

تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی ژن NS دو جدایه‌ی آنفلوآنزای H۹N۲ و بررسی خصوصیات رشد این ویروس‌ها بر روی سلول‌های A۵۴۹

دکتر شهلا شاهسوندی^۱، عباس احمدی و سمه‌جانی^۲، محمد شایسته‌پور^۳، کاوه صادقی^۴،
دکتر محمد مجید ابراهیمی^۱، هادی فاضل^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H۹N۲ در طول دو دهه‌ی گذشته در آسیا به صورت پانزوتیک در آمده است. این ویروس، علاوه بر ایجاد بیماری در طیور پرورشی، چندین مورد ابتلای انسانی در آسیا را سبب شده است. این مطالعه به منظور بررسی ارتباط فیلوژنی ژن غیر ساختمانی (NS یا Non structural) و خصوصیات رشدشان بر روی سلول‌های A۵۴۹ در جدایه‌هایی در استان تهران انجام شد.

روش‌ها: از میان ویروس‌های ایزوله شده در سال‌های ۹۱-۱۳۸۸ ویروس آنفلوآنزای H۹N۲، دو ویروس که در درخت فیلوژنتیک جایگاه‌های متفاوتی با هم داشتند، انتخاب شدند و ژن NS طی واکنش RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) تکثیر شد. قطعه‌ی مورد نظر هر جدایه، کلون گردید و پلاسمیدهای حاصل توالی‌یابی شدند. بروز تغییرات احتمالی در توالی ژن NS جدایه‌های مورد نظر با مقایسه با جدایه‌های ثبت شده در پایگاه داده GenBank ارزیابی شد. بر اساس نتایج، رشد این دو جدایه در سلول‌های A۵۴۹ بررسی شد. ارزش GC_{۳۵} و مقایسه‌ی میزان جایگزینی Ka/Ks در نواحی رمز دهنده‌ی ژن بررسی شد.

یافته‌ها: پردازش اولیه‌ی داده‌های فیلوژنی نشان داد که ژن NS ویروس‌های ایران با همسانی ۹۶/۴ درصد به زیر دودمان Y۴۳۹ و آل A تعلق دارند. این ویروس‌ها بر اساس زمان جداسازی در دو زیر گروه زیر گروه یک شامل ویروس‌های جدا شده از طیور پرورشی طی سال‌های ۲۰۰۴-۱۹۹۸ و زیر گروه دوم ویروس‌های جدا شده طی سال‌های ۱۱-۲۰۰۶ قرار گرفتند. ارزش GC_{۳۵} بین ۰/۳۷۱-۰/۳۹۲ متغیر بود و میزان Ka/Ks برای زیر گروه اول ۰/۳۸ و برای زیر گروه دوم ۰/۴۲ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: پردازش توالی اسید آمینه‌ی NS نشان می‌دهد که این دو ایزوله، دارای توالی KSLR در محل دمین PDZ خود هستند و چندین تغییر همزمان در طول توالی اسید آمینه رخ داده است. عیار دو ویروس به روش ارزیابی پلاک برآورد شد که تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. این داده‌ها نشان می‌دهد که دو ویروس H۹N۲ جدید ایران دچار تغییرات بسیار اندکی شده‌اند.

واژگان کلیدی: آنفلوآنزای پرندگان، H۹N۲، ژن Non structural، رده‌ی سلولی A۵۴۹

ارجاع: شاهسوندی شهلا، احمدی و سمه‌جانی عباس، شایسته‌پور محمد، صادقی کاوه، ابراهیمی محمد مجید، فاضل هادی. تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی ژن NS دو جدایه‌ی آنفلوآنزای H۹N۲ و بررسی خصوصیات رشد این ویروس‌ها بر روی سلول‌های A۵۴۹. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۰): ۴۴۱-۴۳۲

۱- استادیار، گروه آنفلوآنزای طیور، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه میکروپزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

۳- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه آنفلوآنزای طیور، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

مقدمه

بیماری آنفلوآنزا به وسیله‌ی ویروس‌های دارای RNA از خانواده‌ی ارتومیکسوویریده ایجاد می‌شود و طیف میزبانی وسیعی از جانوران شامل پرندگان و پستانداران را مبتلا می‌کند (۱-۲). این ویروس‌ها در سه تیپ A، B و C طبقه‌بندی می‌شوند. ویروس‌های آنفلوآنزای تیپ A، ۱۱ پروتئین شامل گلیکوپروتئین‌های سطحی HA، NA، نوکلئوپروتئین (NP یا Nucleolar protein)، ماتریکس (M1، M2)، پروتئین غیر ساختاری (NS یا Non structural) (NS1، NS2) و پروتئین‌های پلی‌مرازی PA، PB1، PB2 و PB1-F2 را رمزدهی می‌کنند (۳-۴). ویروس‌های این تیپ بر اساس گلیکوپروتئین‌های HA و NA به ۱۶ تیپ H و ۹ تیپ N طبقه‌بندی می‌شوند (۳-۴، ۱).

