

مقایسه و بررسی تغییرات ژنومی SARS-CoV-2 در مقایسه با توالی کوید ۱۹ در ایران

علی اکبر ولایتی^۱، پریسا فرنیای*^۱، سعید بشارتی^۱، پوپک فرنیای^۲، جلال الدین غنوی^۱

(۱) مرکز تحقیقات میکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری های ریوی (NRITLD)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
(۲) گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده:

ویروس کرونا (COVID-19) یک ویروس RNA دار، تک رشته ای با سنس مثبت است. این ویروس هم بطور طبیعی و هم بعد از انتقال به افراد دچار جهش می شود، که انتقال آن از بیماران به سایر افراد موجب افزایش جهش در ژنوم آن شده است. جهش در این ویروس به سازگاری آن با شرایط مختلف کمک کرده و قدرت بیماری زایی در افراد جدید را افزایش داده است. بررسی نقاط جهش یافته می تواند در تشخیص و درمان کمک کننده باشد. تفاوت در نوکلئوتیدهای ویروس نه تنها در میزبان ها مختلف بلکه در ساکنس های تهیه شده از نمونه های انسانی در کشورهای مختلف متفاوت است که این موضوع موجب شده تا سوال مهم در مورد ویروس که هر کشور در پی درمان، تشخیص و ساخت واکسن برای خود باشد، قوت بیشتری بگیرد.

واژگان کلیدی: کووید ۱۹، سندرم حاد تنفسی حاد ویروس کرونا ۲، جهش

* نویسنده مسئول:

دکتر پریسا فرنیای، مرکز تحقیقات میکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. پست الکترونیک: pfarnia@hotmail.com

مقدمه:

کووید ۱۹ (COVID-19) یک بیماری ویروسی است که به بوسیله کروناویروس سندرم حاد تنفسی شدید (SARS-CoV-2) ایجاد شده و در ۱۱ مارس ۲۰۲۰ توسط سازمان بهداشت جهانی به عنوان یک بیماری همه گیر معرفی شد [۱]. این ویروس کرونا علاوه بر ایجاد عفونت های تنفسی، می تواند باعث ایجاد عفونت در دستگاه گوارش نیز شوند. این ویروس به چهار جنس اصلی طبقه بندی می شود: کرونا ویروس آلفا و کرونا ویروس بتا می تواند باعث عفونت در پرستنداران و کرونا ویروس گاما و کرونا ویروس دلتا باعث آلودگی پرندگان می شود [۲].

اندازه ژنوم ویروس های کرونا ویروس بین ۲۶۰۰۰ تا ۳۲۰۰۰ است و شامل ۶ تا ۱۱ قاب خواندن باز (ORF) است. ORF1 بیشترین مقدار در ژنوم است و ۱۶ پروتئین غیر ساختاری (NSP) را رمزگذاری می کند. سایر ORF ها پروتئین های دیگر را رمزگذاری می کنند، از جمله پروتئین های جانبی و ساختاری. پروتئین هایی مانند گلیکوپروتئین سطح (S)، پروتئین پاکت (E)، پروتئین ماتریس (M) و پروتئین نوکلئوکپسید (N) از مهمترین پروتئین های ساختاری هستند [۳]. تجزیه و تحلیل ژنومی انجام شده بر روی SARS-CoV-2 نشان داد که این ویروس SARS-CoV-like β -lineage است. بعلاوه، این ویروس به احتمال زیاد از خفاش ها منشاء می گیرد. مطالعات ژنومی بر روی SARS-CoV-2 و خفاش کرونا ویروس (Bat-CoV) (RaTG13) ۹۶.۲٪ شباهت ژنتیکی را نشان داد اگرچه تا ۱۲۰۰ نوکلئوتید ممکن است متفاوت باشد [3,4]. با توجه به تغییر در تعداد و موقعیت نوکلئوتیدها در میزبانهای مختلف COVID-19 و احتمال جهش در این ویروس، چه بصورت طبیعی و چه پس از هر تکثیر یا انتقال، مطالعه توالی ژن COVID-19 در هر کشور ضروری به نظر می رسد.

طبقه بندی و ویژگی های COVID-19 - نوع A، B و C

ویروس های کرونا به طور معمول باعث عفونت های تنفسی شده و انسان و حیوان را تحت تأثیر قرار می دهد. شش کرونا ویروس شناخته شده است که دارای دو گونه

هستند، ویروس SARS-CoV و کرونا ویروس کرونا سندرم تنفسی خاورمیانه (Middle East respiratory syndrome)، که می تواند باعث بیماری تنفسی شدید شود [۵]. در مورد طبقه بندی بین COVID-19، جای تعجب است که علاوه بر بررسی توالی ویروس و سازماندهی ژنوم، که نمایانگر سه نوع A، B و C است، برخی از محققان پیشنهاد کرده اند که می تواند براساس مواردی باشد همچون نوع درمان و علائم بالینی و همچنین در صورت وجود یا عدم وجود اختلالات دیگر انجام شود [۶].

