



Evolutionary Evaluation of the Dominant Genetic Haplotype of SARS-CoV-2 Virus in Iran from June to November 2020

Shirin Jalili^{1*} PhD, Hadi Shirzad¹ PhD, Sadegh Salehi¹ MSc, Peyman Taghizadeh¹ MSc, Reza Mohamadi² PhD

¹ Research Center for Life & Health Sciences & Biotechnology in the Police, Directorate of Health, Rescue & Treatment, Police Headquarter, Tehran, Iran.

² Research Center for Cognitive & Behavioral Sciences in Police, Directorate of Health, Rescue & Treatment, Police Headquarter, Tehran, Iran.

ABSTRACT

AIMS: Preliminary studies of nucleotide changes in virus genomic sequences identified 13 haplotype groups. Among these haplotypes, cases H1, H2 and H5 showed the highest frequency in the world. Therefore, changes in the mononucleotide label in these haplotypes were evaluated using PCR in the Iranian population.

MATERIALS & METHODS: RNA samples of this cross-sectional study were obtained from individuals who were referred to one of the police diagnostic laboratories in Tehran, Iran from June to November 2020 and had to be tested for COVID-19 by PCR. 300 samples were randomly selected. To identify and determine the frequency, changes of mononucleotide tags in haplotypes H1, H2, and H5 of all samples were examined using ARMS-PCR. A number of samples were sequenced by the Sanger method to ensure the accuracy of ARMS-PCR results.

FINDINGS: Genotyping of genomic samples showed that 122 samples had H5 haplotype group index mutation H5 (28688T>C) and 158 samples had H1 haplotype group index mutation H1 (14408C>T) It was also observed that 11 samples were infected simultaneously with two different viral haplotypes. In addition, the H2 haplotype group was not observed in the samples.

CONCLUSION: RNA samples of this cross-sectional study were obtained from individuals who were referred to one of the police diagnostic laboratories in Tehran, Iran from June to November 2020 and had to be tested for COVID-19 by PCR. 300 samples were randomly selected. To identify and determine the frequency, changes of mononucleotide tags in haplotypes H1, H2, and H5 of all samples were examined using ARMS-PCR. A number of samples were sequenced by the Sanger method to ensure the accuracy of ARMS-PCR results.

KEYWORD: SARS-CoV-2; COVID-19; Coronavirus Mutation; Haplotypes; Single Nucleotide Polymorphism

How to cite this article:

Jalili S, Shirzad H, Salehi S, Taghizadeh P, Mohamadi R. Evolutionary Evaluation of the Dominant Genetic Haplotype of SARS-CoV-2 Virus in Iran from June to November 2020. J Police Med. 2022;11(1):e14

*Correspondence:

Address: Research Institute of Police Science and Social Studies, Vali-e-Asr Street, Tehran, Iran.
Postal Code: 6516-19395
Tel: +982181235481
Mail: jalili.shirin@yahoo.com

Article History:

Received: 05/12/2021
Accepted: 12/02/2022
ePublished: 16/03/2022

Introduction

... [1-13]. Preliminary studies identified 66 haplotypes and sub-haplotypes on SARS-CoV-2 virus genomic sequences in 13 H1-H13 haplotype groups [14, 15]. These groups have been identified and defined as the most common genotyped haplotypes in viruses spread in the early stages of the COVID-19 pandemic [14, 15]. ... [16-18]. According to the data obtained from the studies of *Dr. Elahi et al.* On many sequences registered from other countries in the GISAID database, it has been found that three haplotypes (H5, H2, H1) among these haplotypes show the highest frequency compared to the others in the early stages of the COVID-19 epidemic [14].

Aim (s)

This study aimed to evaluate the evolution of the dominant genetic haplotypes of the SARS-CoV-2 virus in Iran from June to November 2020.

Research Society, Place and Time

Viral RNA samples from this cross-sectional study, whose COVID-19 infection was confirmed by PCR test, were collected from individuals who were referred to one of the police force diagnostic laboratories in Tehran, Iran from June to November 2020.

Sampling Method and Number

The sample size was estimated to be 300 people. Sampling was performed completely randomly, regardless of age, sex, or severity of the disease

in infected individuals. In selecting the samples, it was also tried not to select people with a relative ratio who were likely to be infected with a type of virus. The samples were included in the study in such a way that first the PCR test of the subjects should be positive and also the (Cycle threshold) CT of these samples should be between 14 and 24.

Used Devices & Materials

As a pattern, RNA samples were used to perform cDNA synthesis reactions using Mastermix cDNA synthesis (BIO FACT, Korea; Cat no: BR441-096). In these reactions, all three reverse PCR primers related to each of the three mutations were used. After cDNA synthesis from RNA samples, the ARMS-PCR technique was used to determine the genotype of nucleotides located in genomic positions T<14408C in haplotype H1 and T<8782C in haplotype H2 and mutation C<28688 in haplotype H5. For the ARMS-PCR response for mutations of T<14408C, T<8782C, and C<28688T, six primer pairs were designed using Gene runner v6.5.52Beta software to amplify the target genomic regions in such a way that the amplified fragment was amplified in the region. No mutation occurs only in the presence of the unchanged sequence-specific primer, and amplification of the fragment of the mutant region occurs only in the presence of the mutant-specific primer ([Table 1](#)).

Therefore, for each synthesized cDNA sample, two series of PCR reactions were performed using MasterMix PCR (amplicon; 180301-50 2X Master Mix Red-Mgcl2: 15mM) and primers related to

Table 1) List of primers used in this research

Number	Primer name	sequence primer	Tag SNV	Haplotype	Product Name	Piece length
1	H1-14408C>T-out-rv	TAGATTACCAGAAGCAGCGTG				
2	H1-14408C>T-mut. in-fw	TTTATTCTCTACAGTGTTCCTCAACT	14408C>T	H1	ARMS-Mutant	216
3	H1-14408C>T-out-fw	TATACGCCAACTTAGTGAACG				
4	H1-14408C>T-wt.in-rv	CACTAGTGGTCCAAAACCTTTTAG	14408C>T	H1	ARMS-Normal	470
5	H2-28144T>C-out-fw	CTGTAGCTGCATTCACCAAG				
6	H2-28144T>C-mut. in-rv	CCTGGCAATTAATTGTAAAAGTTG	8782C>T	H2	ARMS-Mutant	240
7	H2-28144T>C-wt. in-fw	GGTAATTATACAGTTTCCTGGTT				
8	H2-28144T>C-out-rv	GATCTTTCATTTACCGTCACCA	8782C>T	H2	ARMS-Normal	462
9	H5-28688T>C-out-fw	ACACCAATAGCAGTCCAGATG				
10	H5-28688T>C-mut. in-rv	ATGTGATCTTTTGGTGTATGCAG	28688T>C	H5	ARMS-Mutant	214
11	H5-28688T>C-out-rv	AGTTCCTTGTCTGATTAGTTCCT				
12	H5-28688T>C-wt.in-fw	GGTTGCAACTGAGGGAGACT	28688T>C	H5	ARMS-Normal	493

each change. The first reaction was with primers related to the non-mutated region and the second reaction was performed with the primers related to the mutated region. In haplotype H1, the length of the amplified fragment corresponding to the mutated region was 216 bp and the length of the amplified fragment related to the non-mutated region was 470 bp. Therefore, in electrophoresis of PCR products, mutated and non-mutated samples were observed on agarose gel with 216 and 470 bp bands, respectively. Also, in the studied change, in the H2 haplotype, a band with a fragment mutation of 240 bp is synthesized and in the normal sample, no fragment mutation with a length of 462 bp is synthesized. In the H5 haplotype, the amplitude of the amplified fragment for mutated and non-mutated regions was 214 and 493 bp, respectively. As a result, 214 bp and 493 bp bands were observed by electrophoresis of PCR products on an agarose gel. Then, to verify the

results of genotyping the target genomic loci, the genomic fragments of 20 samples were sequenced by the Sanger sequencing method. Sequences were analyzed using Sequencher.V5.4.6 software. The Wuhan-Hu-1 isolated genome sequence (NC_045512.2) was also used as the SARS-CoV-2 reference sequence using the NCBI database.

Ethical Permissions

This plan was approved by the Research Council of the Deputy of Health of the police force in 2020 with the code 990706/03/33 and all ethical considerations were observed.

Finding by Text

A total of 291 valid RNA samples were collected from 300 cases of genomic material extracted from patients, and the dispersion of the samples received during different months was recorded (Table 2).

