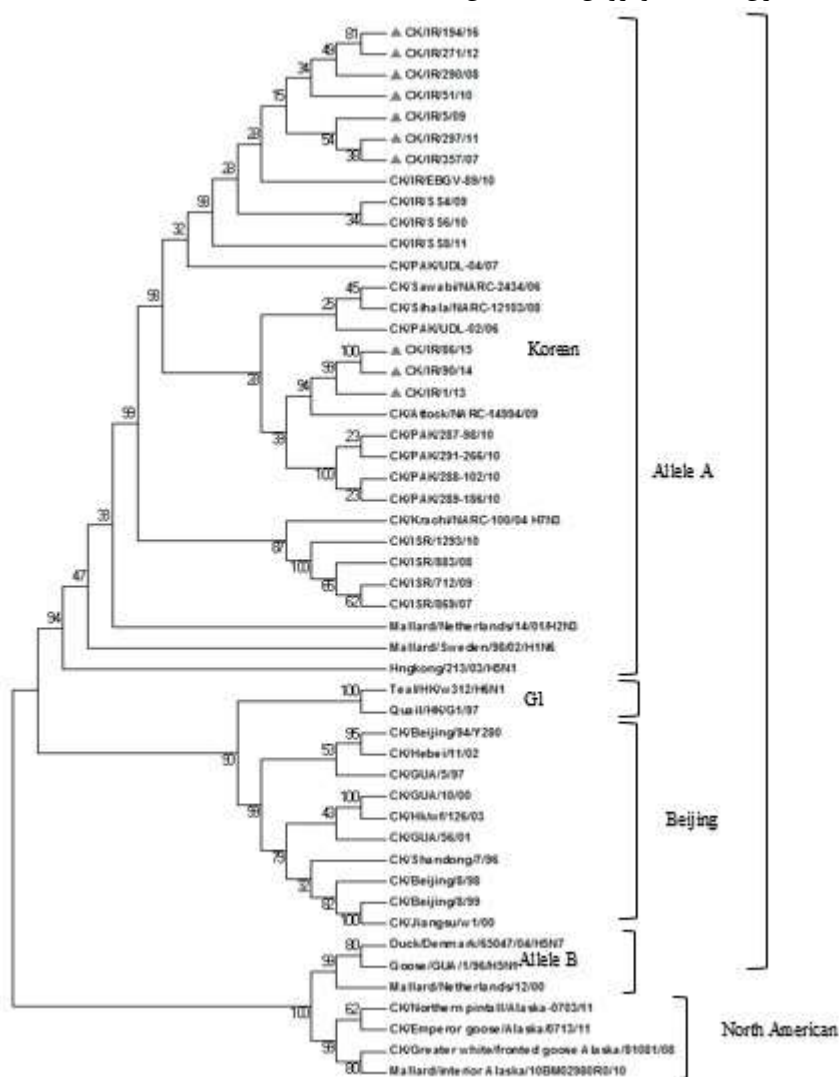
۱. Validity

۲. Phylogenetic Analysis

۳.۱. آنالیز فیلوژنتیک

تمام ویروس‌های این پژوهش از لحاظ ژن *NS* تحت دودمان Korean قرار می‌گیرند. ویروس‌ها با ویروس‌های پاکستان و اسرائیل قرابت دارند و کلاستر شدن ژن *NS* ویروس‌های chicken/Karachi/NARC-100/2004(H7N3) با ژن *NS* ویروس‌های این

کلاستر نشان‌دهنده رد و بدل شدن این ژن بین دو ساب‌تایپ *H7N3* و *H9N2* است. ویروس‌های مورد مطالعه با ویروس‌های پرندگان وحشی مثل mallard/Netherlands/14/2001(H2N3) و mallard/Sweden/98/2002(H1N6) قرابت ندارند و در یک کلاستر جدا قرار می‌گیرند (شکل ۲).