مطالعات در مورد سه نوع مختلف ویروس کرونا نشان داده است که نوع A دارای دو زیر مجموعه است: یکی مرتبط با نمونه ووهان و دیگری با نمونه آمریکا و استرالیا که متداول است. این دو زیر گروه با جهش هم معنی T29095C متمایز می شوند. مطالعه توسط فراستر (Forster) و همکاران نشان داد که کووید-۱۹ تیپ A نزدیکترین نوع به خفاش، "ژن اصلی ویروس انسانی" در ووهان است. با کمال تعجب، کووید-۱۹ تیپ A در ووهان غالب نبود. در ایالات متحده، نسخه های جهش یافته "A" در ووهان زندگی کرده اند و تعداد زیادی ویروس نوع A در بیماران ایالات متحده و استرالیا یافت شده است. نوع "A" با ویروس موجود در خفاش ها و پنگوئن ها ارتباط نزدیک دارد و می توان آن را "ریشه شیوع" توصیف کرد.

نشان داده شد که نوع B با دو جهش از نوع A بدست می آید: جهش هم معنی T8782C (در ORF1a)، کدونهای AGT به AGC، سرین به سرین، silent mutation) و جهش غیر هم معنی C28144T (در ORF8b، کدونهای TCA به TTA، سرین به لوسین، جهش nonsilent mutation). ژنوم نوع B در خارج از آسیا با جهش هایی تکامل یافته است. احتمال کمی وجود دارد که این پدیده به دلیل تاخیر ۱ ماهه و جهش همزمان ژنوم ویروسی قبل از شیوع آن در خارج از چین باشد. با این حال، نمی توان نادیده گرفت که ویروس نوع B با بخش بزرگی از شرق سازگار است. [۶، ۱۲]. ویروس نوع C دختر نوع B است که با جهش غیر مترادف G26144T (در پروتئین ORF3a) به دست می آید که باعث تغییر یک گلیسین به والین می شود. جهش غیرهم

جدول ۱ - تفاوت ویژگی های جهش های رخ داده در SARS-CoV-2.

| Mutation | Gene | Amino acid mutation | Kind of mutation |
|----------|--------------|---------------------|--------------------|
| T8782C | ORF1a | Ser to Ser | Silent mutation |
| T9561C | ORF1 | Leu to Ser | Nonsilent mutation |
| C15607T | ORF1b | Leu to Leu | Silent mutation |
| T18488C | ORF1b | Ile to Thr | Nonsilent mutation |
| C28144T | ORF8b | Sern to Leu | Nonsilent mutation |
| G26144T | ORF3 | Gly to Val | Nonsilent mutation |
| T28144C | ORF8 | Leu to Ser | Nonsilent mutation |
| C21707T | S | His to Tyr | Nonsilent mutation |
| T29095C | Nucleocapsid | Phe to Phe | Silent mutation |
| C28854T | N | Ser to Phe | Nonsilent mutation |
| G28878A | N | Ser to Asn | Nonsilent mutation |
| G29742A | 3-UTR | Arg-His | Nonsilent mutation |

Ile: Isoleucine, Thr: Threonine, His: Histidine, Tyr: Tyrosine, Gly: Glycine, Val: Valine, Leu: Leucine, Ser: Serine, Phe: Phenylalanine, Asn: Asparagine, Arg: Arginine

جدول ۲ - بررسی جهش ۵ توالی کل ژنوم در ایران با اولین بیمار hCov-19 در ووهان.

| Virus name | Mutation | Gene | Amino Acids | Length nucleotid |
|--------------------------------------|----------|-----------|-------------|------------------|
| hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 | AGG | ORF 1ab | arginine | 3510 |
| hCoV-19/Iran/HGRC-2-2162/2020 | AGG | ORF 1ab | arginine | 3471 |
| hCoV-19/Iran/KHGRC-3-2178/2020 | CGG | ORF 1ab | arginine | 3438 |
| hCoV-19/Iran/KHGRC-2-2162/2020 | CGG | ORF 1ab | arginine | 3438 |
| hCoV-19/Iran/KHGRC-1.1-IPI-8206/2020 | CGG | ORF 1ab | arginine | 3438 |
| hCoV-19_iran_HGRC-01-IPI-8206_2020 | AGG | ORF 1ab | arginine | 3291 |
| Silent mutation | | | | |
| Virus name | mutation | Gene | Amino Acids | length nucleotid |
| hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 | UGG | ORF 1ab | tryptophan | 8730 |
| hCoV-19/Iran/HGRC-2-2162/2020 | CGG | ORF 1ab | arginine | 8691 |
| hCoV-19/Iran/KHGRC-3-2178/2020 | CGG | ORF 1ab | arginine | 8658 |
| hCoV-19/Iran/KHGRC-2-2162/2020 | CGG | ORF 1ab | arginine | 8658 |
| hCoV-19/Iran/KHGRC-1.1-IPI-8206/2020 | CGG | ORF 1ab | arginine | 8658 |
| hCoV-19_iran_HGRC-01-IPI-8206_2020 | UGG | ORF 1ab | tryptophan | 8146 |
| (non-silent mutation) | | | | |
| Virus name | mutation | Gene | Amino Acids | length nucleotid |
| hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 | CUU | S protein | leucine | 22740 |
| hCoV-19/Iran/HGRC-2-2162/2020 | CCU | S protein | proline | 22701 |
| hCoV-19/Iran/KHGRC-3-2178/2020 | CCU | S protein | proline | 21732 |
| hCoV-19/Iran/KHGRC-2-2162/2020 | CCU | S protein | proline | 21732 |
| hCoV-19/Iran/KHGRC-1.1-IPI-8206/2020 | CCU | S protein | proline | 21732 |
| hCoV-19_iran_HGRC-01-IPI-8206_2020 | CUU | S protein | leucine | 22156 |
| (non-silent mutation) | | | | |