Table 2) Demographic table of samples received during June-November and frequency of H1 and H5 haplotypes

Date of receiving the sample (month)	Number of received samples	Number of H5 response samples	Number of H1 response samples	Number of infected samples with two viruses	H5 (%)	H1 (%)	Percentage of frequency of samples infected with two viruses
June	47	38	9	0	80	20	0
July	49	35	13	1	71	27	2
August	50	26	21	3	52	42	6
September	50	17	31	2	32	62	4
October	47	5	39	3	10	83	7
November	48	1	45	2	2	94	4
Total	291	122	158	11	42	54	4

The age of the subjects was reported to be between 17 and 66 years, which included both males and females. After cDNA synthesis and ARMS-PCR reactions and electrophoresis of the obtained products, it was observed that a total of 122 samples with C<T 28688 mutation belonged to the H5 haplotype, which was in the months of June to November (respectively 38-35-26-17-5). 1) The sample was observed and 158 samples with mutation of T<C14408 belonged to H1 haplotype that the distribution of samples during the months of June to November were (9-13-21-31-39 and 45) respectively (Table 2; Figure 1 and 2 a).

As a result, they showed a frequency of 42% and 54%, respectively. The results of the Sanger sequencing also confirmed these results (Figures 1 and 2 c). The frequency of carriers was also compared by sample collection months. In the first months of the study period (June), the H5 haplotype group was the first group to be observed in the Iranian patient population after the COVID-19 epidemic, but gradually due to H1 haplotype prevailed due to the dynamics of the virus genome and new changes in the genome; So that in the

last months of the selected period (November), in our samples, haplotype H1 reached a frequency of nearly 100% (Figure 3). While examining the samples in the period of six months, respectively, from June to November, 11 samples (0-1-3-2-3-2) with two nucleotides were observed in one place, which means that the person infected with two viruses has genetic haplotypes. Was infected differently. At the beginning of the study period, when only the H5 haplotype was the dominant haplotype, no specimens with two different nucleotides were observed at the same site, but over time, both H1 and H5 viral haplotypes were observed in the population. 11 infected samples were observed that were infected with both H1 and H5 viral haplotypes (Figures 1 and 2b). H2 haplotype was also the first group to appear in a very short time in the early days of the COVID-19 epidemic in East Asia, including China. The study also tested this haplotype group, which was not found in any of the sequences, and as a result, it was predicted that the H2 haplotype group was most likely removed from the viral population. Therefore, no haplotype of H2 was observed in

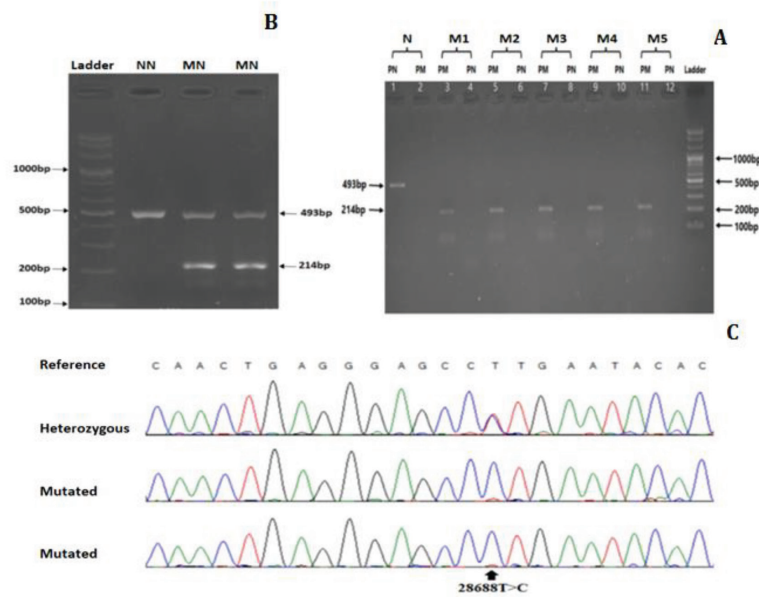


Figure 1) 28688C> T mutation in H5 haplotype: a) Electrophoresis pattern of PCR products with ARMS-PCR protocol, two models are presented for each sample. A pattern represents the products obtained with the mutants in the no-mutation region and amplifies the 493 base pair fragment (PN). Another represents the products obtained with primers related to the mutated region that amplify the 214 bp fragment (PM). Wells 1 and 2 belong to a normal sample (N) in which only 493 bp fragment was observed. Wells 12-3 correspond to 5 mutant samples (M1-M5) in all of which only 214 bp fragments have been propagated. B) The gel electrophoresis pattern is two heterozygous (MN) samples, both of which were 214 and 493 bp, indicating that the infected person was infected with two different viruses, as well as a normal non-mutant (NN) sample as a control that was only a fragment. 493 base pairs were found. C) Chromatogram of two samples with mutation 28688C> T and one sample heterozygous. The desired mutation point is marked with an arrow

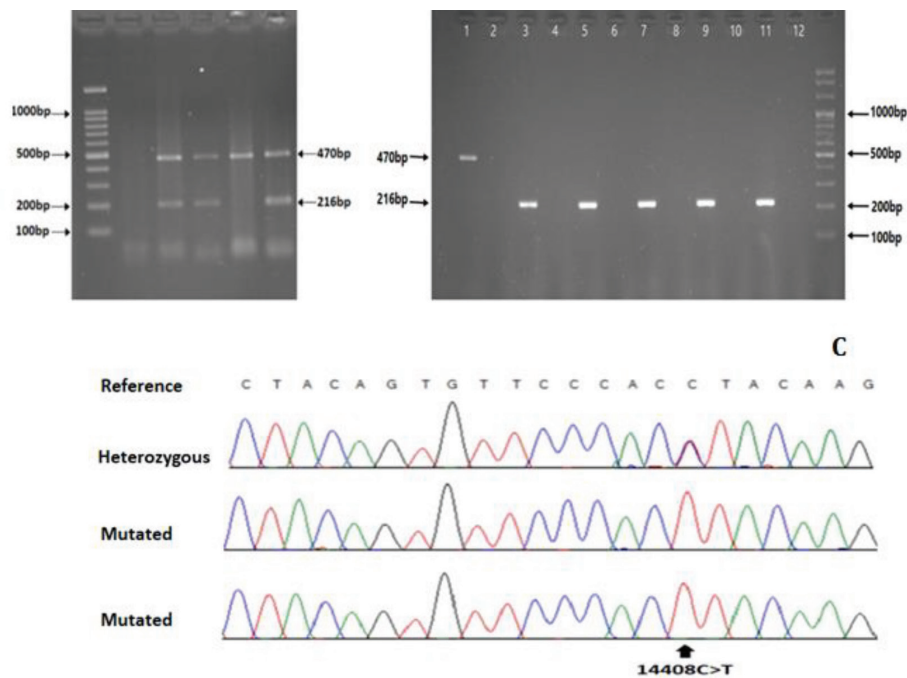


Figure 2) Mutation of 14408C>T Existence in haplotype H1: a) The Electrophoresis pattern of PCR products is with ARMS-PCR protocol that two models are presented for each sample. One pattern represents products produced with primers from the non-mutation region, and the amplifier amplified from it is 470 bp in length (PN). Another represents products obtained with primers from mutant regions that amplify a 216 bp fragment (PM). Wells 1 and 2 belong to a normal sample (N) in which only the amplitude corresponding to the mutation number region with a length of 470 bp is observed. Wells 12-3 belong to 5 mutation specimens (M1-M5), in all of which only 216 bp fragments from the mutant region have been amplified. B) The gel electrophoresis pattern is three heterozygous (MN) samples, both of which are 216 and 470 bp, indicating that the infected person is infected with two different viruses, as well as a non-mutant (NN) sample that is only controlled. 470 based pairs were seen. C) Chromatogram of two samples with mutation 14408C> T and one sample heterozygous. The jump point is marked with an arrow.

this project. The results of this study also showed that all 291 samples that were PCR'd were in two groups of haplotypes H1 and H5.

Main Comparison to the Similar Studies

The first virus sequence from Iran was uploaded on April 4 in GISAID (EPI_ISL_424349). In the same study, *Eden et al.* observed three major mutations in G1397A, T28688C, and G29742T in the genomes of patients with a history of travel to Iran, representing a distinct haplotype group of specific viral variants present in Iran at the

time [19] and indicating the first. The sequence is available to the Iranian population with the H5 strain. As of October 23, 2020, there were only eight complete genomes in GISAID that were not sufficient to detect the virus in the country, and in the only epidemiological study of the outbreak in Iran, they used a genomic sequence specified from travelers to Iran. After some time, *Najmabadi et al.* In their study performed 50 samples of the virus genome in Iran incomplete genomic sequencing. The results of *Najmabadi et al.'s* research show that the primary viruses infecting the Iranian