تحت تیپ H9N2 در آسیا، طی یک دوره‌ی طولانی (۸۵-۱۹۷۵) از اردک‌ها در هنگ‌کنگ و سپس در دهه‌ی ۱۹۹۰ به طور گسترده‌ای از طیور پرورشی جدا شد (۵). قابلیت انتقال مستقیم ویروس H9N2 به انسان برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ در هنگ‌کنگ گزارش شد (۷-۵). اگر چه هر ۸ قطعه ژن ویروس‌های آنفلوآنزا در ایجاد بیماری دخالت دارند، اما تأثیر تغییرات سه ژن HA، NS و PB2 در ایجاد سویه‌هایی با توان بیماری‌زایی در مطالعات متعدد مشخص شده است.

پروتئین NS1 دارای چندین عملکرد از جمله تنظیم موقت ساخت RNA ویروسی و مهار پردازش mRNA (Messenger RNA) ویروسی را بر عهده دارد و مهم‌ترین آن‌ها ممانعت از پاسخ ضد ویروسی میزبان با سرکوب تولید اینترفرون نوع I برای حصول

اطمینان از تکثیر مناسب ویروس در سلول است (۸-۹). پروتئین NS به دو گروه آلی A و B تقسیم می‌شود که آل A به ویروس‌های آنفلوآنزای انسانی، خوک، اسب و بعضی از ویروس‌های پرندگان تعلق دارد، در حالی که آل B منحصر به ویروس پرندگان است (۱۰-۱۲).

مطالعه‌ی حاضر با هدف توالی‌یابی و بررسی فیلوژنی ژن NS جدایه‌های SS2/2008 و SS8/2011 ویروس آنفلوآنزای H9N2 و خصوصیات رشدشان در سلول‌های انسانی A549 انجام شد.

روش‌ها

استخراج RNA و آزمایش RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

برای استخراج RNA ویروس‌های آنفلوآنزای H9N2 تهیه شده از نای طیور آلوده، از کیت High pure RNA isolation (Roche, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner پرایمرهای اختصاصی برای تعیین قطعه‌ی کامل ژن NS به طول ۸۹۰ bp با توالی زیر طراحی شدند. برای کلون‌سازی ژن در وکتور pTZ57R/T (Fermentas, Germany)، آنزیم‌های برش دهنده‌ی XhoI در ابتدای پرایمر رفت و آنزیم BamHI در انتهای پرایمر برگشت در نظر گرفتند (F-3').

CTCGAGAGCAAAAAGCAGGGTGACAAA
GGATCCAGTAGAAACAAGG 3' و 5'-AC
GTGTTTTTA-5'-R.

آزمایش RT-PCR با استفاده از کیت

شد (۱۳). پروتوتیپ‌های ویروس H9N2 شامل G1، G9 و Y430 به عنوان شاخص در نظر گرفته شدند. احتمال بروز انتخاب مثبت در این ژن‌ها با مقایسه‌ی الگوی جایگزینی نوکلئوتیدهای غیر مترادف به مترادف که میزان $\omega = Ka/Ks$ در نظر گرفته می‌شود، در نواحی رمز دهنده‌ی ژن با استفاده از Bayesian و پارامتر $1 \geq \omega + \beta$ و تناوب تغییر در سومین نوکلئوتید هر کدون (GC₃s) با استفاده از روش اصلاح شده‌ی Nei-Gojobori تعیین شد (۱۴).

کشت ویروس آنفلوانزا بر روی سلول A549

رده‌ی سلولی A549 (ATCC No CCL-185TM) از بانک سلول انستیتو پاستور ایران تهیه شد. ظرف کشت سلول مدت چهار روز در دمای °C ۳۷ و ۵ درصد CO₂ قرار داده شد تا به حد مناسب پاساژ (۹۰-۸۰ درصد تراکم سلولی) برای کشت برسد. سپس برای ارزیابی پلاک برای هر ویروس، دو پلیت ۶ خانه‌ای با تراکم سلولی 5×10^5 /ml آماده شد. رقت‌های متوالی ۱۰^{-۸} تا ۱۰^{-۱} از هر ویروس، از کشت و خالص‌سازی بر روی تخم مرغ‌های SPF (Specific pathogen free) تهیه شد و برای هر رقت، دو چاهک و برای شاهد منفی یک چاهک در نظر گرفته شد.

