

بررسی ژنتیکی مقاومت به آمانتادین در ویروس آنفلوآنزای H9N2 پرندگان در ایران بین سال‌های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۸

اصلان آقاحسین فنی^۱، عباس برین^{۱*}، فرهاد موسی خانی^۲، آرش قلیانچی لنگرودی^۳

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی، کرج، ایران

۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی، کرج، ایران

۳. دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: abarin05@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۰/۳/۸، پذیرش نهایی: ۹۰/۷/۲۳)

چکیده

در سال ۱۳۷۷ یک اپیدمی از آنفلوآنزای پرندگان در ایران شیوع پیدا نمود که عامل بسیاری از تلفات در مرغداری‌های ایران گشت. تحقیقات به عمل آمده نشان داد که عامل پیدایش این همه‌گیری، ویروس آنفلوآنزای پرندگان با تحت تیپ H9N2 می‌باشد. به جهت درمان و پیشگیری عفونت‌های ناشی از ویروس‌های آنفلوآنزای A در جهان، داروهای ضد آنفلوآنزای آمانتادین و ریمانتادین (آدامانتان‌ها) مورد استفاده قرار می‌گرفتند که با افزایش مقاومت ویروس آنفلوآنزا در برابر این داروها در سال‌های اخیر استفاده از آنها محدود گردیده است. در یک بررسی مقایسه‌ای بین سال‌های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۸ در ایران، به جهت ارزیابی مقاومت به آمانتادین در ویروس‌های آنفلوآنزای A پرندگان تحت تیپ H9N2 تحقیقات خود را بر ساختار ژنتیکی ویروس، جایی که آمانتادین بیشترین اثر خود را روی کانال پروتئینی M2 برجای می‌گذارد، معطوف نمودیم. دو گروه ویروس آنفلوآنزای پرندگان با تحت تیپ H9N2 مشتمل بر پنج نمونه ویروس مورد بررسی، مربوط به دو دوره زمانی (۱۳۷۷-۱۳۸۵ و ۱۳۸۶-۱۳۸۸) در تخم مرغ جنین‌دار جداسازی شدند، سپس تحت آزمایشات واکنش-های زنجیره‌ای پلیمرز به روش نسخه برداری معکوس (RT-PCR) و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز قرار گرفته و جهت تعیین توالی فرستاده شدند. تحلیل توالی ژنی پروتئین ماتریکس M2 نشان می‌داد که در قسمت‌های مجزا از این توالی، تعویض اسیدهای آمینه نسبت به توالی مورد توافق رخ داده است و کلیه جدایه‌های مقاوم، جهش‌های نقطه‌ای سرین به اسپارژین (S31N) را که در جایگاه ۳۱ منجر به مقاومت به آمانتادین می‌شود، در برداشتند. در بررسی که جهت تعیین آگاهی از تاثیرپذیری ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان به آمانتادین صورت گرفت مقاومت به آمانتادین در ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در ایران در سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸ گزارش شد. از این رو توصیه می‌گردد جهت درمان و پیشگیری عفونت‌های ناشی از ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در مزارع، مصرف خودسرانه آمانتادین صورت نپذیرد. همچنین به نظر می‌رسد آزمایشات عملی تأثیرپذیری دارو در شرایط درون تنی نیز، می‌تواند متضمن استعمال مؤثر آن دارو گردد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، دوره ۵، شماره ۴، پیاپی ۲۰، صفحات: ۱۳۹۵-۱۳۸۷.

کلید واژه‌ها: تحت تیپ H9N2، پروتئین ماتریکس M2، مقاومت به آمانتادین، ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان

مقدمه

آنفلوانزا یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین عفونت‌های ویروسی می‌باشد. آنفلوانزای A، باعث اپیدمی و حتی پاندمی‌های شدید بیماری‌های حاد تنفسی کشنده می‌باشد که سالیانه باعث مرگ و میر و تلفات انسانی و حیوانی^۱ می‌گردد (۳ و ۲۰). در آخرین پاندمی که به واسطه ویروس آنفلوانزای خوکی H1N1 در دنیا بوقوع پیوست، به نقل از مرکز جهانی کنترل دارو و پیشگیری^۲ از ۶۱ میلیون بیمار در سال ۲۰۱۰-۲۰۰۹ در جهان، ۱۲/۴۷۰ نفر جان باختند (۶). ویروس‌های آنفلوانزا جزء خانواده ارتومیکسو ویروس‌ها^۳ هستند که دارای ۵ جنس به نام‌های آنفلوانزای A, B, C, A, توگوتوویروس^۴ و آیزاوویروس^۵ می‌باشند (۱۳ و ۲۰). ویروس‌های آنفلوانزا، چند شکلی بوده و به صورت لوله‌ای یا کروی دیده می‌شوند. پوشش خارجی^۶ این ویروس دارای دو گلیکوپروتئین سطحی، هم‌گلوبینین (HA) و نورآمینیداز (NA) بوده و درون آن، پروتئین‌های ماتریکس (M1) و غشائی (M2) قرار دارند. ژنوم ویروس‌های آنفلوانزای A و B از ۸ قطعه متفاوت و مارپیچی نوکلئوکسپید تشکیل شده است که هرکدام از آنها، دارای RNA با سنس منفی، نوکلئوپروتئین و ترانس کریپتاز می‌باشند (۳). پروتئین M2، یک پروتئین تترامری سراسری غشاء می‌باشد، که یک کانال یونی را در سمت پوششی ویروس آنفلوانزا ایجاد می‌کند. کانال، خود یک هوموتترامر متشکل از چهار واحد کاملاً همسان (M2) می‌باشد. زیر واحدهای مارپیچ به‌وسیله دو باند دی‌سولفید به هم متصل شده و به‌وسیله pH پائین (pH اسیدی) فعال می‌گردند. مشخص شده است که پروتئین M2 یک کانال یونی تنظیم کننده اسیدیته است و نقش بزرگی در انتقال و جریان یافتن پروتن از اندوزوم اسیدی بدرون ویروس، جهت تفکیک پروتئین ماتریکس M1 از

