Discussion

In Saudi Arabia, H1N1 infection was confirmed for the first time in June 2009 (http://www.alarabiya.net, 3June 2009). According to these circumstances, surveillance studies for A/H1N1 were initiated in selected parts of the country.

Our study revealed that the collected samples were influenza A positives while 10% of these samples were confirmed as subtype of H1N1. These cases were collected during the period of July 2009 till November 2010. The highest peak of influenza A positives was observed during the particular period of November 2009 and 2010 which was the start of Haj pilgrimage season in the country. This indicates the probability of starting endemic period because the large population's diversity arrived to the city of Makkah during that particular time.

Same results were also recorded before when they found that H1N1 virus was antigenically and genetically unrelated to human seasonal influenza viruses and genetically related to viruses known to circulate in swine (Malik Peiris, Leo and Guan, 2009).

Multiple sequence alignment of HA segment of Saudi H1N1 isolates recorded that all samples were homologous with each other. The 2010 isolates showed more homology to each other than the 2009 isolates. All Saudi isolates

showed approximately 10-14 % nucleotide sequence diversity with other selected viruses from other countries.

On the other hand NA sequence analysis showed very good homology among the samples collected from Saudi Arabia with other isolates from other countries. The Saudi Arabian isolates showed diversity ranged from 1-10% at nucleotide sequences level.

In the HA genes of influenza A H1N1/2009 strains showed highest homology ranged from 87.2 - 89.4 % to the HA gene of other virus isolates from selected regions. Like those of the worldwide influenza A H1N1/2009 strains, the NA genes were homologous to Singapore (JX309292) and Malaysian (CY118221) swine lineage, which clustered in a separate group.

According to the alignment and phylogenetic analyses for the HA gene sequences of the novel influenza A (H1N1) virus, the Saudi Arabian isolates divided into three clusters. The two clusters of 2010 isolates were clustered close to each others and were placed in lineage of New York, USA and Jakarta isolates. While the NA sequence and phylogenetic analyses of the Saudi isolates formed three separate clusters. These isolates formed closed cluster with Monagua, Chile, Helsinki. The isolates of the first wave of infection were clusterd in lineage of the isolates of Managua and Helsinki for the NA analyses while it were in lineage of Scotland at the HA analyses.

The results obtained in this study were in accordance with the findings suggested in the previous report where they found that for many decades, H1N1 influenza in North American swine (also called ‘‘classical’’ H1N1) mutated relatively slowly (Kingsford, Nagarajan and Salzberg, 2009), but in 1997, a novel reassortant emerged that contained three segments (HA, NA and PB1) from the

human H3N2 virus, and the remaining five from the classical North American H1N1. Soon thereafter, the first ‘‘triple reassortant’’ viruses were documented (Kingsford, Nagarajan and Salzberg, 2009), in which avian-derived PA and PB2 polymerase genes replaced two of the classical segments in the H3N2 reassortant. These triple reassortants rapidly spread through pig populations, and additional reassortments occurred, including one that created an H1N2 triple reassortant by re-combining the classical HA (H1) segment with an H3N2 triple reassortant. Until the current S-OIV outbreak, there were only a few sporadic cases of human infection by triple reassortant swine influenza A; the first case in the United States was reported to the Centers for Disease Control in December 2005, and only 11 cases were reported subsequently until February 2009 (Kingsford, Nagarajan and Salzberg, 2009).

In April 2009 CDC and Garten *et al*., identified an SOIV A(H1N1) containing a unique combination of gene segments from both North American and Eurasian swine lineages from human infections in Mexico and the U.S., the virus rapidly spread worldwide causing the first influenza pandemic of the 21st century (CDC, 2009; Garten *et al.*, 2009).

The finding that the isolates of the second wave of infection (2010) were clustered in lineage to Asian isolates may be attributed to touristic activities of some Saudis since the Asian regions are among the highly visited touristic sites during their travel.

Our phylogenetic analysis suggested two possibilities for the existence of genetic diversity. One is the introduction of newly infected persons from various countries during Hajj and Umrah seasons and tourism. And the other because of the presence of unidentified carriers from different countries led to the transmission of the virus, disease spread and the presence of genetic variations therein. However, an

important disease management strategies can be employed by monitoring the disease spread and severity occurs during winter and fall seasons and to observe if the usual seasonal flu viruses was reassorted with novel influenza A (H1N1) and which results in reassortant virus showed upgraded virulence with high transmission of the virus in Saudi population.

CHAPTER VI

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

Chapter VI

Conclusion and Recommendation

On the basis of results obtained and identification of the virus using primers specific for HA and NA segment and nucleotide sequence and phylogenetic tree analysis, it can be concluded that the virus circulating and causing disease in Saudi population could be a strain of H1N1 Singapore as it showed highest homology with nucleotide sequences of NA segment or it may be the strain from Jakarta as it showed highest homology at nucleotide level with HA segment.

Due to the lack of detailed surveillance system it is recommended to start intensive detailed sampling that may help to monitor the incidence and diversity of the influenza A virus particularly in the Hajj pilgrimage season.