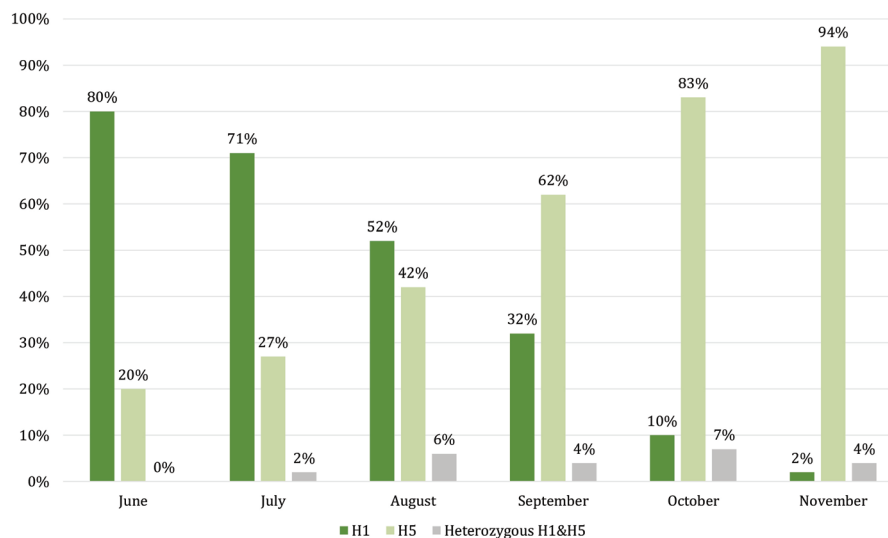


Figure 3) Frequency changes of H1 and H5 haplotypes: shows the frequency of two common haplotype groups H5 and H1, in a period of 6 months (June-November). The H5 haplotype was the first group observed in the Iranian patient population, but after a short time, the H1 haplotype was able to become the dominant group. During the period of July (July-November), samples infected with two viruses with different haplotype groups (H1 and H5) were also observed.

population are in two phylogenetic branches B4 and B1 [20]. Comparing the results obtained from the Najmabadi study and the present study, it was found that branch B1 was the same haplotype group H5 and branch B4 was the same haplotype group H1 [21-23]. Genotyping approaches in this study will significantly reduce research costs by detecting the dominant strain of the population using the simple and inexpensive ARMS-PCR technique instead of the costly whole virus genome sequencing technique. To the best of our knowledge, no such project has been reported in Iran before. ... [24, 25]. These mutations can be interpreted as meaning that the virus can make changes to its genome depending on the conditions in which it is located, to increase its proliferation rate or its binding power by altering the structure of the tentacles to cell surface receptors.

Limitations

Due to temperature sensitivity, the ARMS method requires great care in setting up and obtaining the

correct result. To confirm the correct operation of the method, it must be randomly controlled by the sequencing method, which was one of the limitations of this study.

Suggestions

Due to the frequent changes in the virus genome and the possibility of creating new haplotypes with different phenotypic effects, it is suggested that the changes be examined periodically until the complete termination of the disease.

Conclusions

Estimates indicate that the predominant population of viruses infecting Iranians at the beginning of the epidemic had the H5 haplotype. Following the significant expansion of the H1 haplotype group worldwide and over time, this group replaced H5 as the dominant haplotype. H1-type sequences have significant changes in the RdRp and S genes, which are involved in virus replication and binding to the host cell,

respectively.

Clinical & Practical Tips in Police Medicine

By identifying the dominant strain of the population in the target range at a much lower cost than complete genomic sequencing, a prelude to other epidemiological studies in the police community was provided.

Acknowledgments

We thank the medical staff of the police hospital, especially the genetic laboratory, the patients studied in the project, and other professors and people who helped us in this project.

Conflict of Interest

The authors state that there is no conflict of interest in the present study.

Funding Sources

The Deputy of Health police headquarter was the financial sponsor of this research.



ارزیابی تکاملی هاپلوتایپ‌های ژنتیکی غالب ویروس SARS-CoV-2 در ایران در بازه زمانی خرداد تا آبان ۱۳۹۹

شیرین جلیلی^۱ PhD، هادی شیرزاد^۱ PhD، صادق صالحی^۱ MSc، پیمان تقی‌زاده^۱ MSc، رضا محمدی^۲ PhD

۱ مرکز تحقیقات علوم و فناوری‌های زیستی و سلامت در پلیس، معاونت بهداشت، امداد و درمان، فرماندهی انتظامی، تهران، ایران.
۲ مرکز تحقیقات علوم شناختی و رفتاری در پلیس، معاونت بهداشت، امداد و درمان، فرماندهی انتظامی، تهران، ایران.

چکیده

اهداف: مطالعات اولیه تغییرات نوکلئوتیدی درتوالی‌های ژنومی ویروس، منجر به شناسایی ۱۳ گروه هاپلوتایپی شده است. از بین این هاپلوتایپ‌ها موارد H1، H2 و H5 بیشترین فراوانی را در دنیا نشان داده‌اند. بنابراین تغییرات برجسته تک‌نوکلئوتیدی، در این هاپلوتایپ‌ها با استفاده از روش PCR در جمعیت ایرانی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های RNA این مطالعه مقطعی از افرادی که در بازه زمانی خرداد تا آبان سال ۱۳۹۹ به یکی از آزمایشگاه‌های تشخیصی ناجا در شهر تهران مراجعه کرده بودند و ابتلای آنها به COVID-19 به وسیله تست PCR تأیید شده بود، گرفته شد. ۳۰۰ نمونه به روش تصادفی انتخاب شدند. به منظور شناسایی و تعیین فراوانی تغییرات برجسته تک‌نوکلئوتیدی موجود در هاپلوتایپ‌های H1، H2 و H5 تمام نمونه‌ها با استفاده از رویکرد ARMS-PCR ارزیابی شدند. جهت کسب اطمینان از صحت نتایج ARMS-PCR تعدادی از نمونه‌ها به روش Sanger، توالی‌یابی شدند.

یافته‌ها: تعیین ژنوتیپ نمونه‌های ژنومی نشان داد، ۱۲۲ نمونه دارای جهش شاخص گروه هاپلوتایپی H5 (28688T>C) و ۱۵۸ نمونه دارای جهش شاخص گروه هاپلوتایپی H1 (14408C>T) بودند. همچنین مشاهده شد که ۱۱ نمونه همزمان با دو هاپلوتایپ ویروسی متفاوت آلوده شده بودند. به علاوه در نمونه‌های مورد بررسی گروه هاپلوتایپی H2 مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: ارزیابی‌ها حکایت از آن دارد که جمعیت غالب ویروس‌های آلوده‌کننده افراد ایرانی در اوایل همه‌گیری دارای هاپلوتایپ H5 بودند. به دنبال گسترش قابل توجه گروه هاپلوتایپی H1 در سطح جهان و با گذشت زمان، این گروه به عنوان هاپلوتایپ غالب جایگزین H5 گردید. توالی‌های از نوع H1 واجد تغییرات مهمی در دو ژن RdRp و S بودند که به ترتیب در تکثیر ژنوم ویروس و اتصال به سلول میزبان نقش داشتند.

کلیدواژه‌ها: SARS-CoV-2، کووید-۱۹، جهش‌های کرونا ویروس، هاپلوتایپ، تغییرات تک‌نوکلئوتیدی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۴
پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳
چاپ: ۱۴۰۰/۱۲/۲۵

نویسنده مسئول:

آدرس پستی: تهران، خیابان ولیعصر (عج)، پژوهشگاه علوم
انتظامی و مطالعات اجتماعی ناجا، تهران، ایران.
کدپستی: ۶۵۱۶-۱۹۳۹۵
تلفن: ۰۲۱۸۱۲۳۵۴۸۱
پست الکترونیک: Jalili.shirin@yahoo.com

نحوه استناد به این مقاله:

Jalili S, Shirzad H, Salehi S, Taghizadeh P,
Mohamadi R. Evolutionary Evaluation of the
Dominant Genetic Haplotype of SARS-CoV-2 Virus
in Iran from June to November 2020. J Police Med.
2022;11(1):e14

مقدمه

در دسامبر سال ۲۰۱۹ تعدادی از افراد در شهر ووهان در استان هیوبی چین مبتلا به ذات‌الریه ویروسی، با علت نامعلوم شدند. پیش از شناسایی ویروس عامل بیماری سارس، تصور بر این بود که اعضای خانواده کروناویروس موجب بیماری‌زایی در انسان نمی‌شوند؛ اما در سال ۲۰۰۲ با شیوع بیماری سارس و ابتلای بیش از ۸۰۰۰ نفر و مرگ بیش از ۱۰٪ مبتلایان، محققان پی بردند که کروناویروس‌ها می‌توانند سبب ایجاد بیماری‌های شدیدی برای انسان شوند [۱]. در سال ۲۰۱۲ نیز بیماری جدیدی به نام مرس از این خانواده جهان را تحت تأثیر قرار داد و حدود ۲۵۰۰ نفر را مبتلا و باعث مرگ حدود ۳۵٪ از مبتلایان گردید [۲]. در سال ۲۰۱۹ ویروس جدیدی از خانواده کروناویروس‌ها جهان را با یک همه‌گیری جدید مواجه کرد که ژنوم آن حدود ۸۰٪ تشابه نوکلئوتیدی را با سندرم حاد تنفسی (SARS-CoV) نشان می‌داد [۳، ۴]. SARS-CoV-2 هفتمین کروناویروس شناخته‌شده است که می‌تواند انسان را آلوده کند [۵-۷]. از جمله علایم ناشی از این بیماری می‌توان به بدن درد، تب و سرفه خشک و علائم گوارشی اشاره داشت که در نهایت می‌تواند منجر به مرگ فرد بیمار شود. علاوه بر آن، قدرت انتقال بالای فرد به فرد SARS-CoV-2 موجب افزایش بی‌شمار تعداد مبتلایان شده و خصوصیات منحصر به فرد این ویروس باعث شده که کنترل ابتلای مردم و همچنین درمان آن بسیار دشوارتر از سایر کروناویروس‌ها باشد [۸، ۹]. سازمان بهداشت جهانی، بیماری ناشی از این ویروس را COVID-19 نامید [۱۰، ۱۱].