ریبونوکلئوپروتئین (RNP) دارا می‌باشد. به بیان دیگر پروسه پوشش برداری^۷ را ایجاد نموده و انتشار را افزایش می‌دهد (۱۶ و ۱۸). پروتئین M2 از سه زیر واحد پروتئینی شامل: انتهای^۸ N^۸ و در معرض با محیط خارج، ناحیه تراغشائی^۹ که آبگریز می‌باشد و انتهای^{۱۰} C^{۱۰}، متمایل به سمت درون ذره ویروسی تشکیل شده است. چهار مارپیچ تراغشائی که به‌طور بسیار محکم به هم بسته شده‌اند، یک کانال دراز و باریکی را ایجاد می‌کنند، که در آن His37 گیرنده pH بوده و Trp41 به‌عنوان دروازه یا دریچه عمل می‌کند. مارپیچ‌های تراغشائی در میان چهار مارپیچ متمرکز شده با یک زاویه پیچش چپگرد در حدود ۲۳ درجه تجمع می‌یابند و سوراخ منفذ را تشکیل می‌دهند. مارپیچ‌های تراغشائی در یک انتها به‌وسیله دی‌سولفیدهای N-terminal و در انتهای دیگر به‌وسیله انتهای C-terminal گسترش یافته‌اند. مدل‌های ساختاری زیادی از این کانال بر اساس آنالیز توالی جهش‌زائی و تصویربرداری با رزونانس مغناطیسی^{۱۱} سه بعدی، ساخته شده است. بر اساس تصویر برداری NMR مشخص شده است که Ala30، Val27 و Gly34 سطح پوشش منفذ را تشکیل می‌دهند، بلکه Leu26، Ser31 و Leu38 در فشرده‌سازی مارپیچ-مارپیچ تراغشائی، به‌عنوان میانجی عمل می‌کنند (۱۸). نتایج نشان می‌دهند که موتاسیون S31N گردهمائی و تجمع تترامری کانال را به شدت کاهش می‌دهد. موتاسیون‌های ایجاد کننده مقاومت، بسته بندی مارپیچی ناحیه تراغشائی را سست نموده و ناهمگنی ساختاری را در حالت بسته شده افزایش می‌دهد. موتاسیون S31N فشرده سازی مارپیچی TM را سست نموده و در نتیجه دارو کانال را

Uncoating-⁷N-terminal-⁸TM) (TransMembrane-⁹C-terminal-¹⁰Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-¹¹Enzootic-¹Centers for Disease Control and Prevention (CDC)-²Orthomyxoviridae-³Togoto virus-⁴Isavirus-⁵Envelope-⁶

بنابراین این داروها ممکن است همیشه مؤثر واقع نشوند. مطالعات بیشتر برای نشان دادن تأثیر این داروها مورد نیاز می-باشد که در هنگام شناسایی عامل بیماری آنفلوآنزای پرندگان، جهت درمان ویروس‌ها باید مورد تست حساسیت به داروهای ضد ویروس آنفلوآنزا قرار گیرند (۵). جلوگیری از مقاومت دارویی و همچنین ممانعت از تشکیل تیپ‌های جدید مقاوم به دارو در ویروس‌های آنفلوآنزای نوع A پرندگان در سطح مراکز بهداشتی درمانی و طبعاً گسترش و شیوع آن در جامعه از عواملی بود که ما را بر انجام این تحقیق معطوف نمود. از ضرورت‌های خاص انجام این تحقیق، با مشخص شدن مقاومت یک ویروس آنفلوآنزا به یک دارو، این است که بایستی از مصرف و استعمال آن خودداری گردد، بدین جهت که اکثر تحت تیپ‌های آنفلوآنزا مشترک بین انسان و حیوان می‌باشند و این تحت تیپ که لطمات مؤثری بر گله‌های طیور وارد می‌آورد، از هزینه بالایی که صاحبان مرغداری‌ها جهت خرید داروی مقاوم شده صرف می‌نمایند، ممانعت به عمل می‌آورد. همچنین از آن جهت که دائماً ویروس آنفلوآنزا در حال تغییر ترتیب ژنی می‌باشد از مقاوم شدن تحت تیپ‌های دیگر ویروس نسبت به دارو جلوگیری بعمل خواهد آمد.

