مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۵۲، شماره ۳
پاییز ۸۸، صفحه ۱۳۳-۱۴۰

Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 52, No.3, P.133-140
Autumn 2009

مقاله اصلی

بررسی سرولوژی و ملکولی آلودگی به ویروس انفلوانزای طیوری H9N2 در کارکنان صنعت طیور

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۸۸/٤/۲۱

[۱] عبدالله رحیمیان
[۲] عبدالحمید شوشتری پورمحمره *
[۳] سید علی پوربخش
[۴] رضا ممیز
[۵] ابراهیم رحیمی لرکی
[۶] محمدجواد مهربانپور

۱- کارشناس ارشد ویروس شناسی
۲- استادیار بیماریهای طیور
۳- دانشیار میکروبیولوژی و ایمنولوژی
۴- رزیدنت بیماریهای طیور
۵- کارشناس ارشد میکروب شناسی
۶- استادیار بیماریهای طیور

*کرج- حصارک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج
تلفن: ۴۵۰۲۸۶۰-۲۶۱-۹۸+
فاکس: ۶۲۴۰۲۰۱-۷۱۱-۹۸+
email: hamid1342ir@yahoo.com

خلاصه

مقدمه

ویروس انفلوانزای H9N2 یکی از ویروسهایی است که بیماریزایی کم داشته و در سال ۱۹۹۹ باعث بیماری در دو دختربچه ۱ و ۴ ساله در هنگ کنگ شد . با وجود اینکه این ویروس در سطح وسیعی از پرندگان شیوع دارد اما گزارشات کمتری از عفونت انسان با این ویروس وجود دارد. این مطالعه به منظور بررسی وجود و یا عدم وجود آلودگی در کارکنان مرتبط با صنعت طیور در ایران مثل کشتارگاه ها، مرغداری ها موسسه واکسن سازی رازی و کلینیکهای طیور انجام شد .

روش کار

این مطالعه مقطعی، در سال ۱۳۸۵ در مرغداری های کشور انجام شد. نمونه های سرم و سوآب گلو و بینی از کارکنان کشتارگاه، مرغداریها، کلینیکهای طیور و موسسه رازی جمع آوری شد. جهت جلوگیری از مثبت و منفی کاذب شدن نتایج آزمون HI سرمها را به ترتیب با روش تریپسین- پریودات و گلبول قرمز متراکم هضم گردید. تست(RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction جهت تکثیر ژنهای HA و NP ویروس انفلوانزای H9N2 انجام شد

نتایج

از ۱۴۸ نمونه سرمی ، ۲ و ۱۷ نمونه به ترتیب دارای عیار HI :1/160 و HI: 1/40 برای آنتی بادی ضد ویروس H9N2 بودند. بالاترین تیتر مربوط به کارکنان کشتارگاه می باشد. هیچ ویروسی با روش RT-PCR تشخیص داده نشد.

نتیجه گیری

مثبت شدن آنتی بادی ضد H9N2 نشان دهنده تغییر توانایی ویروس به سمت آلوده کردن بافت اپی تلیال نای انسان می باشد. وجود بالاترین تیتر در کارکنان کشتارگاه نشان دهنده آن است که جهت عفونت زایی ویروس، نیاز به تماس نزدیک با طیور و فضولات آنها می باشد. به همین منظور ، ویروس جهت سازگاری با بدن انسان و محسوب شدن به عنوان یک ویروس انسانی واقعی ، نیاز به گردش بیشتر در بین جمعیتهای انسانی دارد.