پس از یک ساعت قرار دادن در دمای آزمایشگاه، محیط روی سلول‌های هر چاهک خارج شد و محیط Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-پلاک) به آرامی جایگزین شد. پس از بسته شدن محیط، پلیت‌ها در گرمخانه با دمای °C ۳۷ قرار داده شدند تا پلاک‌ها مشاهده و قابل شمارش شوند. با در نظر گرفتن ضریب رقت و حجم ویروس تلقیح شده در هر خانه، عیار ویروس بر مبنای واحد تشکیل دهنده‌ی پلاک در هر میلی‌لیتر (pfu/ml) محاسبه شد.

Maxime RT-PCR pre-mix (Intron biotechnology, Korea) با برنامه‌ی رونوشت‌برداری معکوس °C ۴۵ به مدت ۳۰ دقیقه، غیر فعال کردن آنزیم RT (Reverse transcriptase) در °C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه‌ی واسرشت شامل °C ۹۴ به مدت ۵۰ ثانیه، تکثیر در °C ۵۷ به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش در °C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه انجام شد. ۷ μL از محصول روی ژل آگارز ۱ درصد و با نشانگر مولکولی (bp Plus DNA Ladder, GeneRuler ۱۰۰ Fermentas) به مدت ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۷۰ الکتروفورز شد (شکل ۱).

تعیین توالی ژن NS

محصول DNA ژن NS هر جدایه با استفاده از وکتور InsTAclone PCR cloning کیت PTZ5VR/T (Escherichia coli) E.coli (Fermentas) در باکتری DH5α کلون شد. پس از تأیید پلاسמידهای واجد قطعه با هضم آنزیمی، پلاسמידهای خالص شده برای تعیین توالی ارسال شدند. خوانش توالی به صورت دو طرفه و با پرایمرهای (-۲۰) M13F و (-۴۰) M13R کسه در دو انتهای MCS (Multiple cloning site) وکتور جای دارند، انجام گردید. توالی‌های کامل ژن NS دو ویروس H9N2 جدایه‌های سال‌های ۱۱-۲۰۰۸ ایران در پایگاه داده‌ی GenBank با کدهای شناسایی JX308791- و JX308789- به ثبت رسیدند.

بررسی‌های فیلوژنی

توالی ژن NS جدایه‌ها با سایر توالی‌های ثبت شده در Gene bank مقایسه شدند. با پردازش حداقل دگرگونی بر مبنای Maximum Likelihood و یک هزار بار تکرار با نرم‌افزار MEGA۴ نسخه‌ی ۴ رسم

یک مورد استثنا) و زیر گروه دوم ویروس‌های جدا شده طی سال‌های ۱۱-۲۰۰۶ هستند. تمامی جدایه‌های ایران به آل A تعلق دارند.

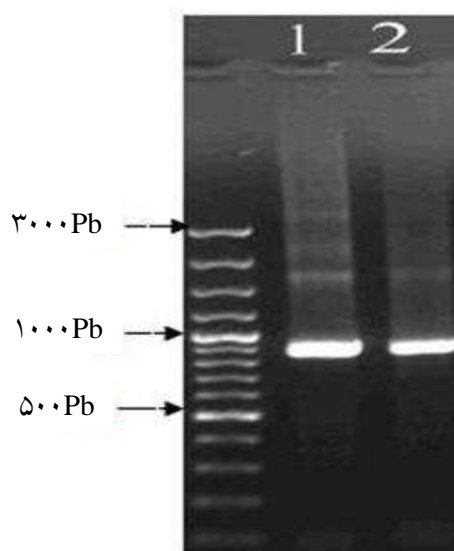
برای ارزیابی تکامل ژن NS در ویروس‌های H9N2 ایران، انتخاب مثبت با محاسبه‌ی ارزش GC_{3s} و مقایسه‌ی میزان جایگزینی Ka/Ks در نواحی رمز دهنده‌ی ژن بررسی شد. ارزش GC_{3s} از ۰/۳۷۱ تا ۰/۳۹۲ متغیر بود و عدد کمتر از واحد نشان دهنده‌ی این است که تغییر کدون‌ها در ژن NS بسیار کم رخ داده است. میزان Ka/Ks، برای زیر گروه اول ۰/۳۸ و برای زیر گروه دوم ۰/۴۲ محاسبه شد. میزان کمتر از یک بیانگر این است که در روند دگرگونی ژن NS این ویروس‌ها، انتخاب منفی غالب است؛ بدین معنی که این ژن دگرگونی کمی پیدا کرده و میزان آن در جدایه‌های سال‌های ۲۰۰۶ به بعد اندکی بیشتر از جدایه‌های قبل است.