در سال ۱۳۷۷ در ایران آنفلوآنزای پرندگان شیوع پیدا نمود که لطمات اقتصادی بالایی به صنعت مرغداری کشور وارد آورد، در جداسازی‌های صورت گرفته، عامل مؤثر، زیر گونه با بیماری-زائی اندک H9N2 شناخته شد. در طول دوره زمانی ۱۹۹۸-۱۹۹۴، زیر گونه H9N2 در دیگر نقاط جهان نیز به‌طور قابل توجهی شیوع پیدا نمود (۱۴، ۱۵ و ۱۷). در این بررسی سعی شد تا توالی‌های اسید آمینه و نوکلئوتیدی پروتئین ماتریکس M2 از ویروس‌های جدا شده در دو دوره زمانی (۱۳۸۵-۱۳۷۷ و ۱۳۸۸-۱۳۸۶) پنج تحت تیپ H9N2 در ایران از نظر حساسیت و یا مقاومت به داروی ضد ویروس آمانتادین مورد بررسی قرار گیرند.

از هم گسیخته می‌کند. بالتجیه، میل ترکیبی دارو مادامیکه فعالیت کانال محافظت شده است، به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد و مقاومت به آمانتادین را القاء می‌نماید (۱۶).

داروهای پایه آمانتان، آمانتادین و ریمانتادین، که هدفی برای کانال M2 می‌باشند، به‌عنوان اولین انتخاب داروهای ضد ویروسی بر علیه شیوع جمعی ویروس‌های آنفلوآنزای A برای سال‌های متمادی مورد استفاده قرار می‌گرفتند، اما اخیراً مقاومت به آمانتان‌ها گسترش یافته است (۸، ۱۰ و ۱۸). آمانتادین همانندسازی ویروس‌های آنفلوآنزای A را به‌وسیله ممانعت از پوشش برداری ویروس، در درون سلول مانع می‌شود. همانند ریمانتادین، یک مهارکننده کانال یونی M2 می‌باشد، که کانال یون تشکیل شده به‌وسیله پروتئین ماتریکس M2 را سد می‌کند (۱۱). جهش‌های مشخصی که در مقاومت به آمانتادین در ژن M2 نقش دارند، جهش‌هایی را شامل می‌شوند که در جایگاه-های اسید آمینه G34E، S31N، A30T، V27A، L26F و L38F ایجاد می‌گردند (۱ و ۱۸).

اگر چه ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان، معمولاً انسان را آلوده نمی‌کند، موارد نادری از آلودگی انسان با ویروس آنفلوآنزای پرندگان گزارش شده است. اغلب عفونت‌های انسانی که با ویروس آنفلوآنزای مرغی رخ داده است پس از تماس مستقیم با پرندگان آلوده صورت گرفته است. از نوامبر سال ۲۰۰۳، حدود ۴۰۰ مورد عفونت انسانی با آنفلوآنزای پرندگان توسط بیش از دوازده کشور در آسیا، آفریقا، اقیانوس آرام، اروپا و شرق نزدیک منتشر شده است. سازمان بهداشت جهانی^۱، اغلب موارد انسانی ابتلا به ویروس آنفلوآنزای پرندگان را نتیجه تماس مستقیم با پرندگان بیمار یا مرده آلوده گزارش می‌نماید (۴). مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که برخی از داروهای ضدویروسی که برای ویروس آنفلوآنزای انسانی تأیید شده‌اند در درمان عفونت آنفلوآنزای پرندگان در انسان‌ها نیز کارآمدند. با این حال، ویروس‌های آنفلوآنزا می‌توانند به این داروها مقاوم باشند،

^۱-World Health Organization (WHO)

مواد و روش‌ها

نمونه‌های ویروسی: ۵ نمونه ویروس از بخش علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، با مشخصات آورده شده در (جدول ۱) اخذ گردید. نمونه‌ها مربوط به گله‌های گوشتی مرغداری‌های استان تهران و حومه بودند که در طی سالهای ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۸ جداسازی گردیدند.