کلمات کلیدی: انفلوانزای پرندگان، H9N2 ، بررسی سرولوژی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ویروسهای انفلوانزا براساس پروتئینهای M و NP به چهار گونه A, B, C, D تقسیم می شوند. ویروس انفلوانزای A مجموعه ای از میزبانها مثل پرندگان، پستانداران مثل خوک، اسب، نهنگهای دریایی و انسان را درگیر می کند. ویروس انفلوانزای A براساس تغییر در گلیکوپروتئینهای سطحی HA و NA به ۱۶ تحت تیپ HA و ۹ تحت تیپ NA تقسیم بندی می شود. همه این تحت تیپها، از پرندگان جدا شده اند (۶). ویروسهای انفلوانزای پرندگان براساس بیماریزایی در پرندگان به دو گروه با بیماریزایی بالا و بیماریزایی کم طبقه بندی می شوند. سازگاری این ویروسها در پرندگان و بروز نادر و کم علائم بیماری در آنها، این پرندگان را به عنوان مخزن طبیعی این ویروسها معرفی کرده است. این ویروسها می توانند با شکستن سد بین گونه ای و انتقال به پستاندارانی مثل خوک، اسب، خوک دریایی و انسان باعث انتقال بیماری شوند. از بین این ویروسها، ویروسهای انفلوانزای فوق حاد H5 و H7 و ویروس با بیماریزایی کم H9 به دلیل انتقال مستقیم آنها به انسان و ایجاد بیماری در انسان، به عنوان کاندیداهای ایجاد پاندمی جدید انفلوانزا بیشتر مورد توجه هستند. در سال ۱۹۹۹ و به دنبال آن در سال ۲۰۰۳ عفونت با ویروسهای (H9N2) A/HK/1073/99 و (H9N2) A/Hk/2108/03 در انسان رخ داد که از آن زمان، توجه به ویروس به عنوان یکی از کاندیداهای ایجاد پاندمی جدید بیشتر شد. در بررسیهای انجام گرفته، مشخص شده که ژنهای داخلی ویروس شباهت زیادی به ویروس H5N1 جدا شده از انسان در سال ۱۹۹۷ دارد. همچنین ویروس H9N2 که شش ژن داخلی خود را از ویروس H5N1 گرفته، در سطح وسیعی از پرندگان آسیا یافت می شود. در بررسی کامرون[1] و همکاران (۲۰۰۰) بر ویروسهای H9N2 جدا شده از پرندگان کشورهای آلمان، ایران، پاکستان و عربستان سعودی در طول سالهای ۱۹۹۸- ۱۹۹۹ مشخص شد که این ویروسها با ویروس آلوده کننده انسان در هنگ کنگ رابطه نزدیکی داشتند (۱). مطالعه کریمی و همکارانش (۱۳۸۳) تشابه ویروس H9N2 ایران را با ویروس (H9N2) A/quail/Hk/G1/97 نشان می دهد (۱۶). در مطالعه انجام شده توسط موسی خانی و همکارانش بر ۱۲ ویروس H9N2 ایران، با توجه به تشابه این ویروسها و قرار گرفتن آنها در گروه دودمانی با ویروسهای پاکستان، A/quail/Hk/G1/97 و A/Hk/1037/99 می توان به این نتیجه رسید که این ویروسها توان آلوده کردن انسان را دارند. این موارد همگی نشانگر وسعت شیوع ویروس H9N2 در پرندگان آسیا و قدرت آلوده کردن انسان است (۱۷). مطالعه ماتروسکویچ[2] و همکارانش (۲۰۰۰) نشان داد که اسید آمینه لوسین در موقعیت ۲۲۶ پروتئین هماگلوتینین که به طور اختصاصی در سویه های انسانی H_2 و H_3 وجود دارد و نشان داده است که تبدیل اسید آمینه گلوتامین به لوسین در موقعیت ۲۲۶ ویروس A/Hk/1037/99(H9N2) کشور هنگ کنگ رخ داده که این تغییر باعث شناسایی گیرنده $\alpha(2,6)$ اسید سیالیک انسان و به دنبال آن آلودگی انسانی به این ویروس شده است. در مطالعه ای که موسی خانی و همکاران (۱۳۸۴) بر ۱۲ ویروس H9N2 جدا شده از ایران انجام دادند، مشخص شد که ۱۰ ویروس از ۱۲ ویروس، در موقعیت ۲۲۶ دارای اسید آمینه لوسین بوده و ۲ ویروس دیگر اسید آمینه گلوتامین دارند (۱۷). این ۱۰ ویروس اغلب مربوط به سال ۱۳۸۳ بوده و نشان دهنده تغییر ویروس در جهت ابتلای انسان می باشد . بنابراین به دنبال تغییرات اسید آمینه در موقعیت ۲۲۶ ویروس H9N2 و کسب توانایی شناسایی کردن گیرنده انفلوانزای انسانی، می توان این ویروس را به عنوان کاندیدی برای ایجاد پاندمی مطرح کرد (۲). با توجه به تحقیقات انجام شده بر اسیدهای آمینه ناحیه شکسته شدن پروتئین هماگلوتینین ویروس H9N2 ایران، توالی اسید آمینه در این ناحیه به صورت R-x-x-R (x اسید آمینه غیر بازی و R آرژنین) بوده که توانایی بالقوه تبدیل به توالی حاد را دارد و مطالعات کریمی، طرقی، موسی خانی و همکاران نیز این توالیها را تایید می کند و با توجه به تغییر ۱۲ اسید آمینه در ویروسهای H9N2 جدا شده از طیور ایران در سال ۱۳۸۳ در مطالعه موسی خانی، در صورت گردش ویروس در مرغداریهای ایران، بروز جهشهای نقطه ای در این ویروسها محتمل است (۱۷).

[1] Cameron

[2] Matroscovich

Archive of SID
www.SID.ir

روش کار

جمع آوری نمونه

این مطالعه یک مطالعه مقطعی بوده و به دنبال شیوع ویروس H9N2 در مرغداریهای ایران در سال ۱۳۸۵ انجام شد. با مجوز سازمان دامپزشکی از کارکنان شاغل در کشتارگاههای طیور، مرغداریها، مؤسسه واکسن سازی رازی و کلینیکهای طیور تعداد ۱۴۰ نمونه خون جهت آزمایشات سرولوژیک و از کارکنان مرغداری و کشتارگاه به علت تماس بیشتر با طیور تعداد ۵۶ نمونه سوآب بینی و گلو اخذ شد. سرم نمونه های خون را پس از جداسازی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری کرده و نمونه های سوآب را با رعایت زنجیره سرد در محیط انتقالی TPB1 به آزمایشگاه منتقل کرده و پس از اضافه کردن آلبومین ۵٪ به آن در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد . همچنین از افرادی که هیچگونه تماسی با طیور نداشتند به عنوان گروه کنترل، تعداد ۲۰ نمونه خون دریافت شد.