شکل ۲. درخت فیلوژنتیک ژن *NS* از ویروس‌های آنفلوآنزای A در صنعت طیور ایران طی سال‌های ۲۰۰۷-۲۰۱۶ با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6

۳.۲. ویژگی‌های اسکانس‌های آمینو اسیدی از پروتئین‌های *NS1* و *NS2*

پروتئین و ژن *NS* از ایزوله‌های ایرانی به‌طور کامل اسکانس و آنالیز فیلوژنتیک شد که طول ORF رشته RNA از ایزوله‌های *H9N2* که پروتئین *NS1* و *NS2* را کد می‌کند، در حدود ۸۹۳ نوکلئوتید، تعداد اسید آمینه در حدود ۲۳۰ و همولوژی درون

گروه ژن *NS* در حدود ۸۹،۴-۹۹،۵ درصد است (شکل ۳). همولوژی از پروتئین‌های *NS1* و *NS2* به ترتیب در حدود ۱۰۰-۹۳،۱ درصد و ۱۰۰-۹۶،۷ درصد است که در شکل‌های مربوطه نشان داده شد (شکل ۴ و ۵). پروتئین‌های جدایه‌های *H9N2* در حدود ۲۳۰ اسید آمینه داشتند که بیشترین جایگزینی و موتاسیون در قسمت انتهای کربوکسیلی و کمترین

جایگزینی در قسمت N-Terminal و در قسمت ۷۳-۱ پروتئین بود. تفاوت اسید آمینه NS1 در جدایه های H9N2 به تعداد ۳۰ موقعیت از نظر اسید آمینه متفاوت است (۴،۳۰ درصد)؛ درحالی که مابقی ۲۰۰ اسید آمینه یکسان بود. پروتئین های NS2 در همه ایزوله های H9N2 حاوی ۱۲۱

آمینو اسید است با کمترین جابه جایی. ژن NS از ویروس های آنفلوآنزا H9N2 ایزوله های ایرانی متعلق به ال A است. موتیف های اتصال NS1 در PDZ در ویروس های آنفلوآنزای این مطالعه KSEI است.

		Percent Identity										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Divergence	1	█	97.7	99.5	99.1	99.1	98.3	90.3	95.4	95.7	96.5	1
	2	2.2	█	98.4	98.2	98.4	98.2	91.1	94.6	95.0	96.8	2
	3	0.5	1.4	█	98.8	98.8	98.6	92.5	95.3	95.8	97.2	3
	4	0.9	1.6	0.7	█	98.8	98.6	92.3	95.6	94.9	96.4	4
	5	0.9	1.7	1.2	1.1	█	98.5	92.8	95.3	95.3	96.9	5
	6	1.7	1.9	1.1	1.2	1.6	█	91.2	95.2	94.7	96.8	6
	7	5.1	4.6	3.9	4.3	4.2	4.7	█	94.7	94.2	99.4	7
	8	5.4	5.8	4.4	5.4	4.8	5.8	3.7	█	99.1	93.4	8
	9	4.5	5.0	4.4	4.4	4.9	4.7	2.5	0.0	█	94.0	9
	10	3.9	3.3	2.9	3.4	3.1	3.1	6.6	7.0	6.4	█	10
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

CK/IR/357/07
CK/IR/290/08
CK/IR/5/09
CK/IR/51/10
CK/IR/297/11
CK/IR/271/12
CK/IR/1/13
CK/IR/90/14
CK/IR/86/15
CK/IR/194/16

شکل ۳. شباهت ژن NS بین ویروس های مختلف این پژوهش

		Percent Identity										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Divergence	1	█	95.7	98.3	98.3	93.1	95.7	95.2	95.2	94.8	95.2	1
	2	2.5	█	94.8	94.8	96.5	99.1	98.3	98.7	98.3	98.7	2
	3	0.0	2.5	█	100.0	93.1	94.8	94.4	94.4	93.9	94.4	3
	4	0.0	2.5	0.0	█	93.1	94.8	94.4	94.4	93.9	94.4	4
	5	0.0	2.5	0.0	0.0	█	97.4	96.5	96.5	96.1	96.5	5
	6	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	█	99.1	98.7	98.3	98.7	6
	7	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	█	97.8	97.4	97.8	7
	8	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	98.3	99.1	8
	9	0.0	2.5	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	█	98.3	9
	10	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	10
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