جداسازی ویروس: دو گروه ویروس آنفلوآنزای پرندگان با تحت تیپ H9N2 مشتمل بر پنج نمونه ویروس مورد بررسی، مربوط به دو دوره زمانی (۱۳۷۷-۱۳۸۵) و (۱۳۸۶-۱۳۸۸) در تخم مرغ جنین دار جداسازی شدند. نمونه‌های دوره زمانی اول (۱۳۷۷-۱۳۸۵) که به صورت ذخیره^۱ در بانک ویروس بخش علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شده بودند، جهت تعیین تیترو ویروس مورد آزمایش هم‌اگلوتیناسیون^۲ قرار گرفتند. نمونه‌های دوره زمانی دوم (۱۳۸۶-۱۳۸۸) نیز که از بافت نای و ریه گله‌های گوشتی مرغداری‌های استان تهران و حومه تهیه و آماده سازی شده بودند، در کیسه آلانتوئیک تخم مرغ جنین دار ۱۰ روزه تلقیح گردیدند. از تخم مرغ‌های تلقیح شده نیز، آزمایش HA و تعیین تیترو ویروس، صورت گرفته شد. سپس نمونه‌های با تیترو آنتی ژنی مناسب جهت انجام بررسی‌های مولکولی بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج RNA : RT-PCR, RNA ویروس‌های جدا شده از مایع آلانتوئیک به وسیله کیت High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche آلمان) با (Cat. No. 11 858 874) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شدند و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به روش نسخه برداری معکوس^۳ از روی RNA ویروسی با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به‌طور اختصاصی جهت قطعه ژن M، صورت گرفته شد.

جهت انجام واکنش RT-PCR، از کیت Titan One Tube RT-PCR System (Roche آلمان) با (Cat. No. 11 855 476 001) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، در شرایط ۱ سیکل در (۵۰^{0c} برای ۳۰ دقیقه و ۹۴^{0c} برای ۲ دقیقه) و ۳۵ سیکل در (۹۴^{0c} برای ۴۵ ثانیه، ۵۸^{0c} برای ۱ دقیقه و ۶۸^{0c} برای ۱ دقیقه) و ۱ سیکل در (۶۸^{0c} برای ۱۰ دقیقه) استفاده گردید و یک جفت پرایمر (فرا دست و فرودست) ساخت شرکت MWG آلمان مورد استفاده در این بررسی بدین شرح بود: M2UF: 5'(GGA ATT CCA TAT GAG TCT TCT AAC CGA G)3', (28)M2LR: 5'(GGA ATT CCT TAC TCC AGC TCT ATG TTG)3' (27).

توالی یابی و آنالیز داده‌ها (Sequencing): محصول PCR نیز پس از انجام آزمایش الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪،

به‌وسیله کیت Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche آلمان) با (Cat. No. 11 696 505 001) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده مورد پالایش قرار گرفت و نمونه‌ها جهت تعیین توالی ژن به روش خوانش توالی دو طرفه (Comfort Read Sequencing) به MWG آلمان ارسال گردید. نتایج توالی‌ها با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک MEGA4 و CLC Sequence Viewer 6 مورد ارزیابی قرار گرفتند. توالی‌های به‌دست آمده در بانک ژن (GeneBank) توسط برنامه BankIt ثبت گردیدند و شماره دسترسی به آنها اختصاص یافت که در (جدول ۲) آمده است.

یافته‌ها

محصول PCR قطعات مورد نظر پس از رانش بر روی ژل آگاروز ۱٪، مورد بررسی اولیه قرار گرفتند. طول قطعات pb ۱۰۲۷ بودند. بر روی ژل پنج نمونه ویروسی کار شده با خط کش ژنی Lader 1000pb Fermentse نشان داده شده است (نگاره ۱). در این فرایند باند غیر اختصاصی دیده نشد که گویای بهینه نمودن مناسب واکنش زنجیره‌ای پلی مرز می‌باشد.

Stock-¹-² (HA) Haemagglutination Assay-³ Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

تحت تیپ H3N2 با مدل S31N به آمانتادین مقاومت نشان می‌دهند (۱۹). تاکنون ۶۷۰ توالی بر اساس پروتئین ماتریکس M2 از تحت تیپ H9N2 در دنیا تا سال ۱۳۸۹ در بانک ژن ثبت گردیده است. از ۶۷۰ جدایه ثبت شده در بانک جهانی، تنها ۷۳ جدایه (۱۰/۸۴٪)، مقاوم به آمانتادین می‌باشند که از این میان ۵ جدایه (۸۴/۶٪) از کل جدایه‌های مقاوم از نوع جهش با تعویض اسید آمینه A30T بوده و ۲۲ مورد (۱۳/۳۰٪) از تعویض نوع V27A و ۴۶ جدایه (۱۰/۶۳٪) از نوع جهش با تعویض اسید آمینه S31N که بیشترین آمار را نشان می‌دهد بودند.

با بررسی نتایج به‌دست آمده از ماحصل تحقیقات منتشر شده از ایران و سایر نقاط جهان و بررسی درصد جهش‌های جدایه‌های مقاوم به آمانتادین به‌دست آمده از بانک ژن، می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری نمود که تعویض اسید آمینه سرین به آسپارژین در موقعیت ۳۱ بیشترین و اصلی‌ترین عامل ایجاد کننده مقاومت به آمانتادین در ویروس‌های آنفلوآنزای A در تحت تیپ H9N2 و سایر تحت تیپ‌ها باشد. لذا با بررسی‌های انجام شده در این مطالعه، به نظر می‌رسد که ویروس‌های آنفلوآنزای A تحت تیپ H9N2 در سال ۱۳۸۶ و ۱۳۸۸ از نظر ژنتیکی در مقایسه با ویروس فوق با همان تحت تیپ در سال‌های ۱۳۷۷، ۱۳۷۸ و ۱۳۸۵ با تعویض زیر واحد آمینواسیدی در موقعیت S31N در ژنوم پروتئین ماتریکس M2، مقاومت به آمانتادین را عرضه می‌نمایند.