اولین بررسی‌های توالی‌یابی ژنومی بر روی نمونه‌های استخراج‌شده از مایع مخاطی افراد مبتلا در ووهان چین مشخص کرد که این ویروس دارای ژنومی از جنس RNA تک‌رشته به طول حدود ۳۰ کیلوباز بوده و دارای حداقل ۱۱ منطقه ژنی رمزگردان پروتئین است. از مهم‌ترین این ژن‌ها می‌توان به ژن *orf1ab* اشاره داشت که پروتئین‌های زیادی از جمله RNA پلی‌مراز ویروسی را رمز می‌کند که در همانندسازی و رونوشت‌برداری از ژنوم ویروس نقش دارد. در پایین‌دست آن، ژن *S* قرار دارد که گلیکوپروتئینی شاخک حاصل از این ژن نقش بسیار مهمی را در اتصال ویروس به گیرنده‌های موجود روی سطح سلول‌های هدف و ورود ویروس به درون سلول ایفا می‌کنند [۱، ۱۲، ۱۳]. مطالعات اولیه روی توالی‌های ژنومی ویروس SARS-CoV-2 که توسط بسیاری از کشورهای جهان در پایگاه داده‌ای GISAID ثبت شده بود، منجر به شناسایی ۶۶ هاپلوتایپ و زیرهاپلوتایپ در ۱۳ گروه هاپلوتایپی H1-H13 شده است [۱۴، ۱۵]. این گروه‌های هاپلوتایپی به عنوان شایع‌ترین هاپلوتایپ‌های تغییر ژنومی در ویروس‌های انتشاریافته در مراحل اولیه پاندمی COVID-19 شناسایی و تعریف شده‌اند [۱۴، ۱۵]. هاپلوتایپ مجموعه‌ای از دو یا تعداد بیشتری تغییر ژنتیکی است که به طور هم‌زمان انتقال می‌یابند. بنابراین دنبال‌کردن فقط یکی از تغییرات موجود در هر هاپلوتایپ، می‌تواند به شناسایی آن هاپلوتایپ منجر شود؛ بدون آن که نیازی به توالی‌یابی سایر بخش‌های ژنومی باشد. به این تغییرات که نقش مارکر را ایفا می‌کنند، برجسب تغییرات

تک‌نوکلئوتیدی یا Tag (Single Nucleotide Variant) SNV گفته می‌شود [۱۸-۱۶].

با توجه به داده‌های حاصل از مطالعات دکترالهی و همکاران بر تعدادی از توالی‌های ثبت‌شده از سایر کشورهای جهان در پایگاه داده‌ای GISAID، مشخص شده است که از میان این هاپلوتایپ‌ها، سه هاپلوتایپ (H1، H2، H5) بیش‌ترین فراوانی را نسبت به سایر هاپلوتایپ‌ها در مراحل اولیه همه‌گیری COVID-19 از خود نشان می‌دهند که به ترتیب H1 با چهار جهش در موقعیت‌های >T241C، >T3037C، >T14408C و >G23403A و هاپلوتایپ H2 با دو جهش در موقعیت‌های >T8782C و >C28144T و هاپلوتایپ H5 با سه جهش در موقعیت‌های >A1397G، >C28688T و >T29742G تعریف می‌شوند [۱۴]. بنابراین با توجه به الگوی تغییرات و فراوانی آنها در جهان لازم دانستیم که تغییرات موجود در این هاپلوتایپ‌ها در جمعیت ایرانی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی تکاملی هاپلوتایپ‌های ژنتیکی غالب ویروس SARS-CoV-2 در ایران در بازه زمانی خرداد تا آبان‌ماه سال ۱۳۹۹ بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های RNA این مطالعه مقطعی، از افرادی که در بازه زمانی خرداد تا آبان سال ۱۳۹۹ به یکی از آزمایشگاه‌های تشخیصی ناجا در شهر تهران مراجعه کرده بودند و ابتلای آنها به COVID-19 به وسیله تست PCR تأیید شده بود، گرفته شد. حجم نمونه مورد مطالعه با توجه به فرمول کوکران و با لحاظ کردن سطح اطمینان ۹۵٪ و با در نظر گرفتن خطای ۰.۰۰۱، ۲۷۱ نفر به دست آمد که با در نظر گرفتن ده درصد ریزش، حجم نمونه نهایی ۳۰۰ نفر برآورد شد. نمونه‌گیری به صورت کاملاً تصادفی و صرف نظر از سن، جنس یا شدت بروز بیماری در افراد آلوده انجام شد. شهر تهران به علت داشتن موقعیت خاص هم از لحاظ تردد و هم از لحاظ بافت جمعیتی که شامل انواع مختلفی از قومیت‌ها و به نوعی نمود کوچک از جمعیت ایران است، انتخاب شد. در انتخاب نمونه‌ها نیز سعی بر این بود که افراد با نسبت خویشاوندی که احتمال مبتلا شدن به یک نوع ویروس را دارا بودند، انتخاب نشود. نحوه ورود نمونه‌ها به مطالعه به این صورت بود که ابتدا می‌بایست تست PCR افراد مثبت باشد و همچنین CT (Cycle threshold) این نمونه‌ها بین ۱۴ تا ۲۴ باشد. زیرا اگر CT پایین‌تر از ۱۴ باشد ممکن است به خاطر حجم بالای ویروس در آزمایش خطا ایجاد شود. به علاوه اگر CT بالاتر از ۲۴ باشد ممکن است به خاطر حجم پایین ویروس آزمایش انجام نشود.

هر نمونه RNA، به عنوان الگو برای انجام واکنش سنتز cdNA با استفاده از مسترمیکس سنتز cdNA (BIOFACT، کره؛ Cat no: BR441-096) مورد استفاده قرار گرفت. در انجام این واکنش‌ها از هر سه آغازگر معکوس PCR، مربوط به هر یک از سه جهش استفاده شد. پس از سنتز cdNA از نمونه‌های RNA، جهت تعیین ژنوتیپ نوکلئوتیدی واقع در موقعیت‌های ژنومی >T14408C در هاپلوتایپ H1 و

ژنومی هدف، به گونه‌ای طراحی شدند که تکثیر قطعه تکثیرشده مربوط به ناحیه فاقد جهش فقط در حضور آغازگر مخصوص توالی تغییرنیافته پیش رود و تکثیر قطعه مربوط به ناحیه دارای جهش فقط در حضور آغازگر مخصوص توالی جهش‌یافته انجام شود (جدول ۱).

در 8782C>T در هاپلوتایپ H2 و جهش 28688T>C در هاپلوتایپ H5 از تکنیک ARMS-PCR استفاده گردید. برای واکنش ARMS-PCR مربوط به جهش‌های 14408C>T و 8782C>T و 28688T>C، شش جفت آغازگر با استفاده از نرم‌افزار Gene runner v6.5.52Beta جهت تکثیر مناطق

جدول ۱) لیست آغازگرهای به‌کار رفته در این پژوهش

شماره	نام آغازگر	آغازگر توالی	Tag SNV	هاپلوتایپ	نام محصول	طول قطعه
۱	H1-14408C>T-out-rv	TAGATTACCAAGAAGCAGCGTG	14408C>T	H1	ARMS-Mutant	۲۱۶
۲	H1-14408C>T-mut.in-fw	TTTATTCTCTACAGTGTCCAACT	14408C>T	H1	ARMS-Normal	۴۷۰
۳	H1-14408C>T-out-fw	TATACGCCAACTTAGTGAAACG	14408C>T	H1	ARMS-Mutant	۲۴۰
۴	H1-14408C>T-wt.in-rv	CACTAGTGGTCCAAAACCTTTTAG	14408C>T	H1	ARMS-Normal	۴۶۲
۵	H2-28144T>C-out-fw	CTGTAGCTGCATTTCACCAAG	8782C>T	H2	ARMS-Mutant	۲۴۰
۶	H2-28144T>C-mut.in-rv	CCTGGCAATTAATTGTA AAAAGTTG	8782C>T	H2	ARMS-Normal	۴۶۲
۷	H2-28144T>C-wt.in-fw	GGTAATTATACAGTTCTCTGGTT	8782C>T	H2	ARMS-Mutant	۲۱۴
۸	H2-28144T>C-out-rv	GATCTTTCATTTTACCGTCACCA	8782C>T	H2	ARMS-Normal	۴۹۳
۹	H5-28688T>C-out-fw	ACACCAATAGCAGTCCAGATG	28688T>C	H5	ARMS-Mutant	۲۱۴
۱۰	H5-28688T>C-mut.in-rv	ATGTGATCTTTTGGTGTATGCAG	28688T>C	H5	ARMS-Normal	۴۹۳
۱۱	H5-28688T>C-out-rv	AGTTCCTGTCTGATTAGTTCTCT	28688T>C	H5	ARMS-Mutant	۴۹۳
۱۲	H5-28688T>C-wt.in-fw	GGTTGCAACTGAGGGGAGACT	28688T>C	H5	ARMS-Normal	۴۹۳

منظور بررسی صحت نتایج تعیین ژنوتیپ موقعیت‌های ژنومی هدف، قطعات ژنومی ۲۰ نمونه به روش توالی‌یابی Sanger، توالی‌یابی شدند. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Sequencher.V5.4.6 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. توالی ژنوم جداشده (NC_045512.2) Wuhan-Hu-1 با استفاده از بانک اطلاعات داده‌ای NCBI نیز به عنوان توالی مرجع SARS-CoV-2 استفاده شد.