CK/IR/1/13
CK/IR/51/10
CK/IR/86/15
CK/IR/90/14
CK/IR/194/16
CK/IR/271/12
CK/IR/290/08
CK/IR/357/07
CK/IR/297/11
CK/IR/5/09

شکل ۴. شباهت پروتئین NS1 بین ویروس های مختلف این پژوهش

		Percent Identity										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Divergence	1	█	99.2	99.2	99.2	99.2	96.7	99.2	99.2	99.2	98.3	1
	2	0.0	█	100.0	98.3	98.3	97.5	100.0	100.0	100.0	99.2	2
	3	0.0	0.0	█	98.3	98.3	97.5	100.0	100.0	100.0	99.2	3
	4	0.0	0.0	0.0	█	100.0	96.7	98.3	98.3	98.3	97.5	4
	5	0.0	0.0	0.0	0.0	█	96.7	98.3	98.3	98.3	97.5	5
	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	97.5	97.5	97.5	96.7	6
	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	99.2	7
	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	99.2	8
	9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	99.2	9
	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	10
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

CK/IR/1/13
CK/IR/5/09
CK/IR/51/10
CK/IR/86/15
CK/IR/90/14
CK/IR/194/16
CK/IR/271/12
CK/IR/290/08
CK/IR/357/07
CK/IR/297/11

شکل ۵. شباهت پروتئین NS2 بین ویروس های مختلف این پژوهش

را کد می کند. NS2 به عنوان پروتئین خروج هسته ای (NEP) برای انتقال RNP تازه تولید شده از هسته به سیتوپلاسم نقش دارد [۶]؛ درحالی که NS1 در فعالیت های سلولی تأثیر می گذارد مانند انتقال RNA، Splicing و ترجمه. NS1 هدفی بالقوه برای کشف داروهای ضد ویروسی براساس

۴. بحث و نتیجه گیری
در مطالعه حاضر ژن NS اغلب ویروس های H9N2 جدا شده از گله های تجاری مرغ طی سال های ۲۰۰۷-۲۰۱۶ به طور کامل توالی یابی و آنالیز فیلوژنتیک شد. ژن NS ویروس آنفلوآنزای پرندگان دو پروتئین غیر ساختاری NS1 و NS2

Duck/Hong و Quail/Hong Kong/G1/97 و Kong/Y439/97 را دربرمی‌گیرند. دو دودمان G1 و Y280 از اواسط دهه ۱۹۹۰ به‌طور عمده در چین و دودمان G1 در جوجه‌های خارمیانه و آلمان شایع بوده است [۱۲-۱۴]؛ درحالی‌که ویروس‌های Y439 از اردک خانگی در هنگ‌کنگ در سال ۱۹۹۷ جدا شده بودند و ویروس‌های مشابه نیز در شیوع بیماری در جوجه‌ها در کره جنوبی شناخته شدند. از طرفی در مطالعات انجام‌شده در ایران درباره‌ی ژن *NS*، ویروس آنفلوآنزای *H9N2* در جوجه در دودمان Y439 قرار گرفتند. [۱۵]

آنالیز فیلوژنتیک این ویروس‌ها با دیگر جدایه‌های ایران و دیگر ویروس‌های پاکستان و اسرائیل مقایسه شد. آنالیز فیلوژنتیک از ژن‌های *NS* نشان داد که تمام ژن‌های مورد مطالعه از سال‌های ۲۰۰۷-۲۰۱۶ در تحت دودمان Korean با پروتایپ DUCK/HK/Y439/97 قرار می‌گیرند (شکل ۲). قرابت بالای ویروس‌های مورد مطالعه با ژن‌های پاکستان مانند CK/PAK/UDL-04/07 به ویروس‌های مورد مطالعه نشان‌دهنده‌ی منشأ مشترک این دو ژن است و این اشتراک را می‌توان به سایر ویروس‌های گروه نیز تعمیم داد. ویروس CK/KHI/NARC-04/H7N3 با ویروس‌های اسرائیل مطالعه قرابت دارد. مجموعه‌ی ژنی ویروس‌های Highly Pathogen نشانگر این است که انتقال ژن‌ها از *H7N3* و *H9N2* به‌سادگی صورت می‌گیرد و ویروس *H9N2* پتانسیل بیماری‌زایی برای ماکیان دارد. در مقایسه با جدایه‌های ویروسی از سال ۱۹۹۸-۲۰۰۲ در کشور چین نشان داده شده است که تمامی جدایه‌های متعلق به این کشور با توجه به اینکه در ال *A* قرار می‌گیرند، هفت جدایه از هشت ایزوله بررسی‌شده آن در دودمان HK/Y280/94 قرار گرفته‌اند و هیچ جدایه‌ای در دودمان Qa/HK/G1/97 قرار نگرفته و ویروس CK/NM/ZH/02 در دودمان DUCK/HK/Y439/97 قرار دارد که نشان می‌دهد در کشور چین دودمان Y439 و Y280 در گردش است و درمقابل در کشور ایران، با توجه به قرار گرفتن جدایه‌های این مطالعه و جدایه‌های دیگر محققان ایرانی تحت دودمان Y439، احتمال دارد فقط دودمان Y439 درمورد ژن *NS* گردش باشد. [۱۶]