متحدہ آمریکا، فرانسه، ایتالیا، سوئد، انگلیس و برزیل مشاهده شده است. این نوع در چین مشاهده نشده است، اما شواهدی از وجود آن در برخی کشورهای آسیایی مانند هنگ کنگ، سنگاپور، تایوان و کره جنوبی وجود

معنی (nonsilent) G26144T نوع C را از نوع B متمایز می کند.

مطالعات روی مجموعه داده ها نشان داده است که نوع C در اروپا نوع اصلی است و در کشورهایی مانند ایالات

جدول ۳ - تعداد نوکلئوتیدها و فراوانی آن در ۵ ژنوم COVID-19 در ایران

| Nucleotide | hCoV-19 Iran_HGRC-2-2162_2020-1 | hCoV-19_Iran_HGRC-01-IP1-8206_2020-1 | hCoV-19_Iran_KHGRC-3-2178_2020 | hCoV-19_Iran_KHGRC-2-2162_2020 | hCoV-19_Iran_KHGRC-1.1-IP1-8206_2020 |
|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Adenine (a) | 8896 | 8500 | 8595 | 8595 | 8595 |
| Cytosine (c) | 5474 | 5227 | 5315 | 5315 | 5315 |
| Guanine (g) | 5849 | 5603 | 5657 | 5657 | 5657 |
| Uracil (u) | 9574 | 9171 | 9258 | 9258 | 9258 |
| Frequencies of adenine (a) | 0.299 | 0.297 | 0.298 | 0.298 | 0.298 |
| Frequencies of cytosine (c) | 0.184 | 0.183 | 0.184 | 0.184 | 0.184 |
| Frequencies of guanine (g) | 0.196 | 0.196 | 0.196 | 0.196 | 0.196 |
| Frequencies of uracil (u) | 0.321 | 0.32 | 0.321 | 0.321 | 0.321 |
| Frequencies of any nucleotide (n) | 0 | 133 | 0 | 0 | 0 |
| Frequencies of C + G | 11,323 | 10,830 | 10,972 | 10,972 | 10,972 |
| Frequencies of A + T | 18,470 | 17,671 | 17,853 | 17,853 | 17,853 |

COVID-19 ندارند. برای مطالعات بهتر در مورد این ویروس، لازم است داده های الگوهای خاص از انواع مختلف تجزیه و تحلیل شود. این الگوها (نوع A، B و C) می توانند به شناسایی، انتخاب داروی مناسب و درمان COVID-19 کمک کنند [۱۱،۷].

بررسی وجود سندرم شدید تنفسی حاد کرونا ویروس-۲-شبه CoV در کروناویروس خفاش و پنگولین

تجزیه و تحلیل SARS-CoV-2 نشان داد که این ویروس کرونا ویروس بتا از نوع SARS-CoV است. بعلاوه، این ویروس به احتمال زیاد از خفاش ها (خفاش نعل اسبی) منشأ می گیرد. خفاش نعل اسبی (*Rhinolophus ferrumequinum*) دارای توزیع وسیعی از قطب جنوب غربی (Western Palearctic) تا آسیای شرقی، اروپای جنوبی و آفریقای شمالی و از طریق دریای مدیترانه از جمله تمام جزایر بزرگ اروپای مرکزی است [۱۲،۱۳].