جدول ۱- تعداد، نوع و مکان جمع آوری نمونه

مکانهای کسب نمونه	تعداد نمونه سرم	تعداد نمونه سوآب
کشتارگاه	۷۱	۴۹
مرغداری	۲۸	۷
موسسه واکسن سازی رازی	۲۹	.....
کلینیکهای بیماری طیور	۱۲	.....
گروه کنترل	۲۰	.....
جمع نمونه ها	۱۶۰	۵۶

هضم سرم با روش Trypsin – Heat – Periodate Treatment

جهت حذف ممانعت کننده های غیر اختصاصی هماگلوتیناسیون (α ، β و γ) در سرم انسان و جلوگیری از مثبت کاذب شدن آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) انجام گرفت. به طور خلاصه ، ۰/۵ حجم از تریپسین به یک حجم از سرم (۰/۱۵ میلی لیتر تریپسین + ۰/۳ میلی لیتر سرم) اضافه شده،

سپس سرم دارای تریپسین را در بن ماری ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال کرده و پس از خروج از بن ماری ، آن را سرد کرده تا به دمای اتاق برسد. سپس ۳ حجم از پریودات متاپتاسیم ۰/۰۱۱ مولار (۰/۹ میلی لیتر) به سرم اضافه شده و پس از مخلوط کردن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از ۱۵ دقیقه، ۳ حجم از گلیسرول ۱٪ (۰/۹ میلی لیتر) را به مواد قبلی اضافه کرده و پس از مخلوط کردن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و در نهایت ۲/۵ حجم از نر مال سالین ۰/۸۵٪ (۰/۷۵ میلی لیتر) به مخلوط قبلی اضافه شد تا رقت نهایی سرم به ۱/۱۰ برسد (۵).

تشخیص آگلوتینینهای غیر اختصاصی در سرم هضم شده

جهت جلوگیری از منفی کاذب شدن آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) ، باید با این روش، آگلوتینینهای غیر اختصاصی در سرم هضم شده انسان شناسایی شده که در صورت مثبت بودن، نسبت به جذب آنها اقدام شود. به طورخلاصه در یک پلیت ۹۶ چاهکی U شکل، یک رقت سریالی از سرمهای هضم شده ساخته و پس از اضافه کردن گلبول قرمز جوجه ۱٪ آنها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵-۲۲ درجه سانتیگراد) انکوبه کرده و در نهایت در صورتی که پس از این مدت دگمه تشکیل شود، سرم را می توان جهت انجام آزمایش استفاده کرد ولی در صورت مشاهده آگلوتیناسیون، باید آگلوتینینهای غیر اختصاصی موجود در سرم را به وسیله گلبول قرمز فشرده جذب شوند (۵).

جذب آگلوتینینهای غیر اختصاصی در سرم هضم شده با گلبول قرمز متراکم

به یک حجم از گلبول قرمز متراکم شسته شده ۲۰ حجم سرم هضم شده اضافه کرده و پس از مخلوط کردن به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده و پس از سانتریفوژ کردن در دور 1200RPM مایع رویی را برداشت کرده و از نظر وجود آگلوتینینهای غیر اختصاصی آزمایش شده و این عمل را تا منفی شدن سرم ادامه می یابد (۵) .

آزمایش هماگلوتیناسیون جهت مشخص کردن میزان عیار ویروس

در این تست، واحد هماگلوتیناسیون که معرف میزان عیار ویروس انفلوانزا می باشد تعیین می شود. میزان آنتی ژن مورد نیاز برای آزمایش HI، در مورد بیماری انفلوانزا ۴ واحد HA در

[1] Tryptose Phosphate Broth

Archive of SID

www.SID.ir

واحد حجم مورد استفاده می باشد. به طورخلاصه، در یک ردیف طولی میکروپلیت (A1-A12)، یک رقت سریالی از آنتی ژن انفلوانزا تهیه کرده و پس از اضافه کردن خون جوجه ۱٪ به تمامی چاهکها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. معکوس رقت آخرین چاهکی که هماگلوتیناسیون کامل را نشان دهد، معرف تیتر آنتی ژن است. به عنوان مثال اگر هماگلوتیناسیون کامل در رقت ۱:۲۵۶ رخ داده باشد، تیتر HA محلول آنتی ژن اولیه ۲۵۶: HA تلقی می شود. به عبارتی رقت ۱:۲۵۶ از ۲۵ میکرولیتر آنتی ژن ویروسی اولیه، حاوی یک واحد HA می باشد. بنابراین رقت ۱:۶۴ حاوی چهار واحد HA می باشد (۵)

آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون گلبولهای قرمز

آزمایش، طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) جهت ردیابی آنتی بادی ضد ویروس انفلوانزای H9 در سرم انسان انجام شد(۵).