REFERENCES

LIST OF REFERENCES

Alarabiya (2009). “Detection of the first case of "swine flu" in Saudi Arabia Filipina nurse.” Retrieved July 7, 2010, from http://www.alarabiya.net/articles/2009/06/03/74702.html

CDC (2009). 2008-2009 Influenza Season Week 26 ending July 4, 2009. Available at: http://www.cdc.gov/flu/weekly/ Retrieved 29/12/2009.

CDC (2009). Interim guidance for the detection of novel influenza A virus using rapid influenza diagnostic tests. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC,. Accessed November11, 2009, Available at http://www.cdc.gov/h1n1flu/ guidance/rapid_testing.htm. Retrieved 26/12/2009.

CDC (2009) Swine influenza A (H1N1) infection in two children—Southern California, March–April 2009. MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 58 (15), 400–402. Retrieved 20/11/2012.

Cinatl, J., Michaelis, M. & Doerr, H. (2007). The threat of avian influenza A (H5N1). Part I: Epidemiologic concerns and virulence determinants. Med. Microbiol. Immunol.,vol.196: 181–190.

Colman, P. (1998). Structure and function of the neuraminidase. In Textbook of Virology, Nicholson, K.G., Webster, R.G. & Hay, A.J., Oxford: Blackwell Science, 65–73.

Deng, T., Sharps, J., Fodor, E., & Brownlee, G (2005). In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex, J. Virol., vol. 79:8669-74.

Fraser, C., Donnelly, C., Cauchemez, S. Hanage, W. , Kerkhove, M., Hollingsworth, T., Griffin, J., Baggaley, R., Jenkins, H., Lyons, E., Jombart, T., Hinsley, W., Grassly, N., Balloux, F., Ghani, A., Ferguson, N., Rambaut, A., Pybus, O., Lopez-Gatell, H., Alpuche-Aranda, C., Chapela, I., Zavala, E., Guevara, D., Checchi, F., Garcia, E., Hugonnet, S. & Roth, C. (2009). Pandemic Potential of a Strain of Influenza A (H1N1): Early Findings, Science. vol. 324:1557-1561

Garten, R., Davis, C., Russell, C., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A ., Sessions, W., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C., Emery, S., Hillman, M., Rivailler, P., Smagala, J., Graaf, M., Burke, D., Fouchier, R., Pappas, C., Alpuche-Aranda, C., López-Gatell, H., Olivera, H., López, I., Myers, C., Faix,D., Blair, P., Yu, C., Keene, K., Dotson, P., Boxrud, D., Sambol, A., Abid, S., George, K., Bannerman, T., Moore, A., Stringer, D., Blevins, P., Demmler-Harrison, G., Ginsberg, M., Kriner, P., Waterman, S., Smole, S., Guevara, H., Belongia, E., Clark, P., Beatrice, S., Donis, R., Katz, J., Finelli, L., Bridges, C., Shaw, M., Jernigan, D., Uyeki, T., Smith, D., Klimov, A. & Cox, N. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans, Science, vol. 325: 197–201.

GenomeNet (1991) GenomeNet Database Resources Retrieved March 10, 2012, from http://www.genome.jp/tools/clustalw/

Ito, T., Couceiro, J., Kelm, S., Baum, L., Krauss, S., Castrucci, M., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, C., Webster, G. & Kawaoka, Y. (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential, J Virol., vol.72:7367–7373.

Karasin, A., Schutten, M., Cooper, L., Smith, B., Subbarao, K., Anderson, A., Carman, S. & Olsen, W. (2000). Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America–1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes, Virus Res., vol. 68: 71–85.

Kelly, M., Cook, J., Brown-Augsburger, P., Heinz, B., Smith, M. & Pinto, L. (2003). Demonstrating the intrinsic ion channel activity of virally encoded proteins. FEBS letters, vol. 552:61-7.

Kingsford, C., Nagarajan, N. & Salzberg, S. (2009). 2009 Swine-Origin Influenza A (H1N1) Resembles Previous Influenza Isolates. PLoS ONE. vol. 4 :e6402.

Kobasa, D., Jones, M., Shinya, K., Kash, C., Copps, J., Ebihara, H., Hatta, Y., Kim, H., Halfmann, P., Hatta, M., Feldmann, F., Alimonti, B., Fernando, L., Li, Y., Katze, G., Feldmann, H. & Kawaoka, Y. (2007). Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus, Nature, vol. 445:319–323.

Krauss, S., Walker, D., Pryor, S., Niles, L., Chenghong, L., Hinshaw, V. & Webster, R. (2004). Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America, Vector Borne Zoon. Dis., vol. 4: 177–189.

Lamb, R. & Krug, R. (1996). Orthomyxoviruses: The viruses and their replication. "Virology" , Knipe, B., Howley, D. & eds., Howley, P., Philadelphia. Lippincott-Raven, 1353-1395

Malik Peiris, J., Poon, Leo L. & Guan, Y. (2009) Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. J. of Clinical Virol., vol. 45: 169–173

Melzl, H., Wenzel, J., Kochanowski, B., Feierabend, K., Kreuzpaintner, B., Kreuzpaintner, E., Rohrhofer, A., Schreder-Meindl, S., Wollner, H., Salzberger, B., Reischl, U., Jilg, W., Wolf, H. & Niller, H. (2009). First sequence confirmed case of infection with the new influenza A (H1N1) strain in Germany, Euro. Surveill., vol. 14: 1-2.