ملاحظات اخلاقی: این طرح در شورا پژوهشی معاونت بهداشت ناجا در تاریخ ۱۳۹۹/۰۷/۲ با کد ش/۹۹۰۷۰۶/۳۳/۰۳ تصویب شد و تمامی ملاحظات اخلاقی رعایت گردید.

یافته‌ها

از ۳۰۰ مورد ماده ژنومی استخراج‌شده از بیماران، در مجموع ۲۹۱ نمونه RNA معتبر جمع‌آوری گردید که پراکندگی نمونه‌های دریافتی طی ماه‌های مختلف ثبت شد (جدول ۲). سن افراد مورد مطالعه بین ۱۷ تا ۶۶ سال گزارش شد که هم شامل نمونه‌های مرد و هم نمونه‌های زن بودند.

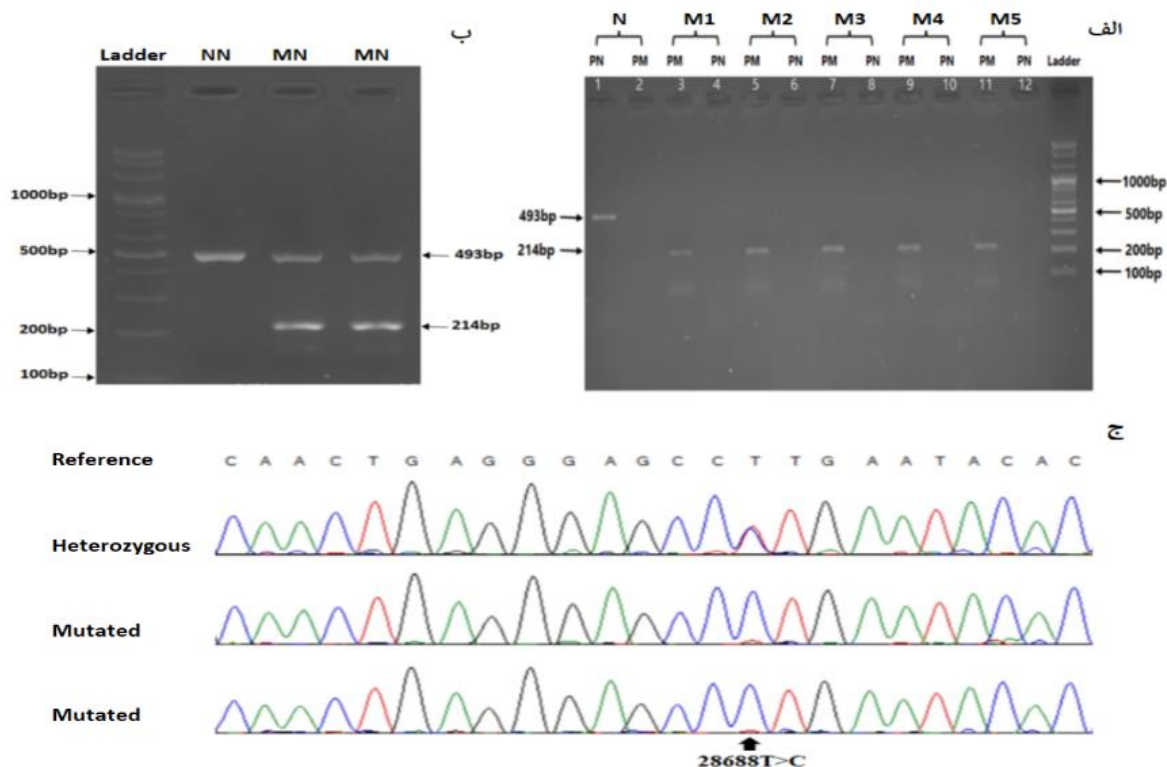
بنابراین برای هر نمونه cDNA سنتز شده دو سری واکنش PCR با استفاده از مسترمیکس PCR (2X Master Mix Red::ampliqon) (MgCl₂: 15mM) و آغازگرهای مربوط هر تغییر انجام شد. واکنش اول با آغازگرهای مربوط به ناحیه فاقد جهش و واکنش دوم با آغازگرهای مربوط به ناحیه دارای جهش صورت گرفت. در هاپلوتایپ H1 طول قطعه تکثیرشده مربوط به ناحیه دارای جهش، ۲۱۶ جفت باز و طول قطعه تکثیرشده مربوط به ناحیه بدون جهش، ۴۷۰ جفت باز بود. بنابراین در الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های دارای جهش و فاقد جهش بر روی ژل آگارز به ترتیب باند ۲۱۶ و ۴۷۰ جفت بازی مشاهده گردید. همچنین در تغییر مورد بررسی در هاپلوتایپ H2 باند دارای جهش قطعه‌ای به طول ۲۴۰ جفت باز و در نمونه نرمال فاقد جهش قطعه‌ای به طول ۴۶۲ جفت باز سنتز می‌شود. در هاپلوتایپ H5 نیز طول قطعه تکثیرشده برای مناطق دارای جهش و فاقد جهش به ترتیب ۲۱۴ و ۴۹۳ جفت باز بود که در نتیجه با الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز باند ۲۱۴ جفت بازی و باند ۴۹۳ جفت بازی مشاهده گردید. سپس به

جدول ۲) جمعیت نمونه‌های دریافت‌شده طی بازه زمانی خرداد-آبان و فراوانی هاپلوتایپ‌های H1 و H5

تاریخ دریافت نمونه (ماه)	تعداد نمونه دریافتی	تعداد نمونه پاسخ H5 داده	تعداد نمونه پاسخ H1 داده	تعداد نمونه آلوده با دو ویروس	H5 (درصد)	H1 (درصد)	تعداد نمونه آلوده با دو ویروس (درصد)
خرداد	۴۷	۳۸	۹	۰	۸۰	۲۰	۰
تیر	۴۹	۳۵	۱۳	۱	۷۱	۲۷	۲
مرداد	۵۰	۲۶	۲۱	۳	۵۲	۴۲	۶
شهریور	۵۰	۱۷	۳۱	۲	۳۲	۶۲	۴
مهر	۴۷	۵	۳۹	۳	۱۰	۸۳	۷
آبان	۴۸	۱	۴۵	۲	۲	۹۴	۴
مجموع	۲۹۱	۱۲۲	۱۵۸	۱۱	۴۲	۵۴	۴

ج). همچنین فراوانی حاملین به تفکیک ماه‌های جمع‌آوری نمونه نیز با یکدیگر مقایسه شد که نتایج نشان داد، در ماه‌های اولیه بازه زمانی مورد بررسی (خرداد ماه) گروه هاپلوتایپی H5 اولین گروهی بود که پس از همه‌گیری COVID-19 در جمعیت بیماران ایرانی مشاهده شد اما به تدریج با توجه به پویابودن ژنوم ویروس و ایجاد تغییرات جدید در ژنوم، هاپلوتایپ H1 غالب گردید؛ به طوری که در ماه‌های انتهایی بازه انتخاب‌شده (آبان ماه)، در نمونه‌های مورد بررسی ما هاپلوتایپ H1 به فراوانی نزدیک به ۱۰۰ درصدی رسید (شکل ۳).