مطالعات ژنومی بر روی SARS-CoV-2 و Bat-CoV (RaTG13) 96.2٪ تشابه ژنتیکی را نشان داد، اگرچه ممکن است تا ۱۲۰۰ نوکلئوتید متفاوت باشد. با توجه به شیوع خفاش های نژاد اسب در شهرهای مختلف ایران از جمله آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، ارومیه، زنجان، اردبیل و خوزستان، این نگرانی وجود دارد که علاوه بر انتقال از انسان به انسان، COVID-19 از طریق خفاش ها به انسان نیز منتقل می شود. مطالعه ای توسط ژانگ و همکاران نشان داد که، مانند خفاش ها، گونه های پنگوئن مخزن طبیعی CoVs مانند SARS-

دارد [8]. نکته مهم در درمانهای رایج برای بیماران مبتلا به COVID-19 این است که داروهای مورد استفاده در درمان انواع مختلف COVID-19 (نوع A، B و C) در کشورهای مختلف بسته به شرایط بالینی و علائم بالینی بیمار متفاوت باشد. ۶۰ بیمار در بیمارستان ووهان تونگجی (Wuhan Tongji Hospital) چین با سه نوع A، B و C مورد معاینه قرار گرفتند. بیماران مبتلا به ذات الریه در گروه A طبقه بندی شدند. برای درمان بیماران مبتلا به COVID-19 نوع B، نظارت بر ذات الریه، ارزیابی های فردی و توسعه برنامه های درمانی خاص مانند درمان افت قند خون، درمان فشار خون بالا انجام شد. به نظر می رسد COVID-19 نوع C به دلیل تشدید بیماری نوع B و A و همچنین نارضایتی در درمان بیماران مبتلا به COVID-19 نوع A رخ می دهد. هنگامی که اثرات درمانی اولیه برای درمان بیماری نوع A رضایت بخش نباشد، منجر به آسیب دیدگی اعضای بدن می شود [9]. نتایج درمان در ۵۴ بیمار در هونان (Hunan)، چین، نشان داد که درمان بیماران مبتلا به COVID-19 با اینترفرون - $\alpha 2b$ موثر بوده، اما نوافرون (novaftron) موثر نبود. نیازی به درمان آنتی بیوتیکی نبود و کورتیکواستروئیدها باید با احتیاط مصرف شوند. همه بیماران اکسیژن درمانی شدند [10]. با توجه به این واقعیت که بیماران در چین با استفاده از اینترفرون- $\alpha 2b$ ، فایوپیرواویر، ریباویرین، رمدسیویر و گالیدیویزیر بهبود یافته اند، این امکان وجود دارد که این داروها در درمان نوع B و A موثر باشند. انواع مختلفی از این ویروس در برخی کشورها شناسایی شده است، اما برخی از کشورها مانند ایران اطلاعات کافی در مورد انواع

جدول ۴ - اطلاعات توالی ۵ ژنوم COVID-19 در ایران

| Virus name | Length (bp) | Weight (single stranded) | Location | Host | Patient status | Specimen source | Collection date | Sequencing technology |
|--------------------------------------|-------------|--------------------------|------------------|-------|----------------|-----------------|-----------------|---|
| hCoV-19/Iran/KHGRC-3-2178/2020 | 29,761 | 9,238,897 kDa | Asia/Iran | Human | Unknown | Throat swab | March 26, 2020 | Sanger dideoxy sequencing |
| hCoV-19/Iran/KHGRC-1.1-IPI-8206/2020 | 29,822 | 9,238,897 kDa | Asia/Iran/Semnan | Human | Hospitalized | Unknown | March 9, 2020 | Oxford Nanopore technology, Sanger dideoxy sequencing |
| hCoV-19/Iran/KHGRC-2-2162/2020 | 23,793 | 9,238,897 kDa | Asia/Iran/Tehran | Human | Hospitalized | Throat swab | March 29, 2020 | Oxford Nanopore technology, Sanger dideoxy sequencing |
| hCoV-19/Iran/HGRC-2-2162/2020 | 23,793 | 954,954 kDa | Asia/Iran | Human | Unknown | Throat swab | March 26, 2020 | Oxford Nanopore technology, Sanger dideoxy sequencing |
| hCoV-19/Iran/HGRC-01-IPI-8206/2020 | 29,828 | 917,824 kDa | Asia/Iran | Human | Unknown | Unknown | March 9, 2020 | Oxford Nanopore technology, Sanger dideoxy sequencing |

8206/2020), EPI_ISL_445088 (hCoV-19/Iran/KHGRC-3-2178/2020) برای بررسی نوکلئوتید الگوهای کدون از نرم افزار CLC Genomics Workbench (Denmark) (<https://www.qiagenbioinformatics.com>) استفاده شده است.

بررسی جهش در پنج نوکلئوتید hCoV-19 in Iran with hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 جهش کدون های مختلفی را نشان می دهد مانند: AGG به CGG (در جهش ORF1ab)، CGG به UGG (در جهش ORF1ab)، nonsilent جهش UUA به UUA (در جهش ORF1ab)، nonsilent جهش AGA به GGA (در جهش ORF1ab)، silent جهش AAC به AAU (در S)، silent جهش CCU به UCU (در S)، silent جهش UUC به UUU (در S)، silent جهش [جدول ۲].