بر اساس برنامه CLUSTAL W کل جدایه‌های ثبت شده از ایران، بر اساس شاخص توالی اسید آمینه پروتئین ماتریکس M2 مورد بررسی میزان شباهت و تفاوت قرار گرفتند: در بین جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه با جدایه‌های ایران، بیشترین شباهت بین جدایه‌های AS123 و AS130 (۱۰۰ درصد) وجود داشت. همچنین کمترین تفاوت نیز بین جدایه AS120 با جدایه AS133 (۹۴ درصد) وجود داشت. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان نمود که ویروس‌های ایران از

بررسی پروتئین ماتریکس M2: همان‌طور که در (نگاره ۲) و مقایسه کروماتوگرام جدایه‌ها در (نگاره ۳) نشان داده شده است، از نظر تبدیل نوکلئوتیدی مشخص می‌شود که یک جهش نقطه‌ای در نوکلئوتید میانی در دو جدایه AS110, AS120 نسبت به سه جدایه AS123, AS130, AS133 از نوع ترانسورژن رخ داده است که در نتیجه آن در موقعیت ۳۱، اسید آمینه سرین با اسید آمینه آسپارژین تعویض گردیده است. تنها برای تبدیل S به N و یا تبدیل نوکلئوتید G به A به ترتیب یک جهش نقطه‌ای در جایگاه اسیدآمینه شماره ۳۱ یا نوکلئوتید ۹۲ لازم می‌باشد (۷ و ۹).

بحث و نتیجه‌گیری

Yavarian و همکاران در دو بررسی (۲۰۱۰-۲۰۰۹) در ایران مقاومت به آمانتادین و ریمانتادین در سویه H3N2 در دو دوره ۲۰۰۵-۲۰۰۷ و ۲۰۰۵-۲۰۰۸ مورد بررسی قرار دادند. از ۱۴ نمونه مورد بررسی، ۱۰ نمونه از نوع جهش نقطه‌ای در موقعیت ۳۱ با تعویض اسید آمینه سرین به آسپارژین بود. در بررسی دوم نیز یاوریان و همکاران با جمع‌آوری نمونه‌هایی از نقاط مختلف ایران مقاومت به آمانتادین از نوع تعویض اسیدآمینه S31N را اذعان نمودند (۲۱ و ۲۲). Bai و همکاران (۲۰۰۹) در تایلند مقاومت به آمانتادین را بین سال‌های ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۸ مورد بررسی قرار دادند. از ۶۶ نمونه مورد بررسی، ۴۴ نمونه مربوط به تحت تیپ H1N1 و ۲۲ نمونه مربوط به H3N2، از بانکوک و ۱۱ استان دیگر بود که از این میان ۲۲٪ ویروس‌ها در سال ۲۰۰۶ مقاومت به آمانتادین را با تعویض S31N نشان می‌دادند (۲). در همان سال Huang و همکاران (۲۰۰۹) نیز از ۱۷ جدایه H9N2 مورد بررسی، بین سال‌های ۱۹۹۸-۲۰۰۸ در شمال چین با جداسازی مولکولی صورت گرفته، مقاومت به آمانتادین با تعویض S31N را گزارش نمودند (۱۲). یک سال بعد Suzuki و همکاران (۲۰۱۰) در ژاپن با بررسی دو سویه H1N1 و H3N2 در سال ۲۰۰۸-۲۰۰۷ دریافتند که ۶۲٪ از تحت تیپ H1N1 و ۱۰۰٪ موارد

تعویض تک آمینو اسید اتفاق افتاده بود. با مقایسه آمینو اسیدها در جایگاه ۳۱ مشاهده گردید که، اسید آمینه سرین (S) که در توالی مورد توافق در اپیدمی‌های پیشین قرار داشت، در اپیدمی‌های جدید به آسپارژین (N) جهش یافته بود، که در نتیجه منجر به مقاومت ویروس آنفلوآنزای A نسبت به داروی ضد ویروس آمانتادین گردید. بررسی‌های ما احتمال مقاومت به آمانتادین را نشان می‌داد. به هر حال جهت شناسایی منشأ اصلی ویروس آنفلوآنزای پرندگان با تحت تیپ H9N2 و شیوع یک دهه اخیر آن در سطح مرغداری‌های ایران، نیاز به مطالعات فیلوژنتیک گسترده و همچنین بررسی جدایه‌های H9N2 ایران از نظر دودمانی بسیار متمر ثمر به نظر می‌رسد.

سال ۱۳۸۶ به بعد دچار تغییراتی گشته‌اند که باید به دنبال علت این تغییرات بود، که نیازمند بررسی‌های بیوانفورماتیکی بیشتر می‌باشد.