استخراج اسید ریبونوکلئیک (RNA) تام

جهت استخراج RNA تام، از کیت تجاری Tripure (Roche, Germany) استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده توسط قرائت جذب نوری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

RT-PCR[1] برای تکثیر قطعه 330bp از ژن نوکلئوپروتئین(NP)

آزمون را با حجم ۲۵ میکرولیتر برای محلول واکنش با استفاده از پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت سیناژن Forward5'-CAGTACTGGGCATAAGAC-3' و 5'-GCATTGTCTCCGAAGAAATAAG-3' انجام شد

RT-PCR برای تکثیر قطعه 488bp از ژن هماگلوتینین (HA)

آزمون را با حجم ۵۰ میکرولیتر برای محلول واکنش و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت سیناژن 5′ CTYCACACAGARCACAATGG3′ و پرایمر معکوس 5′ GTCACAGTTGTR(A/G)TC 3′، انجام گرفت.

جدول ۲- مقادیر مواد موردنیاز و برنامه واکنش RT-PCR برای تکثیر قطعه 330bp از ژن نوکلئوپروتئین(NP)

RT (Reverse Transcription) واکنش			RT-PCR مواد مورد نیاز جهت واکنش	
دمای موردنیاز	زمان مورد نیاز		مواد مورد نیاز	حجم (میکرولیتر)
۴۲°c	۴۵ دقیقه		10x بافر واکنش	۲/۵
۹۵ °c	۳ دقیقه		dNTPs	۲/۵
PCR (Polymerase chain Reaction)			آنزیم ترانس کریپتاز	۰/۲
سیکل	دمای موردنیاز	زمان مورد نیاز	RNase ممانعت کننده	۰/۳
۳۵ سیکل	۹۵°c	۳۰ ثانیه	Taq آنزیم پلیمراز	۰/۵
	۵۵°c	۴۰ ثانیه	Forward پرایمر	۰/۵
	۷۲°c	۴۰ ثانیه	پرایمر معکوس	۰/۵
۱ سیکل	۷۲°c	۱۰ دقیقه	الگو RNA	۱
			آب مقطر	۱۷
			حجم نهایی	۲۵

جدول ۳- مقادیر مواد موردنیاز جهت واکنش RT ژن HA

مواد مورد نیاز	حجم (میکرولیتر)
آب مقطر	۵/۵
RNA	۵
پرایمر راندوم	۲
(dNTPs) دی ان تی پی	۲
RT(5x) بافر	۴
RNase ممانعت کننده	۰/۵
آنزیم ترانس کریپتاز معکوس	۱

جدول ٤- PCR برای تکثیر قطعه 488bp ژن

زمان		دما	مواد مورد نیاز	حجم
۹۴°c		۳ دقیقه	بافر واکنش	۵
سیکل	زمان	دما	کلرید منیزیم	۱/۵
۳۵	۹۴°c	۳۰ ثانیه	dNTPs	۱
سیکل	۵۳°c	۴۵ ثانیه	پرایمر پیشرو	۰/۵
	۷۲°c	۱دقیقه	پرایمر معکوس	۰/۵
۱	۷۲°c	۱۰	Taq آنزیم	۰/۵
سیکل		دقیقه		
			الگو DNA	۶
			آب مقطر	۳۳

تایید اندازه محصولات PCR به دست آمده با استفاده از جداسازی توسط الکتروفورز روی ژل اگاروز ۱/۵ درصد همراه

[1] Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Archive of SID
www.SID.ir

با مارکر ۱۰۰ جفت بازی با استفاده از دستگاه gel doc(Kodak DL200) صورت پذیرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

تجزیه و تحلیل نتایج براساس آزمون کاپا صورت گرفت. از کل ۱۶۰ نمونه سرم دریافت شده، ۱۴۰ نمونه از کارکنان کشتارگاهها، مرغداری، کلینیکهای طیور و موسسه واکسن سازی رازی دریافت شده بود. ۲۰ نمونه دیگر مربوط به گروه کنترل بود. از میان ۱۴۰ نمونه، ۷۱ نمونه مربوط به شاغلین در کشتارگاه بود که از این تعداد، ۱۴ مورد (۱۹/۷٪) دارای تیتر HI بالاتر یا مساوی ۱/۴۰ بودند درحالیکه ۵۷ نمونه (۸۰/۳٪) منفی شدند.