برای درک دینامیک جهش ژن، توالی اسیدآمینهای NS ویروس‌های این زیر دودمان بر مبنای توالی نوکلئوتیدی آن تهیه شد. پردازش توالی‌ها نشان می‌دهد که همگی این ویروس‌ها دارای توالی KSLR در محل دمین PDZ خود هستند که مشخصه‌ی ویروس‌های H9N2 است. موتیف DRLRRDQKSLR در NLS₁ موقعیت ۴۴-۳۴ به طور کامل حفظ شده است. چندین تغییر همزمان در NS ویروس‌های زیرگروه دو ایران به‌طور ثابت رخ داده‌اند. این تغییرات بیانگر وجود محل‌هایی هستند که احتمال بروز انتخاب مثبت در آن‌ها وجود دارد و شامل موقعیت‌های: R55E، S8VP، T112A، N139D، A143T، E223A و K245E هستند. رخداد انتخاب مثبت در کدون‌ها ارزیابی شد. با مقایسه‌ی دو

عیار دو ویروس در رده‌ی سلولی A549 به روش ارزیابی پلاک تعیین شد. میانگین پلاک‌های تشکیل شده بر روی سلول از مجموع میانگین سه نوبت آزمایش و انحراف معیار با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) به دست آمد.

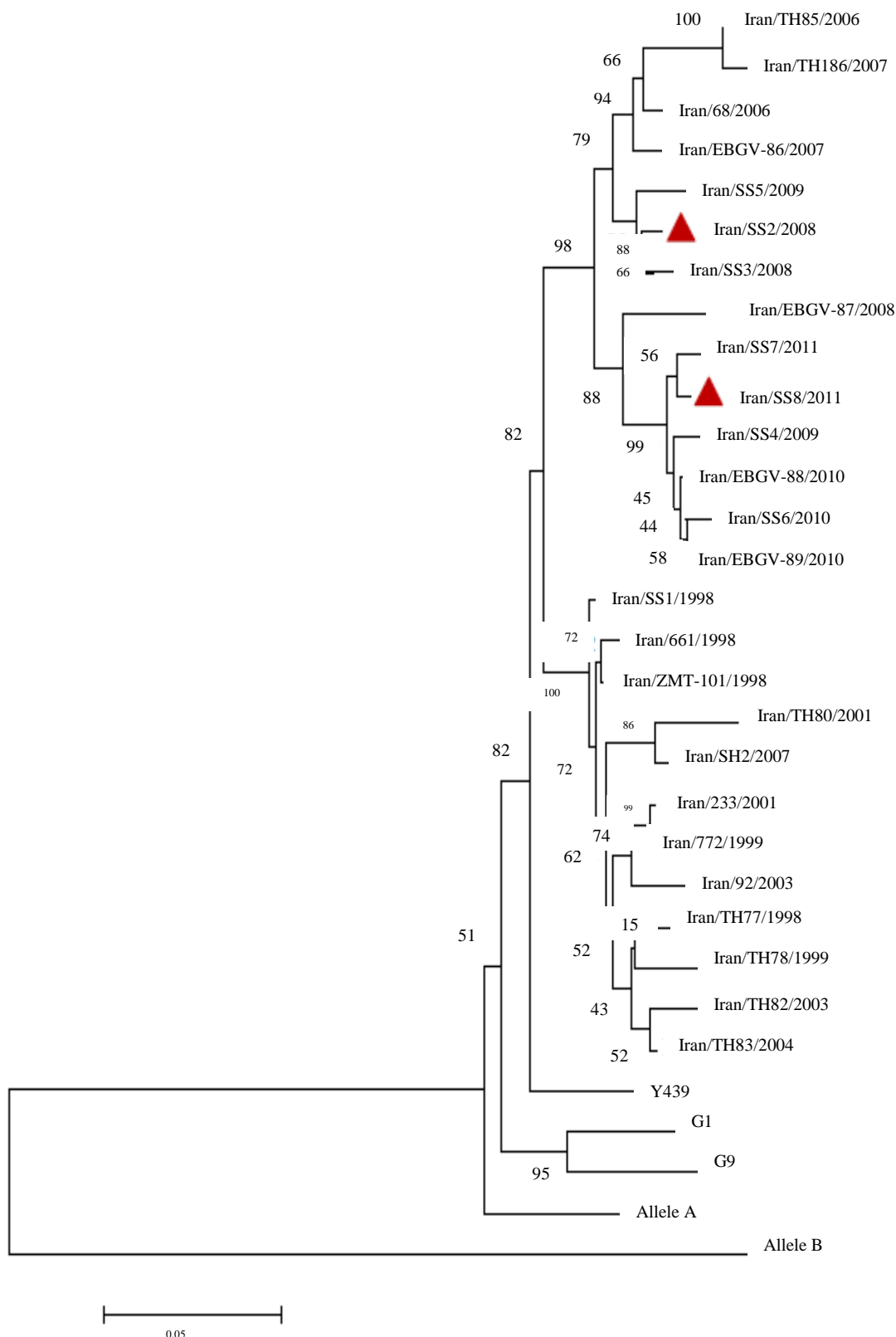
یافته‌ها

محصول PCR ژن NS ویروس‌های H9N2 ویروس آنفلوانزا با طول ۸۹۰ bp بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