حداکثر شباهت بین ویروس‌های CK/IR/5/09 و CK/IR/357/07 تا ۹۹٫۵ درصد و حداقل شباهت بین ویروس‌های CK/IR/194/16 و CK/IR/1/13 حدود ۸۹٫۴ درصد است. علت میزان شباهت زیاد بین *NS* جدایه‌های

ساختار، فعالیت، ژنتیک و اهمیت کلی در تکثیر و پاتوژنز ویروس است که مورد توجه قرار گرفته است. از ژن *NSI* ویروس آنفلوآنزا به‌صورت جهش‌یافته یا برش‌خورده می‌توان برای طراحی واکسن‌های ویروسی زنده تخفیف‌حدت‌یافته استفاده کرد. این ویروس‌های ضعیف‌شده را می‌توان در سلول‌های Vero که قادر به بیان پاسخ IFN نیستند، تکثیر داد. همچنین با ایجاد ویروس‌های نوترکیب با ژن‌های *NSI* جهش‌یافته می‌توان سلول‌های توموری را ریشه‌کن کرد؛ به این ترتیب که ویروس‌های جهش‌یافته بلافاصله تکثیر می‌شوند و بافت را از بین می‌برند. این پروتئین محافظت شده از ۲۳۰-۲۳۷ آمینواسید تشکیل شده است. نقش اولیه‌ی پروتئین *NSI* مهار سیستم اینترفرون میزبان است که از طریق چندین مکانسیم مولکولی انجام می‌شود؛ علاوه بر این، در تنظیم RNA ویروسی و سنتز پروتئین و mRNA Splicing ویروسی و فعال‌سازی مسیر PI3K نقش دارد. [۷-۸] براساس آنالیز فیلوژنتیک، ژن‌های *NS* از ویروس آنفلوآنزای مرغی به دو ال *A* و *B* تقسیم می‌شود که تعداد زیادی از ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان، تمامی آنفلوآنزای انسانی، خوکی و اسبی در ال *A* و در ال *B* فقط ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان قرار می‌گیرد. [۹] در مطالعه حاضر، تمام پروتئین‌های *NSI* در ال *A* قرار گرفته‌اند. همچنین بقیه موارد از جدایه‌های ویروس آنفلوآنزای *H9N2* دیگر محققان ایرانی در ال *A* قرار دارند [۱۰] (شکل ۲). مهم‌تر از همه تجزیه و تحلیل ژنتیکی *NS* در زمینه سلول‌های آلوده و حیوانات است که نشان می‌دهد تکثیر، انتشار و پاتوژنز ویروس بسیار وابسته به عملکرد این پروتئین است. بخشی از تلاش‌های صورت‌گرفته به‌منظور توسعه واکسن آنفلوآنزای زنده و تخفیف‌حدت‌یافته، از طریق حذف توالی‌های کدکننده *NSI* به‌دست آمده است که نشان می‌دهد ویروس‌هایی که دارای عملکرد *NSI* نیستند، دارای تکثیر زیاد و قابلیت‌های بیماری‌زایی در انواع مدل‌های حیوانی هستند. مطالعات در زمینه ویروس آنفلوآنزا نشان می‌دهد داروهایی که مانع فعالیت هدف ویروس می‌شوند، به‌عنوان یک نتیجه باعث کند شدن تولید ویروس یا پاتوژنز می‌شوند. ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان *H9N2* در جوامع طیور در سرتاسر آسیا و خاورمیانه اندمیک هستند. [۱۱] این ویروس‌ها به تعدادی از دودمان‌های تعریف‌شده طبقه بندی می‌شوند. مطالعات اپیدمیولوژیک و ژنتیک نشان داده که سه دودمان مجزا از ویروس‌های آنفلوآنزای *H9N2* مسئول وقوع شیوع بیماری بوده و Chicken/Beijing/1/94 و