پس از سنتز cDNA و انجام واکنش‌های ARMS-PCR و الکتروفورز محصولات به‌دست‌آمده، مشاهده شد که در کل ۱۲۲ نمونه دارای جهش 28688T>C مربوط به هاپلوتایپ H5 بودند که به ترتیب در ماه‌های خرداد تا آبان (۳۸-۳۵-۲۶-۱۷-۵) نمونه مشاهده شد و ۱۵۸ نمونه دارای جهش 14408C>T مربوط به هاپلوتایپ H1 بودند که پراکنش نمونه‌ها طی ماه‌های خرداد تا آبان به ترتیب (۹-۱۳-۲۱-۳۱-۳۹ و ۴۵) بود (جدول ۲؛ شکل ۱ و ۲ الف). در نتیجه ترتیب فراوانی ۴۲ و ۵۴ درصدی را از خود نشان دادند. نتایج حاصل از توالی‌یابی Sanger نیز این نتایج را نیز تأیید کرد (شکل ۱ و ۲

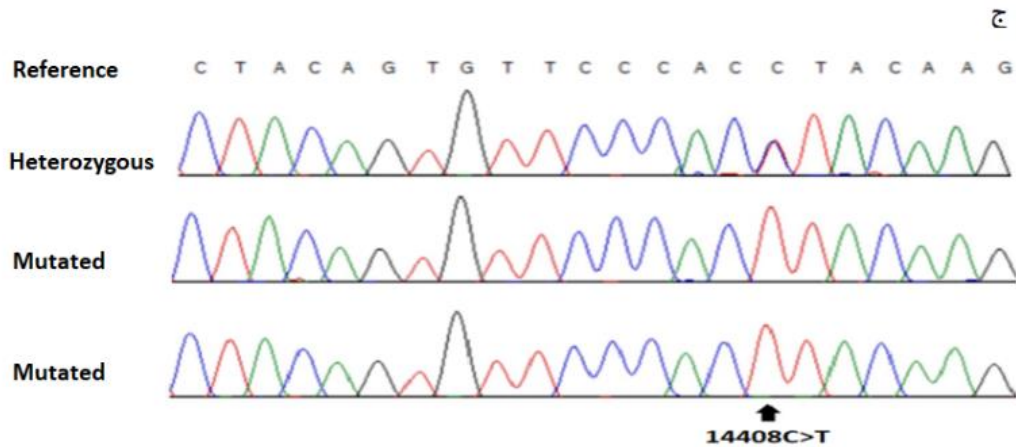
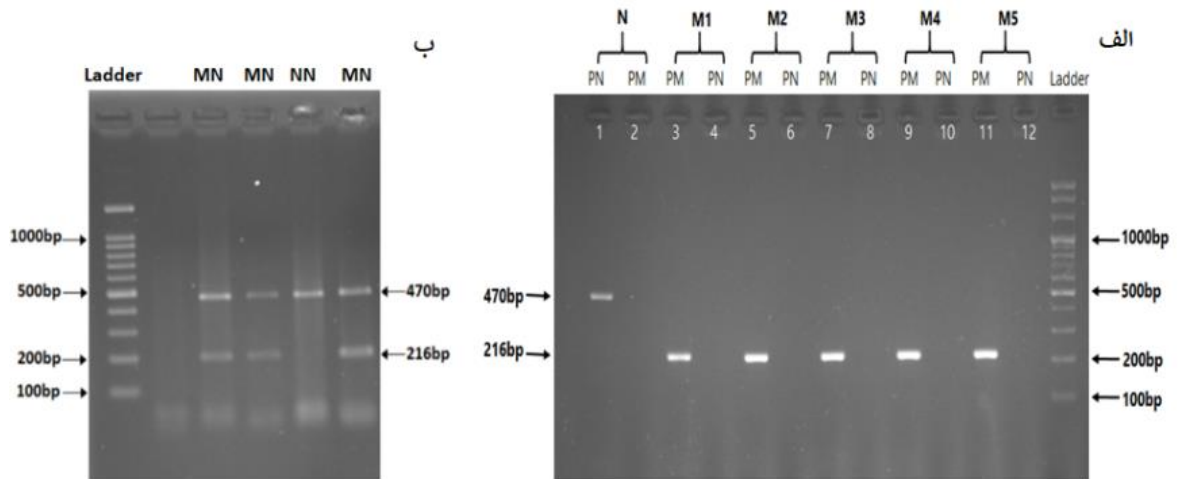


شکل ۱) جهش 28688T>C موجود در هاپلوتایپ H5: الف) الگوی الکتروفورزی از محصولات PCR با پروتکل ARMS-PCR است که برای هر نمونه دو الگو ارائه شده است. یک الگو نشان‌دهنده محصولات به‌دست‌آمده با آغازگرهای مربوط به ناحیه فاقد جهش است و قطعه ۴۹۳ جفت بازی را تکثیر می‌کند (PN). دیگری نشان‌دهنده محصولات به‌دست‌آمده با آغازگرهای مربوط به ناحیه دارای جهش است که قطعه ۲۱۴ جفت بازی را تکثیر می‌کند (PM). چاهک شماره ۱ و ۲ مربوط به یک نمونه نرمال (N) است که فقط قطعه ۴۹۳ جفت بازی مشاهده شد. چاهک‌های ۳-۱۲ مربوط به ۵ نمونه دارای جهش (M1-M5) هستند که در همه آنها فقط قطعه ۲۱۴ جفت بازی تکثیر شده است. ب) الگوی ژل الکتروفورز دو نمونه هتروزیگوت (MN) است که هر دو قطعه ۲۱۴ و ۴۹۳ جفت بازی مشاهده گردید که نشان می‌دهد فرد آلوده با دو ویروس متفاوت آلوده شده است و همچنین یک نمونه نرمال فاقد جهش (NN) به عنوان کنترل که فقط قطعه ۴۹۳ جفت بازی دیده شد. ج) کروماتوگرام دو نمونه دارای جهش 28688C>T و یک نمونه هتروزیگوت. نقطه جهش مورد نظر با فلش مشخص شده است.

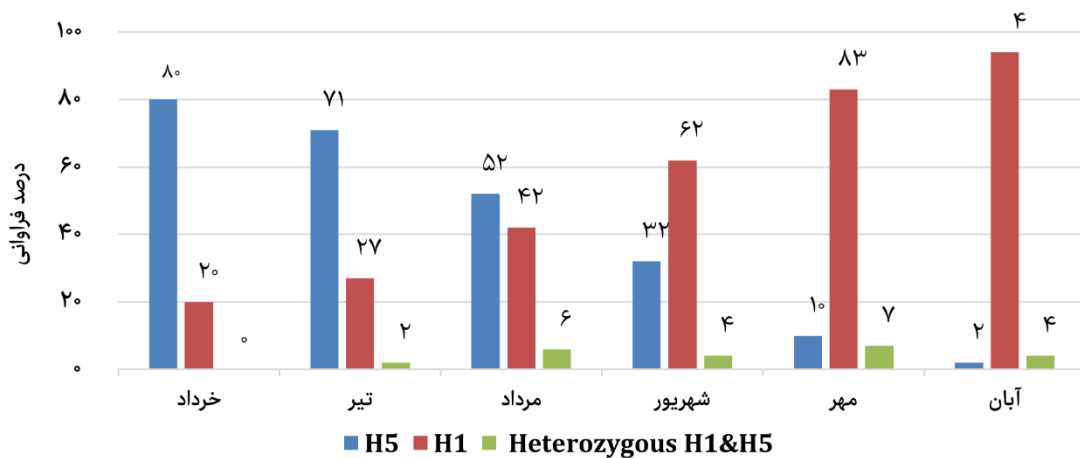
۲ ب). هاپلوتایپ H2 نیز به عنوان اولین گروهی بود که در مدت زمان بسیار کوتاهی در اوایل اپیدمی COVID-19 در منطقه شرق آسیا از جمله کشور چین ظاهر گردید که به طبع آن با توجه به نزدیک بودن زمان ورود ویروس کرونا به کشور و بررسی گروه‌های هاپلوتایپی در این تحقیق، این گروه هاپلوتایپ هم مورد سنجش قرار گرفت که این گروه در هیچ‌یک از توالی‌ها دیده نشد و در نتیجه پیش‌بینی شد با احتمال بسیار بالایی گروه هاپلوتایپ H2 از جمعیت ویروسی حذف شده است. بنابراین در این پروژه هیچ هاپلوتایپی از H2 مشاهده نشد. نتایج این

ضمن بررسی نمونه‌ها در بازه شش‌ماهه به ترتیب از خرداد تا آبان تعداد ۱۱ نمونه (۰-۱-۲-۳-۲-۳) با دو نوکلئوتید در یک جایگاه نیز مشاهده گردید، به این معنی که فرد آلوده با دو ویروس دارای هاپلوتایپ‌های ژنتیکی متفاوت آلوده شده بود. در ابتدای بازه مورد بررسی، زمانی که تنها هاپلوتایپ H5 به عنوان هاپلوتایپ غالب وجود داشت، هیچ نمونه‌ای با دو نوکلئوتید متفاوت در یک جایگاه مشاهده نشد اما با گذشت زمان و در فاصله زمانی که هر دو هاپلوتایپ ویروسی H1 و H5 در جمعیت دیده شد، تعداد ۱۱ نمونه آلوده مشاهده گردید که با هردو هاپلوتایپ ویروسی H1 و H5 آلوده شده بودند (شکل ۱ و

پژوهش نیز مشخص نمود که تمام ۲۹۱ نمونه‌ای که PCR آنها انجام شد، در دو گروه هاپلوتایپ H1 و H5 قرار داشتند.