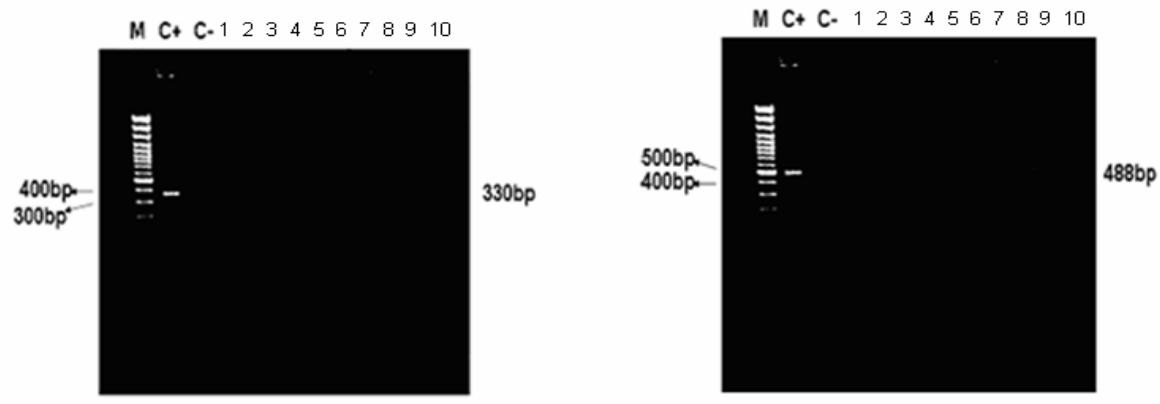
۲۸ نمونه سرم مربوط به کارکنان مرغداری بود که از این تعداد ۴ مورد (۱۴/۲٪) ازنظر آزمایش HI مثبت بودند و تعداد ۲۴ مورد (۸۵/۷) منفی شدند. ۲۹ نمونه سرم مربوط به کارکنان مؤسسه واکسن سازی رازی که در بخش تهیه واکسن انفلوانزای H9N2 می کردند بود که تمام موارد از نظر تیتر HI پس از هضم سرم توسط تریپسین، پریودات و گرما منفی شدند.

۲۰ نمونه مربوط به کارکنان شاغل در کلینیکهای طیور بوده، که فقط یک مورد (۲٪) مثبت بود و ۱۹ مورد دیگر منفی بودند.

۲۰ نمونه نیز به عنوان گروه کنترل از افرادیکه هیچگونه برخوردی با پرندگان نداشتند کسب شد که همه نمونه ها منفی بودند. همانگونه که مشخص می باشد درصد فراوانی مثبت شدن آزمایش HI در گروههای مختلف به ترتیب در کارکنان کشتارگاه بیشتر از مرغداری و در کارکنان مرغداری بیشتر از کلینیکهای طیور و مؤسسه واکسن سازی می باشد. از نظر عیار آنتی بادی HI در کارکنان کشتارگاه بیشترین تیتر HI: 1/160 و کمترین آن HI: 1/40 می باشد و عیارهای آنتی بادی مثبت در کارکنان مرغداری و کلینیکهای طیور HI: 1/40 بود. نمونه های سوآب بینی و گلو از نظر وجود ویروس با استفاده از روش RT-PCR جهت قطعات 488bp ژن HA و 330bp ژن NP منفی شدند.

بحث

در این مطالعه به منظور بررسی آلودگی افراد شاغل در کشتارگاه طیور، مرغداری، کلینیکهای طیور و مؤسسه واکسن سازی با ویروس H9N2 پس از جمع آوری نمونه های سرم جهت تستهای سرولوژیک و سوآب بینی و گلو جهت تستهای ملکولی، نسبت به انجام آزمایشات HI و RT-PCR روی نمونه ها اقدام شد. نتایج حاصله حاکی از مثبت شدن ۱۹/۷٪ از نمونه های سرمی کارکنان کشتارگاه و ۱۴/۲٪ از نمونه های سرمی کارکنان مرغداری از نظر وجود آنتی بادی علیه ویروس H9 می باشد. از نمونه های سوآب بینی و گلو، پس از انجام تست RT-PCR جهت تکثیر قطعه 488bp ژن HA و قطعه 330bp ژن NP، هیچگونه مورد مثبتی مشاهده نشد. درصد فراوانی مثبت شدن آزمایش HI در گروههای مختلف، در کارکنان کشتارگاه بیشتر از مرغداری و در کارکنان مرغداری بیشتر از کلینیکهای طیور و مؤسسه واکسن سازی رازی است. از نظر عیار آنتی بادی HI در کارکنان کشتارگاه بیشترین عیار HI: 1/160 و کمترین آن HI: 1/40 می باشد و عیارهای آنتی بادی مثبت در کارکنان مرغداری و کلینیکهای طیور HI:1/40 بود.