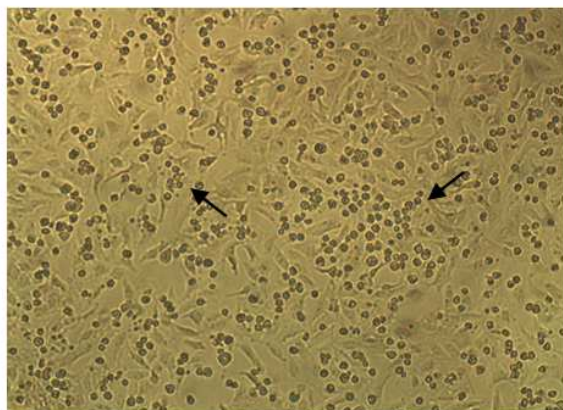


شکل ۱. الکتروفورز محصول RT-PCR ژن NS ویروس آنفلوانزای H9N2 با Ladder ۱۰۰ bp. ۱: SS2/2008، ۲: SS8/2011

پردازش اولیه‌ی داده‌های فیلوژنی در شکل ۲ نشان می‌دهد که در توالی ژن NS ویروس آنفلوانزای H9N2 جدایه‌ها به زیر دودمان Y439 تعلق دارند و ارتباط نزدیک بین آن‌ها با ۹۶/۴ درصد همسانی وجود دارد. جدایه‌های ایران در دو زیر گروه قرار می‌گیرند: زیر گروه یک شامل ویروس‌های جدا شده از طیور پرورشی طی سال‌های ۲۰۰۴-۱۹۹۸ (به جز



شکل ۲. درخت فیلوژنی بر اساس توالی ژن NS ویروس‌های آنفلوآنزای H₉N₂ که با استفاده از MEGA ترسیم شده است (▲ ویروس‌های آنفلوآنزای H₉N₂ جدا شده در این مطالعه)



ب



الف

شکل ۳. سلول A549. الف) سلول‌های شاهد، ب) سلول‌های آلوده شده با ویروس آنفلوآنزای H9N2. علامت آسیب سلولی شامل بزرگ شدن و دانه‌دار شدن سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت مشاهده می‌شوند که با فلش سیاه رنگ نشان داده شده‌اند (بزرگ‌نمایی $\times 10$)

آماری تفاوت معنی‌داری ($P < 0/01$) با هم نداشتند.

بحث

در چند سال اخیر، انتشار گسترده‌ی ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان در کشورهای مختلف و انتقال مستقیم آن‌ها به جمعیت‌های انسانی، باعث نگرانی در سطح افکار عمومی جهان شده است. تمام تحت تیپ‌های ویروس آنفلوآنزای A در پرندگان آبزی و مهاجر وجود دارند و قادرند به انسان نیز منتقل شوند. خطر گسترش آنفلوآنزای پرندگان که عامل آن به طور مستقیم به انسان منتقل می‌شود، عواقب اجتماعی و اقتصادی بسیاری را در پی خواهد داشت (۱۶-۱۵). عواملی مانند پتانسیل ویروس‌های تحت حاد برای تبدیل به ویروس‌های فوق حاد، انتقال ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان به انسان و کسب پتانسیل انتقال فرد به فرد سبب شده‌اند تا رخدادهای آنفلوآنزا در پرندگان اهلی تحت کنترل قرار گیرند.

مطالعات نشان داده‌اند چنانچه در میزبان حیوانی تغییری در اسیدهای آمینه مسئول شناسایی و تنظیم

زیر گروه، یک موقعیت با احتمال رخداد بیش از ۰/۵ مشخص شد که نزدیک انتهای آمینی NLS (Nuclear localization sequence) در موقعیت ۲۲۳ قرار دارد. برآورد انتخاب مثبت با تعیین رادیکال و یا خنثی بودن جایگزینی اسیدهای آمینه تأیید شد. بیشترین جایگزینی در اسیدهای آمینه‌ی NS این ویروس‌ها از نوع رادیکال است که در نتیجه‌ی انتخاب منفی حذف می‌شوند. این انتخاب منفی، تناوب تنوع را کاهش می‌دهد.

سلول‌های A549 با دو ویروس H9N2 جدایه‌های NS و ترسیم درخت در دو مکان مجزا قرار گرفته‌اند، آلوده شدند. با توجه به شکل ۳، در نتیجه‌ی آلوده‌سازی، علامت آسیب سلولی شامل بزرگ شدن و دانه‌دار شدن سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای 37°C قابل مشاهده بودند.