شکل ۲ جهش 14408C>T موجود در هاپلوتایپ H1: الف) الگوی الکتروفورزی از محصولات PCR با پروتکل ARMS-PCR است، برای هر نمونه دو الگو ارائه شده است. یک الگو نشان‌دهنده محصولات به‌دست‌آمده با آغازگرهای مربوط به ناحیه فاقد جهش است و آمپلیکون تکثیرشده حاصل از آن به طول ۴۷۰ جفت باز است (PN). دیگری نشان‌دهنده محصولات به‌دست‌آمده با آغازگرهای مربوط به ناحیه دارای جهش است که قطعه‌ای به طول ۲۱۶ جفت باز را تکثیر می‌کند (PM). چاهک شماره ۱ و ۲ مربوط به یک نمونه نرمال (N) است که فقط آمپلیکون مربوط به ناحیه فاقد جهش به طول ۴۷۰ جفت باز مشاهده شد. چاهک‌های ۱۲-۳ مربوط به ۵ نمونه دارای جهش (M1-M5) هستند که در همه آنها فقط قطعه ۲۱۶ جفت بازی مربوط به ناحیه دارای جهش تکثیر شده است. ب) الگوی ژل الکتروفورز سه نمونه هتروزیگوت (MN) است که هر دو قطعه ۲۱۶ و ۴۷۰ جفت بازی مشاهده گردید که نشان می‌دهد فرد آلوده، با دو ویروس متفاوت آلوده شده است و همچنین یک نمونه نرمال فاقد جهش (NN) به عنوان کنترل که فقط قطعه ۴۷۰ جفت بازی دیده شد. ج) کروماتوگرام دو نمونه دارای جهش 14408C>T و یک نمونه هتروزیگوت. نقطه جهش با فلش مشخص شده است.



شکل ۳ تغییرات درصد فراوانی هاپلوتایپ H5 و H1

بحث

هدف از این مطالعه ارزیابی تکاملی هاپلوتایپ‌های ژنتیکی غالب ویروس SARS-CoV-2 در ایران در بازه زمانی خرداد تا آبان سال ۱۳۹۹ بود. با گذشت ماه‌ها از آغاز انتشار گسترده ویروس در جهان، تنها تعداد بسیار کمی از توالی کامل ویروسی از ایران ثبت گردیده است. اگرچه شیوع این بیماری در ایران در اوایل فوریه همراه با ایتالیا و کره جنوبی آغاز شده است، اما هیچ توالی‌یابی ژنومی SARS-CoV-2 در ماه‌های اول همه‌گیری انجام نشد. اولین توالی ویروس از ایران در ۴ آوریل در (GISAID (EPI_ISL_424349) بارگذاری شده است. در همان مطالعه Eden و همکاران سه جهش اصلی G1397A، G29742T و T28688C را در ژنوم بیماران با سابقه سفر به ایران مشاهده کرده‌اند که یک نماینده گروه هاپلوتایپی متمایز از تنوع ویروسی خاص موجود در ایران در آن زمان را تشکیل می‌دهند [۱۹] و نشان دهنده اولین توالی در دسترس جمعیت ایران با سوش H5 است. تا ۲۳ اکتبر ۲۰۲۰، تنها هشت ژنوم کامل در GISAID موجود بود که برای ردیابی ویروس در کشور کافی نبود و در تنها مطالعه اپیدمیولوژیک شیوع در ایران، از توالی ژنومی مشخص شده از مسافران به ایران استفاده کرده‌اند. پس از مدتی نجم/بادی و همکاران در مطالعه خود ۵۰ نمونه از ژنوم ویروس موجود در ایران را توالی‌یابی کامل ژنومی انجام داده‌اند. نتایج حاصل از پژوهش نجم/بادی و همکاران نشان می‌دهد که ویروس‌های اولیه آلوده‌کننده جمعیت ایران در دو شاخه فیلوژنتیکی قرار دارد. شاخه B4 با جهش‌های شاخص (G1397A-T28688C-G29742T) که ۳۶ مورد از نمونه‌ها را شامل می‌شود و شاخه B1 با جهش‌های شاخص (-C241T، C3037T-C14408T-A23403G) که ۹ مورد از نمونه‌ها را دربر می‌گیرد. ۵ نمونه دیگر نیز کیفیت لازم را ندارند [۲۰].

با مقایسه نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه نجم/بادی و پژوهش حاضر، مشخص شد که شاخه B1 همان گروه هاپلوتایپی H5 و شاخه B4 نیز همان گروه هاپلوتایپی H1 بود. به همین منظور امید است یافته‌های این تحقیق در جهت ارزیابی وضعیت انتشار هاپلوتایپ‌های ژنتیکی در کشور مورد استفاده قرار گیرند. خوشبختانه، رویکردهای توالی‌یابی کامل ژنومی موجب شد که در مدت زمان بسیار کوتاهی تعداد بسیار زیادی از توالی‌های مربوط به ویروس‌های آلوده‌کننده افراد در کشورهای مختلف در اختیار محققان قرار گیرد [۲۱-۲۳]. رویکردهای تعیین ژنوتیپ در این مطالعه با توجه تشخیص سوش غالب جمعیت با تکنیک ساده و ارزان ARMS-PCR به جای تکنیک پرهزینه توالی‌یابی کل ژنوم ویروس به کاهش چشمگیر هزینه‌های تحقیقات منجر خواهند شد. به دنبال شیوع گسترده ویروس SARS-CoV-2، عامل بیماری COVID-19 در جهان و آمار نسبتاً بالای مرگ و میر ناشی از آن که در چند دهه اخیر بی‌سابقه بوده است، طراحی رویکردهای پیشگیرانه و مصونیت‌زای مطمئن به یکی از دغدغه‌های اساسی محققان این حوزه تبدیل شد. ناشناخته و نوپدید بودن این ویروس و بیماری مرتبط با آن به پیچیده‌تر شدن شرایط کمک نمود. نخستین گام برای مبارزه با این قبیل بیماری‌ها، کسب

شناخت و درک کافی از ساختار، نحوه عملکرد و بیماری‌زایی و به خصوص ویژگی‌های ژنتیکی (آرایش ژنی، تشابهات توالی ژنومی با سایر اعضای خانواده، نرخ و سرعت تغییرپذیری، تغییرات شایع) منشاء بیماری است [۲، ۱۶، ۲۱]. بر اساس دانش ما، قبل از این سابقه انجام طرحی مشابه با مطالعه حاضر در کشور ایران گزارش نشده است. با این حال در زمان آغاز این طرح تنها تعداد محدودی مطالعه مشابه، مبنی بر انتقال هم‌زمان تغییرات ژنتیکی در قالب هاپلوتایپ‌ها، در مجلات علمی منتشر شده بود. الگوی انتقال هم‌زمان تغییرات در هاپلوتایپ‌ها، منجر به شناسایی تغییرات تک‌نوکلئوتیدی برچسب (Tag SNV) در بسیاری از هاپلوتایپ‌ها گردید. امتیاز اصلی این تغییرات تک‌نوکلئوتیدی برچسب این است که بدون نیاز به انجام توالی‌یابی کامل ژنومی، می‌توان با نوع گروه هاپلوتایپی و یا زیرهاپلوتایپ‌های هر نمونه را با درصد اطمینان بسیار بالایی تعیین نمود [۱۴، ۱۵]. این امر، به خصوص در مورد کشورهایی که امکان دسترسی به رویکردهای توالی‌یابی پیشرفته را ندارند، در مطالعات همه‌گیرشناسی بسیار کارآمد عمل می‌کند.

در این پژوهش دو گروه هاپلوتایپی شایع H5 و H1، در بازه زمانی شش ماه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این مطالعه نشان داد که در اوایل ایجاد اپیدمی COVID-19، هاپلوتایپ H5 به عنوان هاپلوتایپ غالب در سوش‌های آلوده‌کننده جمعیت ایرانی شناسایی شد اما در زمان بسیار کوتاهی با توجه به پویا بودن ژنوم ویروس و ایجاد تغییرات جدید، هاپلوتایپ H1 توانست به گروه غالب تبدیل شود و به فراوانی نزدیک به ۱۰۰ درصد برسد. چهار تغییر سازنده گروه هاپلوتایپ H1 شامل >T,3037C>T,14408C>T,23403A>G و >T,241C>G بودند. دو تغییر واقع در موقعیت‌های ۱۴۴۰۸ و ۲۳۴۰۳ به ترتیب موجب بروز تغییرات اسیدآمینه‌ای در ژن‌های RdRp (رمزکننده RNA پلیمرز ویروسی) و S (رمزکننده پروتئین مهم spike) می‌شوند [۲۴]. این هاپلوتایپ در حال حاضر در اغلب نمونه‌های ویروسی در حال انتشار در سراسر جهان مشاهده می‌شود که این امر به احتمال فراوان می‌تواند به واسطه دو تغییر نوکلئوتیدی اشاره‌شده صورت گرفته باشد. ژن RdRp در ناحیه ORF3 قرار دارد و آنزیم RNA پلیمرز وابسته به RNA را رمز می‌کند که یکی از مهم‌ترین عوامل در تکثیر ژنوم ویروس است و ژن S که مهم‌ترین ژن در اتصال ویروس به سلول میزبان است [۲۵]. بنابراین می‌توان این جهش‌ها را این‌گونه تفسیر کرد که ویروس با توجه به شرایطی که در آن قرار دارد می‌تواند تغییراتی را در ژنوم خود اعمال کند تا سرعت تکثیر خود یا قدرت اتصال خود را از طریق تغییر در ساختار شاخک به گیرنده‌های سطح سلولی افزایش دهد.