شکل ۱- تصاویر مربوط به نتایج RT-PCR نمونه های سوآب بینی و گلو جهت تکثیر قطعات 488bp ژن HA و 330bp ژن NP

Archive of SID
www.SID.ir

بررسیهای مشابه دیگری نیز در سایر نقاط جهان به منظور بررسی آلودگی افراد به ویروس H9N2 با روشهای سرولوژیک و ویرولوژیک انجام گرفته که نتایج آنها با نتایج بدست آمده در این مطالعه در بسیاری از موارد مطابقت دارد. در مطالعه ای که چنج[1] و همکارانش در سال ۲۰۰۲ به منظور بررسی پراکندگی انفلوانزای A (H9N2) طیور بین جوجه ها و افراد در ناحیه شنژن[2] چین انجام دادند، ۲۷ سوش H9N2 از پرندگان جدا کرده بودند در حالیکه هیچ ویروسی از افراد جدا نشده بود اما تقریبا ۲۶٪ از سرمهای کسب شده از افراد و ۷٪ سرم جوجه ها دارای آنتی بادی ضد H9N2 بودند و آنتی بادی HI در سرم انسان علیه ویروسهای جدا شده از جوجه ها بوده است (۱۰). بنابراین ارتباط نزدیکی بین آنتی بادی ضد H9N2 با ویروسهای جدا شده از جوجه ها وجود دارد. در مطالعه دیگری که لی[3] و همکاران در سال ۲۰۰۴ جهت بررسی وضعیت اپیدمی انفلوانزای پرندگان در پرندگان و انسان در منطقه گوانگ ژو[4] چین انجام دادند، نشان از مثبت شدن آنتی بادی ضد H9N2 در ۱۲/۸٪ از سرم جوجه ها و ۵/۱٪ از سرم افراد شاغل در مرغداری و کشتارگاههای طیور داشت و ارتباط نزدیکی بین ویروس H9N2 جدا شده از جوجه ها با آنتی بادی ضد این ویروس در انسان وجود داشت (۷). در بررسی دیگری که گو[5] و همکارانش در سال ۲۰۰۰ بر سرم بیماری که ویروس H9N2 در منطقه گوانگ ژو[6] چین از وی جدا شده بود و در مرحله نقاهت بیماری قرار داشت و با مقایسه سطح آنتی بادی علیه ویروس در مادرش، مشخص شد که این بیمار دارای عیار آنتی بادی HI ضد ویروس H9N2 در حد 1/400-1/640 بود و همچنین مادرش نیز دارای تیتر آنتی بادی HI علیه همان ویروس در حد 1/20 بود که احتمال می رفت، این مادر از طریق تماس با پرندگان یا از طریق ذرات موجود در هوا ، به این ویروس آلوده شده است (۸) در بررسی گو و همکاران در سال ۱۹۹۹، برای مشخص کردن اینکه آیا ویروس H9N2 می تواند انسان را آلوده کند یا خیر، با نمونه گیری از گلو و سرم بیماران دارای علائم انفلوانزا و جوجه ها مشخص شد که بیماران مورد مطالعه حامل ویروس H9N2 بوده و حدود ۱۹٪ از این افراد دارای آنتی بادی HI علیه ویروس در سرم خود می باشند (۹). با مقایسه نتایج حاصل از این مطالعات با مطالعه حاضر ، مشخص می شود، که نتایج آنها با هم مشابهت دارند و نکته جالب توجه در این مطالعات این است که ویروسهای جداشده از انسان یا ویروسهای جدا شده از جوجه هایی که کارکنان کشتارگاه و مرغداری در تماس نزدیک با آنها بودند به عنوان آنتی ژن جهت انجام آزمایش HI در سرم افراد استفاده شده وآنتی بادی HI مثبت در سرم آنها، علیه این آنتی ژنها بوده که این امر نشان دهنده آن است که در مکانهایی مثل کشتارگاه و مرغداری که تماس با طیور و فضولات آنها بیشتر است، این ویروسها توانایی بیشتری در انتقال به انسان و آلوده کردن و تحریک سیستم ایمنی انسان را دارند. این مسئله مشابه آلودگی انسان به ویروسH5N1 می باشد که بیشتر موارد آلودگی انسان در مکانهایی بوده که طیور آنها به این ویروس آلوده بوده و افراد در اثر تماس مستقیم با این طیور، آلوده و بیمار می شدند. بررسیهای سرولوژیک که در ایران بر سرم کارکنان مرغداری و کلینیکهای طیور انجام شده بود، نشان از مثبت بودن تیتر آنتی بادی HI علیه ویروس H9N2 داشت (۱۸). همچنین در بررسی دیگری که بر ۲۰۰ نفر از افراد عادی جامعه شهرکرد انجام شده بود، حدود ۱۶٪ افراد، دارای سرم مثبت از نظر آنتی بادی HI علیه H9N2 بودند (۱۵). در این بررسیها، عدم هضم سرم افراد مورد بررسی به وسیله پریودات یا آنزیم تخریب کننده گیرنده (RDE) برای حذف ممانعت کننده های غیر اختصاصی هماگلوتیناسیون، باعث نتایج مثبت در افراد عادی شده که هیچ تماسی با پرندگان نداشتند، که احتمال می رود این نتایج در اثر نتیجه مثبت کاذب در این تستها باشد، در حالیکه در این مطالعه، سرم افراد شاغل در کشتارگاه، مرغداری و کلینیکهای طیور توسط روش تریپسین-پریودات-گرما مورد هضم قرار گرفت و برای کنترل نتایج نیز از یک گروه کنترل که شامل افراد عادی که هیچ تماسی با پرندگان نداشتند استفاده شد، که نتایج قبل و بعد از هضم سرمی آنها قابل ملاحظه بود؛ به طوریکه نتایج قبل از هضم سرم، مثبت بودن اکثریت سرمهای گروه کنترل از نظر وجود آنتی بادی علیه H9N2 را نشان می داد که همگی آنها