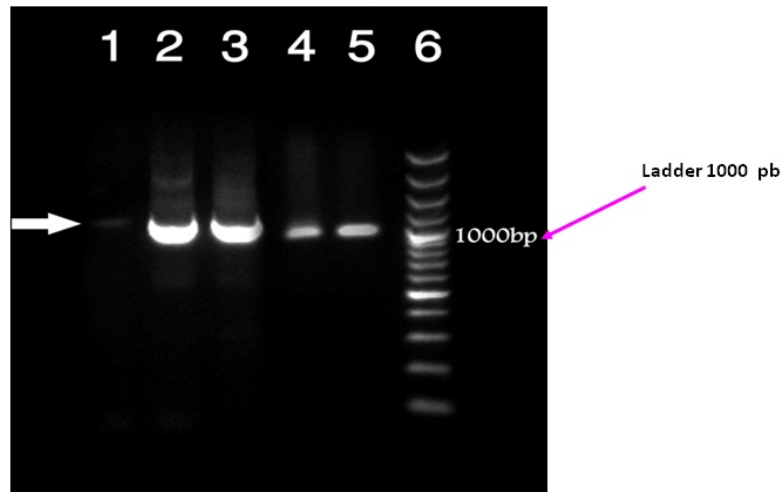
در این بررسی سعی شد تا توالی‌های ژن M2 از ویروس‌های جدا شده در دو دوره زمانی (۱۳۸۵-۱۳۷۷ و ۱۳۸۸-۱۳۸۶) در ایران مورد ارزیابی قرار گیرند. در یک بررسی مقایسه‌ای، پنج تحت تیپ H9N2 در ایران مورد ارزیابی واقع شدند و اطلاعات آنها در GeneBank ثبت گردیدند. آمینو اسیدها در پروتئین ماتریکس M2 در ناحیه تراغشائی، در جدایه‌های سال‌های ۱۳۷۷، ۱۳۷۸ و ۱۳۸۵ تعویض را نشان نمی‌دادند. در حالی‌که، در درگیری صورت گرفته در سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۸

جدول ۱- ویروس‌های آنفلوآنزای تحت تیپ H9N2 جدا شده از جوجه‌های گوشتی استان تهران در طی سال‌های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۸.

ردیف	مشخصات جدایه‌های ویروسی	علامت اختصاری	شماره دسترسی در بانک ژن	شماره پاماژ
۱	A/Chicken/Iran/AS133/1998(H9N2)	AS133	ADD97104	۳
۲	A/Chicken/Iran/AS130/1999(H9N2)	AS130	ADQ74930	۴
۳	A/Chicken/Iran/AS123/2006(H9N2)	AS123	ADQ74934	۴
۴	A/Chicken/Iran/AS120/2007(H9N2)	AS120	ADQ74932	۳
۵	A/Chicken/Iran/AS110/2009(H9N2)	AS110	ADD97106	۳

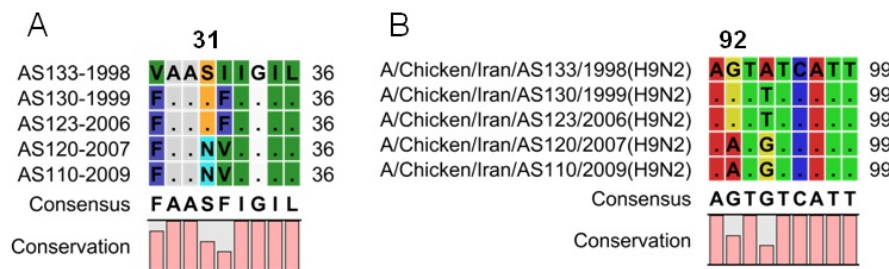
جدول ۲- شماره دسترسی ویروس‌های تحت تیپ H9N2 جداسازی شده در این مطالعه پس از ثبت در بانک ژن (NCBI)

ردیف	شماره دسترسی	مشخصات جدایه ویروسی	نام اختصاری
۱	ADD97104	A/Chicken/Iran/AS133/1998(H9N2)	AS133
۲	ADQ74930	A/Chicken/Iran/AS130/1999(H9N2)	AS130
۳	ADQ74934	A/Chicken/Iran/AS123/2006(H9N2)	AS123
۴	ADQ74932	A/Chicken/Iran/AS120/2007(H9N2)	AS120
۵	ADD97106	A/Chicken/Iran/AS110/2009(H9N2)	AS110



نگاره ۱- محصول PCR پنج جدایه ویروسی تحت تیپ H9N2 جداشده از جوجه‌های گوشتی استان تهران در طی سال‌های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۸. (طول قطعه ۱۰۲۷ bp)