برای جدایه‌ی SS2/2008 عیار ویروس (PFU یا plaque forming unit) $4/34 \pm 0/20$ و برای جدایه‌ی SS8/2011 عیار $4/52 \pm 0/20$ برآورد شد که از نظر

رسیده‌اند، مقایسه گردیدند. این ویروس‌ها بر اساس زمان جداسازی در دو زیر گروه قرار می‌گیرند. اگر چه بین آن‌ها همسانی بسیار زیادی وجود دارد. میزان کمتر از یک برای Ka/Ks بیانر این است که در روند تکامل ژن NS ویروس‌های ایران انتخاب منفی غالب است و عدد کمتر از واحد در ارزش GC_{3s} نشان دهنده‌ی این است که تغییر کدون‌های اسید آمینه در آن بسیار کم رخ داده است.

طبق درخت فیلوژنی رسم شده در شکل ۲، در زیر گروه دو، سه جدایه‌ی سال‌های ۲۰۰۸-۰۹ در یک دسته قرار می‌گیرند. در حالی که بقیه با ویروس‌های ۲۰۱۰ یک دسته‌ی مجزا را تشکیل می‌دهند (۲۲-۲۰). این تفاوت بین جدایه‌های سال‌های ۲۰۰۸-۱۱ این مسأله را بر می‌انگیزد که «آیا فشارهای انتخابی ناشی از وجود تحت تیپ‌های دیگر، بار ایمنی ناشی از واکنش‌های همسایه، سبب تغییر در پرنده‌گان آبری از کشورهای همسایه، سبب تغییر در آسیب‌زایی ویروس و سازگاری آن با میزبان جدید شده است؟». برای این منظور، سلول‌های A549 با دو جدایه‌ی SS2/2008 و SS8/2011 که در درخت فیلوژنی در دو مکان مجزا قرار گرفته‌اند، آلوده شدند. با توجه به شکل ۳، نتیجه‌ی آلوده‌سازی برای هر دو یکسان بود و علایم آسیب سلولی مشابه شامل بزرگ شدن و دانه‌دار شدن سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون مشاهده شدند که نظر آماری عیار ویروس‌ها تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند.

به دنبال ظهور ویروس H9N2 در آسیا از دهه‌ی ۱۹۹۰، تغییرات زیادی در ژن‌های این ویروس به ویژه از کشور چین گزارش شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهند که این ویروس علاوه بر توانایی اتصال

اختصاصی بودن اتصال ویروس به گیرنده از ۵۲،۶ به ۵۳،۲ در پروتئین HA ایجاد شود، یا سرین با پرولین در موقعیت ۴۲، اسید گلوتامیک در جایگاه ۹۲ و جایگزینی اسید آمینه‌ی آلانین با والین در موقعیت ۱۴۹ پروتئین NS1 صورت گیرد، که سبب توانایی ویروس برای فرار از پاسخ‌های ضد ویروسی سیتوکینی میزبان شود و یا در جایگاه‌های ۶۲۷ و ۷۰۱ پروتئین PB2 جهش رخ دهد، ویروس توانایی جدیدی برای تطبیق با میزبان جدید و انتشار آلودگی کسب می‌نماید (۱۷).

اتفاق نظری وجود دارد که تحت تیپ H9N2 در مناطق وسیعی از آسیا بومی است و توانایی انتشار جهانی را دارد (۱۹-۱۸). چون ایران در دو مسیر مهاجرت پرنده‌گان آبری (آسیای غربی- آفریقای شرقی و دریای سیاه- مدیترانه) قرار دارد؛ برای کاهش احتمال پدیده‌ی بازآرایی و یا نوترکیبی با ویروس H5N1 و جلوگیری از بروز ژنوتیپ‌های جدید ویروس H9N2، باید در مورد پیشگیری و کنترل طولانی مدت بیماری آنفلوآنزای پرنده‌گان اقدام جدی و به موقع به عمل آید. برای اعمال مؤثرترین شیوه‌های پیشگیری، ضروری است که دقیق‌ترین داده‌های علمی درباره‌ی ویروس عامل آنفلوآنزای پرنده‌گان وجود داشته باشد.

در این پژوهش برای ارزیابی تغییرات احتمالی در ژن‌های مسؤو آسیب‌زایی و تطبیق با میزبان انسانی، بر روی ۲ ویروس آنفلوآنزای H9N2 که در سال‌های ۲۰۰۸-۱۱ از موارد ابتلای طیور پرورشی جدا شده بودند، بررسی لازم صورت گرفت. بر این اساس، ژن NS در وکتور انتقال و تعیین توالی شده و با سایر جدایه‌های ایران که از سال ۱۹۹۸ تا کنون به ثبت

H9N2 در منطقه‌ی آسیا (۲۵) و توانایی سازگاری این ویروس با میزبان‌های مختلف به ویژه خوک و انسان، مطالعه‌ی مستمر ژنومی این ویروس و بررسی دینامیک تغییرات احتمالی در سازش یافتن با میزبان جدید ضروری به نظر می‌رسد.