بنابراین هاپلوتایپ‌ها علاوه بر ارائه اطلاعات تکاملی، اطلاعات ارزشمندی را در خصوص زمان و مکان احتمالی پیدایش سوش‌های مختلف ویروسی و الگوی پراکنش آنها در گذر زمان ارائه می‌کنند. یافته مهم این بررسی شناسایی تغییرات برچسب یا Tag است. به علت منحصر بودن تغییرات در هر هاپلوتایپ، می‌توان انتظار داشت که با تعیین ژنوتیپ نوکلئوتیدهای موجود در جایگاه برچسب، بتوان هاپلوتایپ سوش‌های متفاوت

سطح جهان و با گذشت زمان، این گروه به عنوان هاپلوتایپ غالب جایگزین H5 گردید. توالی‌های از نوع H1 واجد تغییرات مهمی در دو ژن RdRp و S هستند که به ترتیب در تکثیر ژنوم ویروس و اتصال به سلول میزبان نقش دارند.

نکات بالینی و کاربردی در طب انتظامی: با توجه به درگیری همه آحاد جامعه با ویروس کرونا و توانایی‌های موجود در معاونت بهداشت فرماندهی انتظامی برآن شدیم که به سهم خود در شناسایی سوش غالب جمعیت در بازه مورد نظر با هزینه بسیار کمتر از توالی یابی کامل ژنومی قدمی برداشته شود که در سایر مطالعات اپیدمیولوژی به ویژه در جامعه پلیس استفاده شود.

تشکر و قدردانی: از کادر درمان بیمارستان نیروی انتظامی به ویژه آزمایشگاه ژنتیک، بیماران مورد مطالعه در پروژه و سایر اساتیدی و افرادی که در انجام این پروژه یاری‌رسان ما بودند تشکر می‌کنیم.

تعارض منافع: بدین‌وسیله نویسندگان مقاله تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تعارض منافی در قبال مطالعه حاضر وجود ندارد. **سهم نویسندگان:** شیرین جلیلی، طراحی مطالعه؛ هادی شیرزاد، ارائه ایده؛ صادق صالحی، جمع‌آوری داده و تجزیه و تحلیل داده‌ها؛ پیمان تقی‌زاده، جمع‌آوری داده و تجزیه و تحلیل داده‌ها؛ رضا محمدی، ارائه ایده؛ همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله و بازنگری آن سهیم بودند و با تأیید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

منابع مالی: معاونت بهداشت ناجا حامی مالی این پژوهش بود.

را با درصد اطمینان بالایی پیش‌بینی نمود. همچنین با توجه به هزینه‌های گزاف مربوط به توالی‌یابی کل ژنوم و محدودیت دسترسی به ابزارهای توالی‌یابی نسل جدید، رویکرد غربال نوکلئوتیدهای برجسب که نسبتاً آسان و کم هزینه است، می‌تواند گزینه پرکاربرد و ارزشمندی باشد و همچنین تعداد بیشتری نمونه را غربالگری نمود. باید توجه کرد که روش ARMS با توجه به حساسیت دمایی نیاز به دقت فراوان در راه‌اندازی و کسب نتیجه صحیح دارد شو برای تأیید عملکرد صحیح روش می‌بایست به تصادف با روش توالی‌یابی کنترل گردد که این مورد از محدودیت‌های این مطالعه بود. بدون شک در اختیار داشتن اطلاعات مربوط به جمعیت ویروسی غالب آلوده‌کننده هر منطقه می‌تواند در شناسایی مبدأ ویروس یا منبع احتمالی آلودگی و به ویژه طراحی واکسن‌های اختصاصی و مؤثر برای پیشگیری از ابتلای افراد آن منطقه خاص بسیار کارآمد باشد. بنابراین مزیت اصلی این روش‌ها، نه تنها به تشخیص سریع ابتلا یا عدم ابتلای افراد مشکوک کمک می‌نمایند، بلکه در صورت آلوده بودن فرد به ویروس، هاپلوتایپ یا اثر انگشت ویروس آلوده‌کننده آن فرد را با درصد اطمینان بالایی مشخص خواهد کرد. در نتیجه با توجه به تغییرات مکرر ژنوم ویروس و امکان ایجاد هاپلوتایپ‌های جدید با اثرات فنوتیپی مختلف پیشنهاد می‌شود تا اتمام کامل بیماری تغییرات به تناوب مورد بررسی واقع شوند.

نتیجه‌گیری

ارزیابی‌ها حکایت از آن دارد که جمعیت غالب ویروس‌های آلوده‌کننده افراد ایرانی در اوایل همه‌گیری دارای هاپلوتایپ H5 بودند. به دنبال گسترش قابل توجه گروه هاپلوتایپی H1 در

References

- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727-33. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>
- Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021;19(3):141-54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* [Internet]. 2020;579(7798):270-3. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265-9. <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2008-3>
- De Wit E, Van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(8):523-34. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>
- Fung TS, Liu DX. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annu Rev Microbiol*. 2019;529-60. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759>
- Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(3):181-92. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708-20. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032
- Ramanathan K, Antognini D, Combes A, Paden M, Zakhary B, Ogino M, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395:497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed*. 2020;91(1):157-60. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i1.9397>
- WHO. Addressing Human Rights as Key to the COVID-19 Response. *World Heal Organ*. 2020:1-4. <https://www.who.int/publications-detail/addressing-human-rights-as-key-to-the-covid-19-response>
- Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S. The

- spike protein of SARS-CoV - A target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(3):226-36.
<https://www.nature.com/articles/nrmicro2090>
- 13- Li F. Structure, Function and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu Rev Virol.* 2016;3:237-61.
<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
- 14- Safari I, InanlooRahatloo K, Elahi E. World-wide tracking of major SARS-CoV-2 genome haplotypes in sequences of June 1 to November 15, 2020 and discovery of rapid expansion of a new haplotype. *J Med Virol.* 2021;93(5):3251-6.
<https://doi.org/10.1002/jmv.26802>
- 15- Safari I, InanlooRahatloo K, Elahi E. Evolution of SARS-CoV-2 genome from December 2019 to late March 2020: Emerged haplotypes and informative Tag nucleotide variations. *J Med Virol.* 2021;93(4):2010-20.
<https://doi.org/10.1002/jmv.26553>
- 16- Forster P, Forster L, Renfrew C, Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(17):9241-3.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2004999117>
- 17- Tang X, Wu C, Li X, Song Y, Yao X, Wu X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci Rev.* 2020;7(6):1012-23.
<https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>
- 18- Pachetti M, Marini B, Benedetti F, Giudici F, Mauro E, Storici P, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med.* 2020;18(1):1-9.
<https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>
- 19- Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Reports* [Internet]. 2020;19:100682.
<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100682>
- 20- Kames J, Holcomb DD, Kimchi O, DiCuccio M, Hamasaki-Katagiri N, Wang T, et al. Sequence analysis of SARS-CoV-2 genome reveals features important for vaccine design. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72533-2>
- 21- Djikeng A, Spiro D. Advancing full length genome sequencing for human RNA viral pathogens. *Future Virol.* 2009;4(1):47-53.
<https://dx.doi.org/10.2217%2F17460794.4.1.47>
- 22- Eden JS, Rockett R, Carter I, Rahman H, De Ligt J, Hadfield J, et al. An emergent clade of SARS-CoV-2 linked to returned travellers from Iran. *Virus Evol.* 2020;6(1):1-4.
<https://doi.org/10.1093/ve/veaa027>
- 23- Fattahi Z, Mohseni M, Jalalvand K, Aghakhani Moghadam F, Ghaziasadi A, Keshavarzi F, et al. SARS-CoV-2 outbreak in Iran: The dynamics of the epidemic and evidence on two independent introductions. *Transbound Emerg Dis.* 2021:1-12.
<https://doi.org/10.1111/tbed.14104>
- 24- Wang R, Chen J, Gao K, Hozumi Y, Yin C, Wei GW. Analysis of SARS-CoV-2 mutations in the United States suggests presence of four substrains and novel variants. *Commun Biol.* 2021;4(1):1-14.
<http://dx.doi.org/10.1038/s42003-021-01754-6>
- 25- Jiang Y, Yin W, Xu HE. RNA-dependent RNA polymerase: Structure, mechanism, and drug discovery for COVID-19. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;538:47-53.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.116>