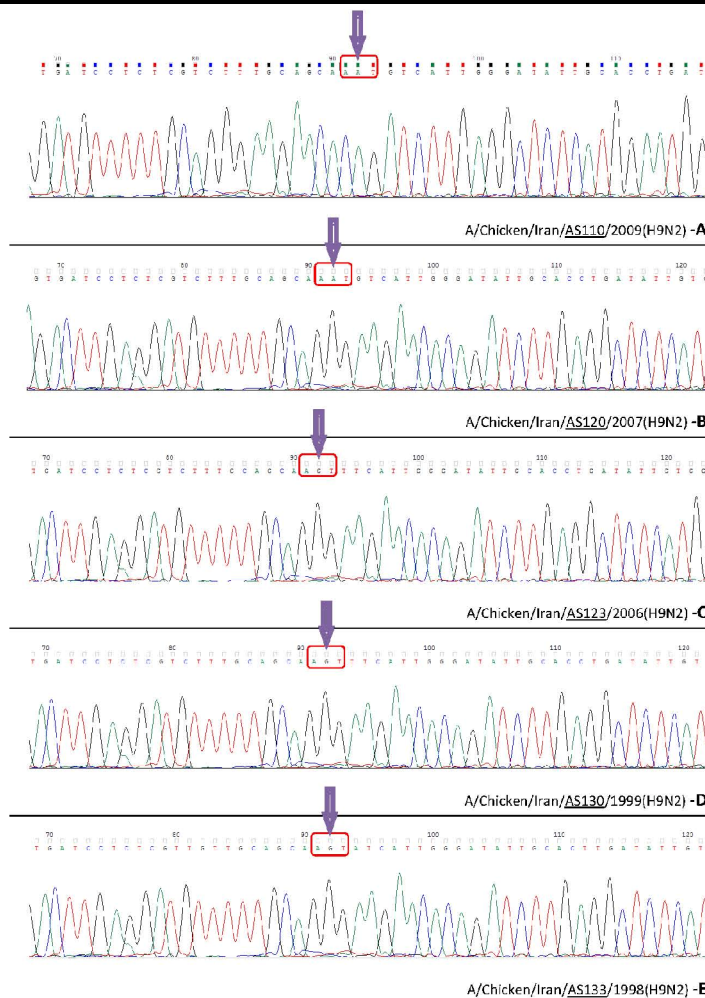
ردیف ۱: جدایه AS130، ردیف ۲: جدایه AS120، ردیف ۳: جدایه AS123، ردیف ۴: جدایه AS133، ردیف ۵: جدایه AS110، ردیف ۶: خط کش ژنی (Lader 1000pb Fermentse).



نگاره ۲- تغییر در توالی پروتئین ماتریکس M2 جدایه‌های آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 جداسازی شده از جوجه‌های گوشتی استان تهران در طی سال‌های

۱۳۷۷، ۱۳۷۸، ۱۳۸۵، ۱۳۸۶ و ۱۳۸۸ با استفاده از نرم افزار CLC Sequence Viewer 6.

A: تغییر در توالی اسید آمینه پروتئین ماتریکس M2، B: تغییر توالی نوکلئوتیدی در پروتئین ماتریکس M2



نگاره ۳- کروماتوگرام جدایه‌های آنفلوآنزای A تحت تیپ H9N2 جداسازی شده در این مطالعه از نظر تغییر نوکلئوتیدی در توالی پروتئین ماتریکس M2

منابع

1. Abed, Y., N. Goyette, and G. Boivin. 2005. Generation and characterization of recombinant influenza A (H1N1) viruses harboring amantadine resistance mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49:556.
2. Bai, G. R., M. Chittaganpitch, Y. Kanai, Y. G. Li, W. Auwanit, K. Ikuta, and P. Sawanpanyaler. 2009. Amantadine- and oseltamivir-resistant variants of influenza A viruses in Thailand. *Biochem Biophys Res Commun* 390:897-901.
3. Bauera, M. S. R. Z. K., A. Krumbholza, and C. S. J. S. P. Wutzlera. 2006. Amantadine resistance among porcine H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2001. *Intervirolgy* 49:286-293.
4. CDC. Centers for Disease Control and prevention. Avian Influenza A Virus Infections of Humans. (Accessed May 23, 2008 , at <http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/avian-flu-humans.htm>).
5. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Key Facts About Avian Influenza (Bird Flu) and Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Virus. (Accessed November 21 , 2010 , at <http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/facts.htm>).
6. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Updated CDC Estimates of 2009 H1N1 Influenza Cases, Hospitalizations and Deaths in the United States, April 2009 – April 10, 2010. (Accessed May , 2010 , 14 at http://www.cdc.gov/h1n1flu/estimates_2009_h1n1.htm).