می‌توان چنین نتیجه گرفت که ویروس‌های H9N2 ایران در ژن NS خود دچار جهش‌های نقطه‌ای شده‌اند و این تغییرات بیشتر به حالت انتخاب منفی بوده است. در جایگاه‌های ۴۲، ۹۲ و ۱۴۹ پروتئین NS، تغییراتی که باعث افزایش تکثیر و بیماری‌زایی ویروس می‌شود، رخ نداده است. همچنین داده‌ها نشان می‌دهد که اختلاف اندکی بین ویروس‌های H9N2 ایران وجود دارد و تغییرات ژنتیکی به سمت میزبان انسانی در ایزوله‌های ایران مشاهده نمی‌شود.

تشکر و قدردانی

منابع مالی اجرای این پژوهش توسط مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تأمین گردیده است. بدین وسیله از این دست اندر کاران این مؤسسه و نیز سرکار خانم دکتر مسعودی و جناب آقایان دکتر بخشش که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

به گیرنده‌های اختصاص یافته برای طیور، به علت بروز جهش در گلیکوپروتئین‌های سطحی، توانایی اتصال به گیرنده‌های NeuAcα۶،۲Gal سویه‌های انسانی را نیز کسب کرده است و توانایی انتقال مستقیم به انسان را دارد.

در سال‌های اخیر، علاوه بر تغییرات ژنومی در گلیکوپروتئین‌های سطحی این ویروس، ژن‌های NS۱ و PB۲ نیز دستخوش تغییر شده و ژنوتیپ‌های متعدد H9N2 از پاکستان (۲۲)، چین (۲۳) و هند (۲۴) گزارش شده‌اند. از نظر فیلوژنی، جدایه‌های چین بر خلاف ویروس‌های ایران و پاکستان، به زیر دودمان G۱ تعلق دارند (۲۵). فشار انتخابی در NS که یک پروتئین غیر ساختمانی است و به میزان بسیار کمی تحت فشار ایمنی قرار می‌گیرد، توجیه کننده‌ی این تغییرات نیست و می‌توان بروز جهش‌های نقطه‌ای و وقوع پدیده‌ی بازآرایی ژنی در نتیجه‌ی مهاجرت پرندگان را مورد توجه قرار داد (۲۶، ۲۱-۲۰، ۱۵).

Iqbal و همکاران (۲۲) ظهور ژنوتیپ جدید H9N2 را در پاکستان گزارش کردند که ژن NS آن دستخوش بازآرایی با تحت تیپ HVN۳ شده بود. با در نظر گرفتن شباهت بین جدایه‌های ایران با جدایه‌های پاکستان (۲۲) وجود ژنوتیپ‌های متعدد

References

1. Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 1533-79.
2. Skehel JJ, Waterfield MD. Studies on the primary structure of the influenza virus hemagglutinin. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72(1): 93-7.
3. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev 1992; 56(1): 152-79.
4. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. Bull World Health Organ 1980; 58(4): 585-91.
5. Shortridge KF. Pandemic influenza: a zoonosis? Semin Respir Infect 1992; 7(1): 11-25.
6. Cameron KR, Gregory V, Banks J, Brown IH, Alexander DJ, Hay AJ, 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. Virology