[1] Cheng
[2] Shenzhen
[3] Li
[4] Guangzhou
[5] Gou
[6] Guangzhou

Archive of SID

www.SID.ir

پس از هضم سرمی، منفی شدند که نشان از نتایج مثبت کاذب و وجود ممانعت کننده های غیر اختصاصی هماگلوتیناسیون در سرمهای گروه کنترل قبل از هضم را دارد. بررسیهای کامرون[1] (۲۰۰۰) و کریمی(۱۳۸۳) تشابه ویروس H9N2 ایران را با ویروس A/quail/Hk/G1/97 (H9N2) (ویروس آلوده کننده انسان در هنگ کنگ در سال ۱۹۹۹) را، نشان می دهد (۱، ۱۶).

در مطالعه ای که موسی خانی و همکاران (۱۳۸۴) روی ۱۲ ویروس H9N2 جدا شده از ایران انجام دادند، مشخص شد که ۱۰ ویروس از ۱۲ ویروس، در موقعیت ۲۲۶ دارای اسید آمینه لوسین بوده (مشابه ویروسهای انفلوانزای انسانی H2N2 و H3N2) و ۲ ویروس دیگر اسید آمینه گلوتامین دارند (۱۷). این ۱۰ ویروس اغلب مربوط به سال ۱۳۸۳ بوده و نشان دهنده تغییر ویروس در جهت ابتلای انسان است. بنابراین به دنبال تغییرات اسید آمینه در موقعیت ۲۲۶ ویروس H9N2 و کسب توانایی شناسایی گیرنده انفلوانزای انسانی، می توان این ویروس را به عنوان کاندیدی برای ایجاد پاندمی مطرح کرد (۲).

بنابراین مثبت شدن تستهای سرولوژیک در این مطالعه و مطالعات دیگر، مؤید تغییرات در سطح جایگاه اتصال به گیرنده و توانایی این ویروس در آلوده کردن انسان می باشد. منفی شدن تست ملکولی PCR در این مطالعه، نشان از توانایی کم ویروس H9N2 جهت تکثیر در سلولهای انسانی داشته، که به همین دلیل علاوه بر تغییرات انجام شده در این ویروس و داشتن توانایی بالقوه جهت آلوده کردن انسان ، کسب فاکتورهای دیگر جهت بیماریزایی در انسان توسط این ویروس، ضروری می باشد. یکی از فاکتورهای مهم، تغییر در توالیهای اسید آمینه موجود در ناحیه شکسته شدن ملکول HA است؛ با توجه به تحقیقات انجام شده بر روی اسیدهای آمینه ناحیه شکسته شدن پروتئین هماگلوتینین ویروس H9N2، توالی اسید آمینه در این ناحیه به دو شکل وجود دارد: شکل x-x-x-R (x اسید آمینه غیر بازی و R آرژنین) که اختصاصی سویه های غیر حاد H9N2 می باشد و شکل دیگر R-x-x-R که توانایی بالقوه تبدیل به توالی حاد را دارد. مطالعات کریمی، طرقی، موسی خانی و همکاران نشان می دهد که توالیهای جدا شده از ایران تاکنون همگی از نوع دوم بوده و توانایی تبدیل به توالی حاد را دارند و تنها برای تبدیل S به R، یک موتاسیون نقطه ای و تبدیل C به A یا G لازم است و در این صورت یک توالی مشابه توالی ویروسهای بسیار حاد تحت تیپهای H5 یا H7 (K-R یا R-x-R) در ویروس بوجود می آید و با توجه به تغییر ۱۲ اسید آمینه در این ویروسها در طول یک سال در مطالعه موسی خانی و همکاران روی ویروسهای H9N2 جدا شده از طیور ایران در سال ۱۳۸۳، در صورت گردش ویروس در مرغداریهای ایران، بروز این جهشهای نقطه ای محتمل است (۱۵).

با توجه به تغییرات انجام شده در اسید های آمینه در موقعیت ۲۲۶ و ۱۹۰ پروتئین هماگلوتینین ویروسهای H9N2 ایران و توالیهای خاص ناحیه شکستگی هماگلوتینین این ویروسها و داشتن توانایی بالقوه در تبدیل شدن به ویروسهای فوق حاد و همچنین نظر به شیوع جهانی ویروس انفلوانزای فوق حاد H5N1 به خصوص در کشورهای همسایه ایران و تشخیص این ویروس فوق حاد در قوهای مهاجر تالاب انزلی در سال گذشته و احتمال بازآرایی ژنتیکی آن با ویروس H9N2 و همچنین با توجه به گردش ویروسهای H9N2 در گله های طیور و افرادیکه با طیور در تماس هستند و بروز تغییرات در جهت آلوده نمودن انسان ، لزوم مبارزه با این ویروس ضروری می باشد .