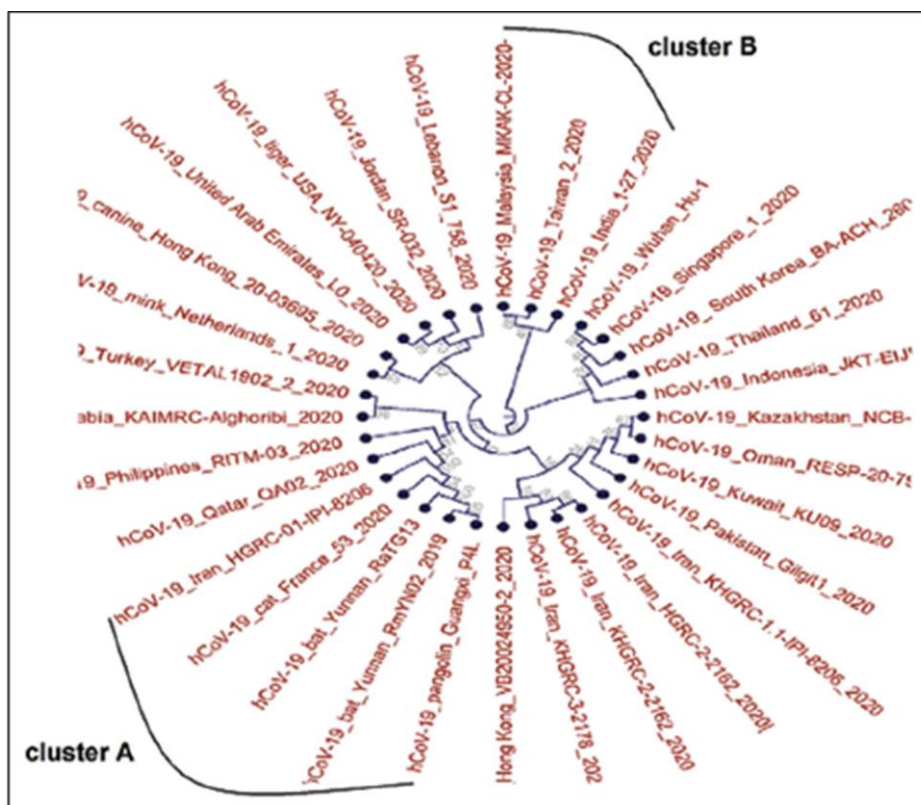
تجزیه و تحلیل پنج توالی نوکلئوتیدی در جمعیت hCoV-19 ایران نشان داد که ژنومی متغیر در ژن هایی مانند پروتئین غیر ساختاری (Nsp2، Nsp16، spike، Nsp6 و S، Nsp14) جهش بیشتری نسبت به ژن های دیگر دارد. مطالعه ای که توسط ون و همکاران انجام شده، در مورد توالی های نوکلئوتیدی نتایج مشابه ما را نشان داد، اما ژن هایی مانند nsp1، nsp3 و ORF1ab nsp15 و ژن S جهش بیشتری نسبت به ژن های دیگر داشتند [17]. به دلیل افزایش جهش در ژنوم ویروسی، ممکن است در آینده نزدیک موارد بیشتری از آن رخ دهد [18].

CoV-2 است، که می تواند میزبان رابط SARS-CoV-2 برای انتقال بیماری باشد. یافته های ژنومی و تکاملی CoV و pangolins مانند SARS-CoV-2 نشان می دهد که پنگوئن ها با SARS-CoV-2 و Bat-CoV (RaTG13) به ترتیب ۹۱.۰۲٪ و ۹۰.۵۵٪ مشابه هستند. نکته نگران کننده این است که SARS-CoV-2 ممکن است یک بار دیگر از طریق پانگولین در سراسر جهان گسترش یابد [۱۵،۱۴].

پردازش داده های ژنومی hCoV-19

ژنوم COVID-19 گزارش شده از آزمایشگاه ها و موسسات مختلف در سراسر جهان توالی یابی و به پایگاه جهانی ابتکار در مورد به اشتراک گذاری تمام داده های آنفلوانزا (GISAID) و پایگاه داده NCBI سپرده شده است. COVID-19 یک ویروس RNA دار تک رشته ای با سنس مثبت است. جهش های مختلفی که شناسایی شده اند در جدول ۱ آورده شده است [۱۵،۱۶]. تا ۵ جولای سال ۲۰۲۰، تعداد 60,028 توالی ژنوم SARS-CoV-2 در بیماران با COVID-19 در کشورهای مختلف جهان و میزبان واسط در پایگاه داده GISAID شناسایی و ذخیره شده است.