KSEI بود.

وجود پروتئین NSI با منشأ پرندگان در سلول‌های انسانی ممکن است تعاملات پروتئین‌ها را با پروتئین‌های لیگاند PDZ افزایش دهد که باعث افزایش ویروانس می‌شود. طبق مشاهدات او هنر و همکاران، سه الگوی موتیف اسید آمینه‌ای EPEV، EPEV و KSEV در پروتئین NSI، ویروس آنفلوآنزای مرغی را در موش افزایش می‌دهد. تغییرات اسید آمینه‌ای در سلول‌های پرندگان در لیگاند PDZ به گونه‌ای است که در آلوده کردن سلول‌های انسانی نقش دارد و این تبدیل اسید آمینه پتانسیل آداپته شدن با سلول‌های انسانی را ایجاد می‌کند و می‌توان نتیجه گرفت که در اولین مراحل تشخیص لیگاند PDZ اهمیت دارد. [۲۳-۲۲] ویروس‌های H9N2 که اخیراً در پاکستان وجود دارند، موتیف مشخصی در قسمت C-terminal دارند که شامل KSEI، KSEV و LPPK هستند. لیگاند PDZ جدایه‌های پاکستانی شامل موتیف KSEI و KSEV هستند که موتیف KSEI به جدایه‌های ایرانی شباهت دارد و این نتیجه همسانی ژن‌های پاکستانی به ایران است؛ همچنین نشان‌دهنده تمایل PBMs این موتیف‌ها به سلول‌های پرندگان است. [۲۴] اگرچه ویروس‌های H9N2 ویروس‌های با بیماری‌زایی کم طبقه‌بندی می‌شوند، گاهی اوقات باعث ایجاد بیماری‌ای جدی در طیور می‌شوند که همراه با مرگ و میر و کاهش تولید تخم مرغ می‌شود. [۱۵] علاوه بر زبان‌های اقتصادی فراوان برای صنعت طیور، H9N2 همچنین تهدید جدی برای سلامت عمومی است. در طی سال‌های ۱۹۹۸-۲۰۱۴ شواهد سرولوژی ویروس آنفلوآنزای مرغی H9N2 در میان تولیدکنندگان مرغ در ایران (استان فارس) گزارش شده است که طبق نتایج آن، کارفرمایان صنعت مرغداری در مناطق آندمیک (استان فارس) در معرض خطر هستند و ویروس آنفلوآنزای مرغی H9N2 وجود دارد و سطح آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده در کارگران بالاتر از کسانی است که در معرض آن قرار ندارند. [۲۵] همچنین شیوع سرمی بالای آنفلوآنزای H9N2 در طیور بومی روستایی در مطالعه‌ای که توسط همکاران انجام شده است، نشان می‌دهد بومی شدن این بیماری در طیور بومی روستایی کشور نقش دارد. بررسی دیگری که در میان کارکنان کشتارگاه مرغداری کشور، کلینیک‌های طیور و مؤسسه سرم‌سازی رازی، بر روی نمونه‌های سواب سرم و سواب گلو و بینی انجام شد، نشان‌دهنده بالاترین تیتراژ آنتی