نتیجه گیری

با توجه به مطالب عنوان شده، به منظور کنترل و شناسایی بهتر این ویروس باید نسبت به انجام واکسیناسیون افراد شاغل در کشتارگاهها و مرغداریها علیه ویروسهای انفلوانزای انسانی برای جلوگیری از بازآریی ژنتیکی با ویروسهای انفلوانزای پرندگان مبادرت ورزید.

واکسن H9N2 طیور با سویه های جدید ویروس ساخته شده و نسبت به تجدید این سویه واکسن هر ۶ ماه یکبار به منظور ساخت یک واکسن مؤثر و کارآمد و واکسینه نمودن گله های طیور کشور با استفاده از این واکسن جهت جلوگیری از گردش ویروس در سطح طیور کشور اقدام شود. همچنین بررسی پیوسته ملکولی شیوع های مختلف ویروس در مناطق مختلف به منظور

[1] Cameron

Archive of SID
www.SID.ir

مراقبت از تغییرات ویروس در جهت بیماریزایی و ابتلای انسان انجام شود.

توانایی بیماریزایی ویروسهای H9N2 ایران در پستانداران، با استفاده از آلوده کردن تجربی پستانداران کوچک مثل موش، هامستر و خرگوش و پارامترهای پاتولوژیک مربوط به این ویروس در این حیوانات بررسی شود. نسبت به پیگیری علل علائم مشابه انفلوانزا در کارکنان کشتارگاه و مرغداری به منظور جداسازی ویروس و تعیین توالی ژنوم ویروس به منظور بررسی تغییرات احتمالی و بیماریزایی آن اقدام شود .

تشکر و قدردانی

از ریاست محترم و همکاران بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج که در انجام این تحقیق نهایت همکاری کردند سپاسگذاری می شود.

References:

1- Cameron KR, Gregory V, Banks J, Brown IH, Alexander DJ, Hay AJ, *et al*. H_9N_2 subtype influenza viruses in poultry in Pakistan are closely related to the H_9N_2 viruses responsible for human infection in Hong Kong. Virology 2000; 228:36-41.
2- Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin.N, Gambaryan A, Klimov A, Castrucci MR, *et al*. Early alterations of the receptor-binding. Properties of H_1, H_2 and H_3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction in the mammals. J Virol 2000; 74:8502-8512.
3- Matrosovich M, Matrosovich T, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium.pnas. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101:4620-4624.
4- Matrosovich M, Krauss S, Webster R. H_9N_2 influenza viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specifity. Virology 2001; 281:156-162.
5- Who manual on animal influenza diagnosis and surveillance. 2002.Available at:www.who.int/CDS/CSR/NCS/2002.5
6- Wright.P.F, Gabriele N, Yoshihiro K. Orthomyxoviruses. In: Howley,K. Fields virology .5th ed. Lippincott: Williams and Wilkins publisher; 2007.p.?
7- Li Ch, Zhou Xz , Li MX. Discovery of avian influenza A(H9N2) virus in chickens and men infected by H9N2 virus in Guanzhou area. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 2004; 18:213-214.
8- Gou Y, Xie J, Wang M. A strain of influenza A H9N2 virus repeatedly isolated from human population in china. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 2000; 14:209-212.
9- Guo Y, Li J, Cheng X. Discovery of men infected by avian influenza A (H9N2) virus. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 1999; 13:105-108.
10- Cheng X, Liu J.Virological and serological surveys for H9N2 subtype of influenza A virus in chickens and men in shenzhen city. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 2002; 16:319-321.
11- Chan.P.K. Highly Pathogenesis avian influenza. Med Prog 2004; 525-528.
12- Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, Chin PS, Dyrting KC, Ellis TM, *et al*. H_9N_2 influenza viruses possessing H_5N_1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern J Virol 2000; 74: 9372-9380.
13- Cameron KR, Gregory V, Banks J, Brown IH, Alexander DJ, Hay AJ, *et al*. H_9N_2 subtype influenza viruses in poultry in Pakistan are closely related to the H_9N_2 viruses responsible for human infection in Hong Kong. Virology 2000; 228:36-41.
14- Horimoto T, Kawaoka Y. Pandemic Threat Posed by Avian influenza A viruses. Clin Microbiol Rev 2001; 14:129-149.
15- Azizi H, Aali A. The study of rate of affected people with influenza A H9N2. The 1st congress of zoonotic diseases. Islam Azad Unive (Karaj branch) 2006.
16- karimi V. Characterization of hemagglutinin gene of influenza A H9N2 virus in Iran during 1999-2003. Thesis of veterinary faculty of Tehran University. 2005.
17- Moosakhani.F. Characterization of hemagglutinin gene of influenza A H9N2 viruses isolated from industrial poultry of Iran during 2004-2005. Thesis of research & science section . Islam Azad Unive 2006.
18- Momayez R. (2000). Evaluation of influenza H9N2 virus antibody titers in workers of veterinary clinic and laboratory. The 1st Iranian congress of virology. 2000.

Archive of SID

www.SID.ir