ژنوم منتشر شده ایرانی SARS-CoV-2 761-29 (828 جفت باز) با شماره های توالی (نام ویروس) آنها از پایگاه اطلاعاتی GISAID بارگیری شد: EPI_ISL_424349 (hCoV-19/Iran/HGRC-01-IPI-8206/2020)، EPI_ISL_437512 (hCoV-19/Iran/HGRC-2-2162/2020)، EPI_ISL_442044 (hCoV-19/Iran/KHGRC-2-2162/2020)، EPI_ISL_442523 (hCoV-19/Iran/KHGRC-1.1-IPI-



شکل ۲ - تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار CLC Main Workbench.

توالی های ژنومی COVID - 19

ژنوم ویروس دارای شش ORF اصلی است که در ویروس کرونا و برخی دیگر از ژن های جانبی مشترک است. ORF1a / b (اولین ORF ها) حدود ۷۰٪ (دو سوم) طول کل ژنوم را که ۱۶ پروتئین غیر ساختاری را کد می کند (nsp1-16). ORF های دیگر حدود ۳۰٪ (یک سوم ژنوم) پروتئین های ساختاری اصلی را کد می کند: پروتئین های S، M، E و N. پروتئین های ساختاری و جانبی ویژه توسط این چهار پروتئین رمزگذاری می شوند [۱۹].

تجزیه و تحلیل ژن های nCoV-2019 نشان می دهد که برخی از این ژن $> 80\%$ هویت توالی نوکلئوتیدی با SARS-CoV مشترک است. با این حال، توالی اسیدهای آمینه هفت حوزه تکثیر محافظت شده در ORF1ab که برای گونه های CoV بین ۲۰۱۹- nCoV و SARS-CoV مورد استفاده قرار گرفتند دارای توالی یکسان ۹۴.۴٪ بودند. شاید، این دو ویروس به یک گونه، SARS-CoV، تعلق داشته باشند. یک مطالعه یکپارچه نشان داد که یک منطقه کوتاه RNA

پلیمرز وابسته به RNA از Bat-CoV (RaTG13) (که قبلاً در *Rhinolophus affinis* از شهر یونان شناسایی شده بود) هویت توالی بالایی را شناسایی کرده که nCoV-2019 از آن برخوردار است. رابطه نزدیک بین فیلوژنی RaTG13 آشکار است که ممکن است nCoV-2019 از خفاش ها منشاء گرفته باشد. [20].

آمار توالی نوکلئوتیدها

بررسی توالی نوکلئوتید نشان داد که EPI_ISL_437512، ISL_445088، EPI_ISL_442523 در اواسط دنباله محافظه کاری کمتری بین نوکلئوتید ۱۹،۲۴۰ و ۲۰،۱۷۴ bp دارند. فراوانی A + T و C + G در سه ژنوم به ترتیب ۱۰۹۷۲ جفت باز و ۱۷،۸۵۳ جفت باز یکسان بودند. نوکلئوتیدهای A، T، C و G در hCoV19_iran_HGRC-2-2162_2020-1 بیشتر از دیگری بودند [جدول ۳].

توالی های نوکلئوتیدی بین hCoV-19 / Iran / hCoV-19 / KHGRC-3-2178 / 2020 / ایران / hCoV-19 / KHGRC-1.1-IPI-8206/2020 / ایران / KHGRC-2-2162 / 2020 / ایران دارای شباهت

و عدم پاسخ PCR، که منجر به نتیجه منفی کاذب آزمایش می شود.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

برای تجزیه و تحلیل ژنوم، ما پنج ژنوم ویروس کرونا ویروس انسانی منتشر شده از ایران، چندین hCovid-19 در آسیا و خفاش، پانگولین، ببر، گربه و یک ژنوم ویروس کرونا انسانی کامل از چین را بررسی کردیم.

توالی ژنوم را توسط BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

شناسایی کردیم. از نرم افزار CLC Main Workbench (Bioinformatics, CA, USA)

برای ترازبندی توالی های ژنوم استفاده شد و سپس درختان فیلوژنتیک با استفاده از روش احتمال likelihood بررسی شد. خوشه مشخص داده شده با

فلش A [شکل ۲] نشان می دهد که توالی ایران (hCoV-19_Iran_HGRC-01-IPI-8206) دارای

همسانی با خفاش (hCoV-) (19_bat_Yunnan_RaTG13)، خفاش

پنگولین (bat_Yunnan_RmYN02_2019)، (hCoV-19_pangolin_Guangxi_P4 L) و گربه

(hCoV-19_cat_France_53_2020) است.