ایرانی که در یک دودمان قرار گرفته‌اند، شاید این باشد که این ژن‌ها از منشأ مشترک شکل گرفته‌اند و تفاوت‌های جزئی که باعث شده جدایه‌ها با ویروس‌های پاکستانی همسانی بیشتری داشته باشند، به دلیل موتاسیون نقطه‌ای بدون نوتریبی است و دلیل قرار گرفتن در دو شاخه را می‌توان در این دانست که نوتریبی بین ژن‌ها با ساب تایپ‌های H7N3 و H9N2 اتفاق افتاده است. این ویروس‌ها در بسیاری از کشورهای آسیا و مناطق اطراف آن در طیور یافت می‌شود. ظهور ژنوتایپ‌های جدید ویروس‌های H9N2 به وسیله نوتریبی ایجاد می‌شود. [۱۷] البته به علت عدم تشخیص ویروس H7 احتمال دارد این امر در خارج از کشور انجام شده باشد. در این مطالعه نشان داده شد که این تبادل ژنی در ویروس‌های آنفلوآنزا رخ داده و احتمال تکثیر ویروس‌ها به سرعت به طور گسترده‌ای به رسمیت شناخته شده و این نوتریبی ژنتیکی در ویروس آنفلوآنزای پرندگان در ایزوله‌های پرندگان وحشی و ماکیان رایج است. آنفلوآنزای A در پروتئین غیرساختاری NSI دومین PDZ برای جلوگیری از پاسخ ایمنی میزبان از طریق ارتباط با تعدادی از پروتئین‌های ضدویروس عمل می‌کند. علاوه بر این یک توالی در مقیاس وسیع (PBMs)^۱ به صورت چهار آمینو اسید از پروتئین NSI قرار دارد. PBMs یا همان توالی اسید آمینه‌ای از پروتئین NSI شامل یک ساختار مشخص شناخته شده‌ای از دومین PDZ است که به کلاسی از پروتئین‌های سلولی متصل می‌شود. [۱۸] به طور کلی پروتئین‌های حاوی دومین PDZ به عنوان داربستی برای جمع‌آوری پروتئین و عملکرد در سیگنال سلولی و قطبیت سلولی عمل می‌کنند. [۱۹] این توالی از دومین PDZ از ویروس آنفلوآنزا در قسمت C-terminal اسید آمینه‌های ۲۳۰-۲۲۷ را شامل می‌شود و بیشترین پروتئین NSI در دومین PDZ توالی ESEV در نوع پروتئین NSI پرندگان یا RSKV در نوع پروتئین NSI انسانی است. ESEV تمایل زیادی به پروتئین‌های DIG-1 و Scribble دارد؛ در حالی که نوع RSKV دارای تمایل کمی به این پروتئین‌های سلولی است. [۲۰] توانایی ESEV و KSEV برای تحریک مسیر PI3K/Akt برای تکثیر ویروس آنفلوآنزا است. [۲۱] در حدود شاخص‌های اسید آمینه‌ای چه به صورت اسید آمینه تک و چه به صورت موتیف خاص در سراسر پروتئین NSI ویروس‌های مورد مطالعه با هم مقایسه شدند و در مورد ویروس‌های مورد مطالعه ما موتیف شناخت PDZ به صورت

H9N2 ویروس‌های آنفلوآنزای مرغی در طی سال‌ها با ویروس‌های آنفلوآنزای مرغی پاکستان و اسرائیل نشان داده شد که با تهدید احتمالی ویروس *H9N2* در منطقه، نظارت مستمر بر ژن‌های ویروس آنفلوآنزا و درک تکامل و ظهور سویه‌های آن در منطقه به کنترل و کاهش میزان شیوع کمک می‌کند. واضح است که ویروس‌های *H5N1* معمولاً عفونت‌هایی با مرگ‌ومیر بالا در انسان ایجاد می‌کند که منجر به تشخیص زودهنگام و جلوگیری از سازگاری و توسعه انتقال انسان به انسان می‌شود. [۲۳] با این حال، عفونت‌های انسانی *H9N2* با یک بیماری شبه آنفلوآنزایی به راحتی چشم‌پوشی می‌شوند و ویروس *H9N2* فرصت بیشتری را برای توسعه انتقال انسان به انسان می‌یابد. به نظر می‌رسد کنترل بر ویروس آنفلوآنزا در هر دو جنبه حیوانی و انسانی بهترین گزینه برای تشخیص و قطع این نوع توسعه است.