- 2000; 278(1): 36-41.
7. 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. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11): 5760-7.
 8. Wang W, Riedel K, Lynch P, Chien CY, Montelione GT, Krug RM. RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *RNA* 1999; 5(2): 195-205.
 9. Nemeroff ME, Qian XY, Krug RM. The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo. *Virology* 1995; 212(2): 422-8.
 10. Ludwig S, Wang X, Ehrhardt C, Zheng H, Donelan N, Planz O, et al. The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol* 2002; 76(21): 11166-71.
 11. Ludwig S, Schultz U, Mandler J, Fitch WM, Scholtissek C. Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses. *Virology* 1991; 183(2): 566-77.
 12. Treanor JJ, Snyder MH, London WT, Murphy BR. The B allele of the NS gene of avian influenza viruses, but not the A allele, attenuates a human influenza A virus for squirrel monkeys. *Virology* 1989; 171(1): 1-9.
 13. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24(8): 1596-9.
 14. Shapiro GI, Krug RM. Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol* 1988; 62(7): 2285-90.
 15. Choi YK, Ozaki H, Webby RJ, Webster RG, Peiris JS, Poon L, et al. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China. *J Virol* 2004; 78(16): 8609-14.
 16. Kwon JS, Lee HJ, Lee DH, Lee YJ, Mo IP, Nahm SS, et al. Immune responses and pathogenesis in immunocompromised chickens in response to infection with the H9N2 low pathogenic avian influenza virus. *Virus Res* 2008; 133(2): 187-94.
 17. Monne I, Ormelli S, Salviato A, De BC, Bettini F, Salomoni A, et al. Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7, and H9 avian influenza viruses. *J Clin Microbiol* 2008; 46(5): 1769-73.
 18. Das A, Suarez DL. Development and bench validation of real-time reverse transcription polymerase chain reaction protocols for rapid detection of the subtypes H6, H9, and H11 of avian influenza viruses in experimental samples. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19(6): 625-34.
 19. Gall A, Hoffmann B, Harder T, Grund C, Hoper D, Beer M. Design and validation of a microarray for detection, hemagglutinin subtyping, and pathotyping of avian influenza viruses. *J Clin Microbiol* 2009; 47(2): 327-34.
 20. Nili H, Asasi K. Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. *Avian Pathol* 2002; 31(3): 247-52.
 21. Nili H, Asasi K. Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. *Avian Dis* 2003; 47(3 Suppl): 828-31.
 22. 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(6): e5788.
 23. Bi J, Deng G, Dong J, Kong F, Li X, Xu Q, et al. Phylogenetic and molecular characterization of H9N2 influenza isolates from chickens in Northern China from 2007-2009. *PLoS One* 2010; 5(9).
 24. Butt AM, Siddique S, Idrees M, Tong Y. Avian influenza A (H9N2): computational molecular analysis and phylogenetic characterization of viral surface proteins isolated between 1997 and 2009 from the human population. *Virology* 2010; 7: 319.
 25. Fazel H, Shahsavandi S, Masoudi S, Ebrahimi M, Taghizadeh M. Evolutionary characterization of non-structural gene of H9N2 influenza viruses isolated from Asia during 2008-2012. *Comp Clin Pathol* 2014; 23(3): 523-8.
 26. Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* 2001; 281(2): 156-62.

Sequencing and Phylogenetic Analysis of NS Gene of Two Isolates of H9N2 Influenza Virus and the Growth Characteristics of the Virus on A549 Cells

Shahla Shahsavandi PhD¹, Abbas Ahmadi-Vasmehjani², Mohammad Shayestehpour MSc³, Kaweh Sadeghi MSc⁴, Mohammad Majid Ebrahimi PhD¹, Hadi Fazel MSc³

Original Article

Abstract

Background: Avian influenza virus of H9N2 subtype has become panzootic during the last two decades in Asia. In addition to causing disease in poultry, this virus has been identified as the reason for several human diseases in Asia. The present study aimed to investigate the phylogenetic relationship between NS gene of two viruses (SS2\2008 and SS8\2011) and other Iranian isolated viruses, and we characterized the growth ability of two viruses in human A549 cell.

Methods: Among the H9N2 viruses isolated from 2008 to 2011, two isolated were placed in different positions in the phylogenetic tree. The whole NS gene fragments of two virus isolates were amplified using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method; the fragment of each isolate was cloned and then sequenced. Possible changes in the NS gene sequence of isolates were compared with subtypes registered in Gene Bank Database and their growth abilities in human A549 cells were evaluated. GC_{3s} value and replacement rate of Ka/Ks value in NS gene locus were compared.

Findings: The initial phylogenetic process revealed that the NS gene of Iranian isolates had a homology of 96.4% belonging to clade Y439 and Allele A. These viruses, based on the time of isolation, were divided into two subgroups of viruses isolated from poultry during the years 1998-2004 and viruses isolated during a time course of the years 2006-2011. GC_{3s} value varied between 0.371-0.392 and the Ka/Ks value NS gene locus was 0.38 and 0.42 in subgroups 1 and 2, respectively.

Conclusion: Processing of NS amino acid sequence not only exhibited that these two isolates contained KSLR sequence in their PDZ domain and but also it revealed that multiple simultaneous changes had been occurred. The viruses titers of two isolates, based on plaque assay, were not statistically significant. These data demonstrate that two Iranian H9N2 isolates are affected by some genetic drifts.

Keywords: Avian influenza, H9N2 Subtype, PDZ domain

Citation: Shahsavandi Sh, Ahmadi-Vasmehjani A, Shayestehpour M, Sadeghi K, Ebrahimi MM, Fazel H. **Sequencing and Phylogenetic Analysis of NS Gene of Two Isolates of H9N2 Influenza Virus and the Growth Characteristics of the Virus on A549 Cells.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(280): 432-41

1- Assistant Professor, Department of Avian Influenza, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

2- MSc Student, Department of Microbiology, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

3- PhD Student, Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Department of Avian Influenza, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

Corresponding Author: Hadi Fazel MSc, Email: hadi.fazel@gmail.co