دسته (Cluster) نشان داده شده با فلش B [شکل ۲] توالی همسانی بین تابوان (hCoV-) (19_Taiwan_2_2020)، هند (hCoV-) (19_India_1-27_2020) و مالزی (MKAK-CL-2020-5045_2020) را نشان

می دهد. شباهت توالی های نوکلئوتیدی به دلیل مجاورت این سه کشور با یکدیگر، انتقال در نتیجه سفر

به هر یک از این کشورها را امکان پذیر می کند. یک مطالعه توالی پاکستانی گزارش داد که بیمار ۵ روز قبل از

نمونه برداری به ایران سفر کرده است. این بررسی همچنین توالی های مشابهی را بین پاکستان و ایران

نشان داده است.

نشان داده است.

بحث:

از آنجا که ORF1 و پروتئین S ساختارهای مهمی در ویروس هستند، جهش در این مناطق ممکن است

بیماری را تشدید کند و به دلیل استفاده از این مناطق برای طراحی آغازگر، تشخیص ممکن است منفی کاذب

۱۰۰٪ بود. طول (bp) این سه ویروس متفاوت بود. همسانی در بین ۵ سویه ویروسی از ایران به طور کلی زیاد بود. اطلاعات مربوط به موقعیت، وضعیت بیمار، نوع نمونه و... در جدول ۴ نشان داده شده است.

توالی مرجع (hCoV-19 / Wuhan / IVDC-HB-01/2019) از پایگاه داده GISAID در مقایسه با چندین توالی ژن COVID-19 در ایران مانند:

hCoV-19/Iran/ KHGRC-3-2178/2020 | EPI_ISL_445088|, hCoV-19/Iran/KHGRC-1.1-IPI-8206/2020 | EPI_ISL_442523|,

hCoV-19/Iran/KHGRC-2-2162/2020 | EPI_ISL_442044|, hCoV-19/ Iran/HGRC-2-2162/2020 | EPI_ISL_437512|, and hCoV-19/ Iran/HGRC-01-IPI-8206/2020 | EPI_ISL_424349|

بررسی ها نشان داد که چندین جهش از جمله جهش هایی مانند silent و nonsilent در ژنوم های ایرانی مشاهده شد.

hCoV-19 / Iran / HGRC-01-IPI-8206/2020 EPI_ISL_424349 | ویروس ۲۰۲۰-۰۳-۰۹ در ابتدا و انتهای ژنوم دارای شکاف است، در حالی که hCoV-19 / Iran / KHGRC-3-2178 / 2020-03-26 EPI_ISL_445088 |

hCoV-19 / Iran / KHGRC-2 -2162/2020 hCoV-19 | 2020-03-26 EPI_ISL_442044 | و HGRC-01-IPI-8206/2020 /Iran / 2020-03-09 EPI_ISL_424349 | بیشترین شکاف را در وسط ژنوم دارند.

قابلیت اطمینان روش مولکولی RT - PCR با جهش رخ داده

جهش ها در COVID-19 هم به طور طبیعی و هم در انتقال انسان به انسان رخ می دهد. این جهش ها ممکن است باعث شدت بیشتر بیماری، علائم مختلف بالینی و مشکلات در تشخیص با روش های مولکولی مانند RT-PCR شود.

به دلیل جهش در مناطقی مانند ORF، پروتئین های S و پروتئین های N در ویروس کرونا (جدول ۲)، این امکان وجود دارد که ویژگی آغازگرها، کاوشگر خاص و جهش در این مناطق منجر به عدم اتصال پرایمر یا پروب

به دلیل جهش در مناطقی مانند ORF، پروتئین های S و پروتئین های N در ویروس کرونا (جدول ۲)، این امکان وجود دارد که ویژگی آغازگرها، کاوشگر خاص و جهش در این مناطق منجر به عدم اتصال پرایمر یا پروب

به دلیل جهش در مناطقی مانند ORF، پروتئین های S و پروتئین های N در ویروس کرونا (جدول ۲)، این امکان وجود دارد که ویژگی آغازگرها، کاوشگر خاص و جهش در این مناطق منجر به عدم اتصال پرایمر یا پروب

به دلیل جهش در مناطقی مانند ORF، پروتئین های S و پروتئین های N در ویروس کرونا (جدول ۲)، این امکان وجود دارد که ویژگی آغازگرها، کاوشگر خاص و جهش در این مناطق منجر به عدم اتصال پرایمر یا پروب

به دلیل جهش در مناطقی مانند ORF، پروتئین های S و پروتئین های N در ویروس کرونا (جدول ۲)، این امکان وجود دارد که ویژگی آغازگرها، کاوشگر خاص و جهش در این مناطق منجر به عدم اتصال پرایمر یا پروب

به دلیل جهش در مناطقی مانند ORF، پروتئین های S و پروتئین های N در ویروس کرونا (جدول ۲)، این امکان وجود دارد که ویژگی آغازگرها، کاوشگر خاص و جهش در این مناطق منجر به عدم اتصال پرایمر یا پروب

به دلیل جهش در مناطقی مانند ORF، پروتئین های S و پروتئین های N در ویروس کرونا (جدول ۲)، این امکان وجود دارد که ویژگی آغازگرها، کاوشگر خاص و جهش در این مناطق منجر به عدم اتصال پرایمر یا پروب