بادی ضد *H9N2* بوده؛ به این معنا که این ویروس توانایی تغییر به سمت آلوده کردن بافت اپی تلیال نای انسان را ایجاد می‌کند و در واقع به منظور سازگاری با بدن انسان تغییراتی را متحمل می‌شود. این نتایج با مطالعات دیگر گزارش شده در ایران پس از عفونت *H9N2* کودکان چینی مطابقت دارد. با این حال، ویروس‌ها تاکنون قادر به تولید عفونت‌های گسترده نبوده‌اند. با توجه به اینکه ویروس *H9N2* توانایی آلوده کردن انسان‌ها را دارد، نظارت بر چنین مواردی برای تعیین متغیرهای ژنتیکی و توانایی آن‌ها برای تغییر میزبان اهمیت دارد. گزارش‌هایی از گردش مداوم ویروس‌های *H9N2* در مرغ‌های آسیایی نشان داده که توانایی این ویروس‌ها به سرعت در حال تکامل و افزایش ویرولانسی است. [۲۶-۲۸] به منظور بررسی میزان سازگاری این ویروس با پستانداران، آزمایش‌هایی روی یک مدل موش صورت گرفت و نتایج افزایش تکثیر ویروس *H9N2* در این مدل را نشان داد. [۲۸] در این مطالعه، همگن بودن ژن

References

- Chiapponi C, et al. Detection of Influenza D Virus among Swine and Cattle. Italy. *Emerge Infect Dis*. 2016; 22(2): 352-4.
- Lamb R.A, Lai C.J. Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* 21. 1980; 475-85.
- Hatada E, et al. Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *J. Gen. Viral*. 78. 1997; 1059-63.
- Qiu Y, Krug R.M. the influenza virus NS1 protein is a poly (A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly (A). *J. Virol*. 1994; 68: 2425-32.
- Greenspan D, et al. Expression on influenza virus NS2 nonstructural protein in bacteria and localization of NS2 in infected eukaryotic cells. *J. Viral*. 1985; 54: 833-43.
- O'Neill RE, Talon J, Palese P. the influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral rib nucleoproteins. *EMBO J* 17. 1998; 288-96.
- Avllon J, Garcia Sastre A, Hale BG. Influenza A viruses and PI3K: are there time, place and manner restrictions? *Virulence*. 2012; 3: 411-4.
- Ehrhardt C, Ludwig S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cellular microbiology*. 2009; 11: 863-71.
- Martin K, Helenius A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids in to the nucleus. *J Virol*. 1991; 65: 224-32.
- Wang S, Shi W. Genetic analysis of the nonstructural (NS) genes of H9N2 chicken influenza viruses isolated in China during 1998-2002. *Virus Genes* 31(3). 2005; 329-35.
- Talon J, Salvatore M, O'Neill RE, Nakaya Y, Zheng H, Muster T, et al. Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: A vaccine approach. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000b; 97: 4309-14.
- Aamir UB, Wernery U, Ilyushina N, Webster R.G. Characterization of avian H9N2 influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to 2003. *Virology* 361. 2007; 45-55.
- Banks J, Speidel EC, Harris PA, Alexander DJ. Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. *Avian Pathol*. 29. 2000; 353-60.
- Cameron KR, V Gregorv, I Banks, I.H Brown, DJ Alexander, AJ Hav, et al. H9N2 subtype influenza A viruses in poultry in Pakistan are closely related to the H9N2 viruses responsible for human infection in Hong Kong. 2000.
- Vasfi Marandi M, Bozorgmehri Fard M.H. Isolation of H9N2 Subtype of Avian Influenza Viruses during an Outbreak in Chickens in Iran. *Iranian Biomedical Journal* 6 (1). 2002; 13-17.
- Majidzadeh k, Karimi v, Soleimanidor M, Estabragh AS, Barin A, et al. Phylogenetic Study on Nonstructural (NS) Gene of H9N2 Isolated from Broilers in Iran During 1998-2007. *Pakistan Journal of Biogical Sciences* 14(17): 838-843, 2011, ISSN 1028-8880.
- Macken CA, Webby RJ, Bruno WJ. Genotype turnover by reassortment of replication complex genes from avian influenza A virus. *J Gen Viral* 87. 2006; 2803-15.
- Hale BG, et al. the multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Viral*. 89. 2008; 2359-76.
- Harris BZ, Lim W.A. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *Cell Sci. J*. 2001; 114: 3219-31.
- Nourry C, Grant SGN, Borg I.P. PDZ domain proteins: legend and play Sci; *STKE* 2003: RE7.
- Shin YK, Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA, Zhou Y. Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *J. Gen*. 2007; *Virol* 88:13-18.
- Butt KM, Smith GJ, Chen H, Zhang LJ, Leung YH, Xu KM, et al. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *Clint Microbial*. 2005; 43: 5760-67.
- Hossain MJ, Hickman D, Perez DR. Evidence of expanded host range and mammalian-associated genetic changes in a duck H9N2 influenza virus following adaptation in quail and chickens. *Plos One*. 2008; 3:e3170; doi: 10.1371/journal.pone.0003170.
- Heidari A, Mancin M, Nili H, Pourghanbari GH, Lankarani KB, Leardini S, et al. Serological evidence of H9N2 avian influenza virus exposure among poultry workers from Fars province of Iran. *Virology Journal*. 2016; 13:16.
- Thomas M, Kranjec C, Nagasaka K, Matlashewski G, Banks L. Analysis of the PDZ binding specificities of influenza A virus NS1 proteins. *Virol. J*. 2011; 8: 25.
- Butt AM, Siddique S, Tahir S, Nasrullah I, Hussein M, Idrees M, et al. Comparative sequence; antigenic and phylogenetic analysis of avian influenza (H9N2) surface