7. Cha, R. S., H. Zarbl, P. Keohavong, and W. G. Thilly. 1992. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the cH-ras gene. *Genome Research* 2:14.
8. Furuse, Y., A. Suzuki, and H. Oshitani. 2009. Large-scale sequence analysis of M gene of influenza A viruses from different species: mechanisms for emergence and spread of amantadine resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53:4457.
9. Hata, M., M. Tsuzuki, Y. Goto, N. Kumagai, M. Harada, M. Hashimoto, S. Tanaka, K. Sakae, T. Kimura, H. Minagawa, and Y. Miyazaki. 2007. High frequency of amantadine-resistant influenza A (H3N2) viruses in the 2005-2006 season and rapid detection of amantadine-resistant influenza A (H3N2) viruses by MAMA-PCR. *Jpn J Infect Dis* 60:202-204.
10. Hayden, F. G., and A. T. Pavia. 2006. Antiviral management of seasonal and pandemic influenza. *Journal of Infectious Diseases* 194:S119.
11. Hu, J., T. Asbury, S. Achuthan, C. Li, R. Bertram, J. R. Quine, R. Fu, and T. A. Cross. 2007. Backbone structure of the amantadine-blocked trans-membrane domain M2 proton channel from influenza A virus. *Biophysical journal* 92:4335-4343.
12. Huang, Y., B. Hu, X. Wen, S. Cao, D. Xu, X. Zhang, and M. I. Khan. 2009. Evolution analysis of the matrix (M) protein genes of 17 H9N2 chicken influenza viruses isolated in northern China during 1998-2008. *Virus Genes* 38:398-403.
13. Kwon, H. J., S. H. Cho, Y. J. Ahn, J. H. Kim, H. S. Yoo, and S. J. Kim. 2009. Characterization of a Chicken Embryo-Adapted H9N2 Subtype Avian Influenza Virus. *Open Veterinary Science Journal* 3:9-16.
14. Marandi, M. V., and M. H. B. Fard. 2002. Isolation of H9N2 subtype of avian influenza viruses during an outbreak in chickens in Iran. *Iranian Biomedical Journal* 6:13-17.
15. Nili, H., and K. Asasi. 2003. Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. *Avian diseases* 47:828-831.
16. Pielak, R. M., J. R. Schnell, and J. J. Chou. 2009. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:7379.
17. Pourbakhsh, S., M. Khodashenas, M. Kianizadeh, and H. Goodarzi. 2000. Isolation and identification of avian influenza virus H9N2 subtype. *ARCHIVES OF RAZI INSTITUTE* 51:27-38.
18. Schnell, J. R., and J. J. Chou. 2008. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* 451:591-595.
19. Suzuki, Y., R. Saito, H. Zaraket, C. Dapat, I. Caperig-Dapat, and H. Suzuki. 2010. Rapid and specific detection of amantadine-resistant influenza A viruses with a Ser31Asn mutation by the cycling probe method. *J Clin Microbiol* 48:57-63.
20. Wright, P. F., G. Neumann, Y. Kawaoka, D. Knipe, and P. Howley. 2007. *Orthomyxoviridae*. *Fields Virology* 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins:1691-1740.
21. Yavarian, J., T. M. Azad, X. Zheng, V. Gregory, Y. P. Lin, and A. Hay. 2010. Amantadine resistance in relation to the evolution of influenza A(H3N2) viruses in Iran. *Antiviral Res* 88:193-196.
22. Yavarian, J., T. Mokhtari Azad, N. Z. Shafiei Jandaghi, and R. Nategh. 2009. Amantadine-resistant influenza A (H3N2) viruses in Iran. *Acta Virol* 53:135-138.

Genetical Evaluation of resistance to amantadine in H9N2 Avian influenza virus in Iran between 1998 to 2009

Aghahosseini-Fanni, A.^{1,4*}, Barin, A.¹, Moosakhani, F.², Ghalyanchi-Langeroudi, A.³

1-Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2-Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

3-Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran

4-Young Researchers Club, Islamic Azad University, Branch of Karaj, Karaj, Iran

**Corresponding author's email: aslanfanni@yahoo.com*

(Received: 2011/5/29, Accepted: 2011/10/15)

Abstract

Spread of an epidemic of avian influenza in 1998 in Iran was the cause of many deaths on farms. Research shows that made the emergence of this epidemic of avian influenza virus subtype H9N2. Anti-influenza drugs amantadine and rimantadine (Adamantane) were used for the treatment and prevention of infections caused by influenza A virus, but the use of these medications has been limited in recent years with increased resistance in the world. In a comparative study between the years 1998 to 2009 in Iran, to evaluate resistance to amantadine, the avian influenza A virus of subtype H9N2, we focused our research on the genetic structure of viruses, amantadine where most of their leaves left on the channel protein M2. Two groups of avian influenza A virus H9N2 subtype, were isolated in eggs with embryos, including five samples of the virus to two periods (1998-2006 and 2007-2009), then were the polymerase chain reaction tests using reverse transcription (RT-PCR) and electrophoresis on agarose gel and were sent for sequencing. The M2 sequence analysis displayed in different separate parts of this sequence as to consensus sequence that was amino acid changes together. And all of resistant isolates contained the point mutations (Ser to Asn) S31N at position 31 that could confer resistance to amantadine. The study took place, to determine the effectiveness of awareness of avian influenza viruses to amantadine, was reported, amantadine resistance in H9N2 subtype avian influenza viruses in the years 2007 and 2009 in Iran. Therefore, it is recommended to avoid the arbitrary use of amantadine to treat and prevent infections from avian influenza viruses of H9N2 subtype in the farms. Furthermore, it seems practical tests of the drug influence *in vivo*, can ensure effective use of the drug.

Keywords: Amantadine resistance, Avian influenza A virus, H9N2 subtype, Matrix protein M2