- 10) Huang Q, Deng X, Li Y, Sun X, Chen Q, Xie M, Liu S, Qu H, Liu S, Wang L, He G. Clinical characteristics and drug therapies in patients with the common-type coronavirus disease 2019 in Hunan, China. *International journal of clinical pharmacy*. 2020 May 14;14:1.
- 11) van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, Bestebroer TM, Raj VS, Zaki AM, Osterhaus AD, Haagmans BL, Gorbalenya AE, Snijder EJ, Fouchier RA. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio*. 2012 Dec 31;3(6).
- 12) Ransome R, Hutson AM. Action plan for the conservation of the greater horseshoe bat in Europe (*Rhinolophus ferrumequinum*). Council of Europe; 2000.
- 13) Pavlinic I, Dakovic M. The greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* in Croatia: present status and research recommendations. *Natura Croatica*. 2010 Dec 1;19(2):339.
- 14) Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, Yuan ML. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):265-9.
- 15) Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Penaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *science*. 2003 May 30;300(5624):1394-9.
- 16) Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, Meng J, Zhu Z, Zhang Z, Wang J, Sheng J. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell host & microbe*. 2020 Feb 7.
- 17) Wen F, Yu H, Guo J, Li Y, Luo K, Huang S. Identification of the hyper-variable genomic hotspot for the novel coronavirus SARS-CoV-2. *The Journal of Infection*. 2020 Mar 5.
- 18) Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*. 1992 Jun 1;8(3):275-82.
- 19) Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology journal*. 2019 Dec;16(1):1-22.
- 20) Matyášek R, Kovařík A. Mutation patterns of human SARS-CoV-2 and Bat RaTG13 coronavirus genomes are strongly biased towards C> U transitions, indicating rapid evolution in their hosts. *Genes*. 2020 Jul; 11(7):761.

باشد. جهش در این موارد و دیگر مناطق مهم از ویروس ممکن است شدت بیماری را افزایش دهد.

نتیجه گیری:

این مطالعه رابطه hCoV - 19 / Wuhan با hCoV - 19 / ایران بر روی ژنوم را نشان داد. جهش در پنج ژنوم ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. جهش های silent و nonsilent در توالی ژنوم مشاهده شد.

منابع:

- 1) Xiong J, Lipsitz O, Nasri F, Lui LM, Gill H, Phan L, Chen-Li D, Iacobucci M, Ho R, Majeed A, McIntyre RS. Impact of COVID-19 pandemic on mental health in the general population: A systematic review. *Journal of affective disorders*. 2020 Aug 8.
- 2) Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020 Feb 22;395(10224):565-74.
- 3) Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2020 Mar 31.
- 4) Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, Zhu H, Zhao W, Han Y, Qin C. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses*. 2019 Jan;11(1):59.
- 5) Marini JJ, Gattinoni L. Management of COVID-19 respiratory distress. *Jama*. 2020 Apr 24.
- 6) Pfefferle S, Oppong S, Drexler JF, Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Müller MA, Annan A, Vallo P, Adu-Sarkodie Y, Kruppa TF. Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana. *Emerging infectious diseases*. 2009 Sep;15(9):1377.
- 7) Forster P, Forster L, Renfrew C, Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020 Apr 28;117(17):9241-3.
- 8) Wen F, Yu H, Guo J, Li Y, Luo K, Huang S. Identification of the hyper-variable genomic hotspot for the novel coronavirus SARS-CoV-2. *The Journal of Infection*. 2020 Mar 5.
- 9) Wang T, Du Z, Zhu F, Cao Z, An Y, Gao Y, Jiang B. Comorbidities and multi-organ injuries in the treatment of COVID-19. *The Lancet*. 2020 Mar 21;395(10228):e52.



Investigation of SARS-CoV-2 Genomic Changes in Comparison with COVID-19 Sequence in Iran

Ali Akbar Velayati¹, Parissa Farnia^{1*}, Saeid Besharati¹, Poopak Farnia²,
Jalaledin Ghanavi¹

- 1) Mycobacteriology Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- 2) Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract:

The corona virus (COVID-19) is a positive, single-stranded RNA virus. The virus mutates both naturally and after transmission to humans, transmitting it from patients to others, causing an increase in the mutation in its genome. Mutations in the virus have helped it adapt to different conditions and increase the pathogenicity of new individuals. Examination of mutated sites can be helpful in diagnosis and treatment. Differences in virus nucleotides vary not only in different hosts but also in sequences prepared from human samples in different countries, which raises the important question of which virus each country seeks to treat, diagnose, and develop its own vaccine. , Get more strength.

Keywords: COVID-19, severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, mutations.

* Corresponding Author:

Prof. Parissa Farnia, Mycobacteriology Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: pfarnia@hotmail.com