- proteins isolated in Pakistan between 1999 and 2008. *Infection Dev. Cries.* 2011; 5: 413-24.
- [27]. Iqbal M, Yaqub T, Reddy K, McCauley JW. Novel genotypes of H9N2 influenza A viruses isolated from poultry in Pakistan containing NS genes similar to highly

- pathogenic H7N3 and H5N1 viruses. *Plos One.* 2009; 4:e5788; doi: 10.1371/journal.pone.0005788.
- [28]. SNaem K, Siddique N, Avaz M, Jalalee MA. Avian influenza in Pakistan: outbreaks of low- and high-pathogenicity avian influenza in Pakistan during 2003-2006. *Avian Dis.* 2007; 51: 189-93.

Genetic Analysis *NS* Gene of *H9N2* Subtype of Influenza Virus A Isolated in Iranian poultry industry in during 2007-2016

Zahra Keivanlou^{1*}, Abdul Hamid Shoushtari²

1. M.Sc. Student in Medical Virology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran
2. Assistant Professor of Department of Poultry Diseases Research, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran

Abstract

Introduction: The *H9N2* influenza virus is of great importance due to the wide range of hosts due to gene rearrangement, which facilitates the possibility across of the Inter-species barrier. This study demonstrates useful information on the homogeneity of the *H9N2* strain of avian influenza virus in Iran with other influenza viruses in Pakistani and Israeli birds for years to come, which emphasizes the need for continuous surveillance of the influenza virus genes and the evolution of strains of the strains in the region.

Materials and Methods: The present study was conducted on the 10 isolates *NS* gene sequence of the *H9N2* influenza virus strain from 2007-2016. After amplification by RT-PCR and genome extraction, the genes were completely Sequencing (it was carried out with the same primer used for gene amplification) and then phylogenetic analysis.

Conclusion: All of these 10 isolates were included in allele A under the Korean lineage with amino acid motif KSEI in the PDZ ligand, which shows the similarity of Pakistani virus genes to C of Iran. *H9N2* viruses are not highly pathogenic, But by transferring to mammalian species like humans, they cause mild illness. These viruses, in addition to connecting to poultry receptors, have the ability to connect to receptors similar to human type strains with changes in amino acids.

Received: 2018/09/30

Accepted: 2018/12/02

Keywords: Influenza Virus, Rearrangement, *NS* gene, RT-PCR, Phylogenetic Analyze.