Michaelis, M., Doerr, H. & Cinatl, J. (2009). Of chickens and men: avian influenza in humans, Curr. Mol. Med., vol. 9: 131–151.

Minosse, C., Selleri, M., Zaniratti, M., Lauria, F., Puro, V., Carletti, F., Cappiello, G., Gualano, G., Bevilacqua, N. & Capobianchi, M. (2007). Improved detection of human influenza A and B viruses in respiratory tract specimens by hemi-nested PCR, J. Virol. Meth., vol. 141: 225–228.

Morens, D., Taubenberger, J. & Fauci, A. (2008). Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness, J Infect Dis., vol. 198:962–970.

Nakajima, K., Desselberger, U. & Palese, P. (1978). Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. Nature, vol. 274:334–339.

NCBI (2010) Swine flu H1N1, Retrieved 3 January 2010 from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore?term=swine%20flu%20na

Neumann, G., Noda, T. & Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus, Nature, vol. 459:931-939

Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Investigation Team (2009). Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans, N Engl J Med., vol. 360: 2605-2615.

Paragas, J., Talon, J., O'Neill, R., Anderson, K., García-Sastre, A. & Palese, P. (2001). Influenza B and C virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities. J. Virol., 75: 7375–7383.

Petric, M., Comanor, L. & Petti, C. (2006). Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics, J. Infect. Dis., vol. 194: S98–S110.

Primer3 (2010). http://frodo.wi.mit.edu/primer3/. Retrieved 08/03/2011

Primer-BLAST (2010). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome . Retrieved 08/03/2011.

Rogers, G. & Paulson, J., (1983). Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin, Virol., vol. 127: 361–373.

Scholtissek, C. (1990). Pigs as the "mixing vessel" for the creation of new pandemic influenza A viruses, Med Principles Pract., vol. 2: 65–71.

Skehel, J., Daniels, R., Douglas, A., Wang, M., Knossow, M., Wilson, A. & Wiley, C. (1984). Studies on the haemagglutinin. In The Molecular Biology and Epidemiology of Influenza, Stuart-Harris, C.H. & Potter, C.W., Academic Press: 61–68.

Stuart-Harris, C., Schild, G. & Oxford, J. (1985). Orthomyxoviridae, Influenza: the viruses and the disease, London: Edward Arnold,. 22–40.

Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Miyamoto, D., Hidari, K., Guo, T., Kida, H., Webster, G., Chambers, T. & Kawaoka, Y. (2001) Sialyl sugar chains as receptors and determinants of host range of influenza A viruses. In Options for the Control of Influenza. Osterhaus, A., Cox, N. & Hampson, A., Excerpta Medica, vol. IV: 521–525.

Taubenberger, J., Reid, A., Krafft, A., Bijwaard, K. & Fanning, T. (1997). Initial genetic characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus, Science, vol. 275:1793–6.

Wagner, R., Matrosovich, M. & Klenk, H. (2002). Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections, Rev. Med. Virol., 12: 159–66.

Webby, R., Swenson, S., Krauss, S., Gerrish, J., Goyal, M. & Webster, G. (2002). Evolution of Swine H3N2 influenza viruses in the United States, J. Virol., vol. 74: 8243–8251.

Webster, R., Bean, W., Gorman, O., Chambers, T. & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses, Microbiol. Rev., vol. 56:152–179.

Zell, R., Motzke, S., Krumbholz, A., Wutzler, P., Herwig, V. & Dürrwald, R. (2008). Novel reassortant of swine influenza H1N2 virus in Germany, J. Gen Virol., vol. 89:271-276.

Zell, R., Bergmann, S., Krumbholz, A., Wutzler, P. & Dürrwald, R. (2008). Ongoing evolution of swine influenza viruses: a novel reassortant, Arch. Virol., vol. 153: 2085–2092.

Zhou, N., Senne, D., Landgraf, J., Swenson, S., Erickson, G., Rossow, K.., Liu, L., Yoon, K., Krauss, S. & Webster, R. G. (1999). Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs, J. Virol., vol. 73: 8851–8856.

Zuckerman, J., Banatvala, J., Pattison, P., &Schoub B. (2004). Influenza. Principles and Practice of Clinical Virology, Wiley, J. & Ltd, S., Fifth Edition: 271-298.

WHO (2009). Global Distribution of Reported Cumulative Laboratory Confirmed Cases of Swine Influenza A(H1N1) by Countries. Retrieved 10/01/2010.

Arabic Summary

الاختلافات الجينية لفيروسات أنفلونزا الخنازير (H1N1) المعزولة من المرضى المصابين في منطقة مكة المكرمة

نورة بنت عبد الحميد هائل عثمان

الملخص العربي

تنتمي فيروسات الأنفلونزا إلى عائلة Orthomyxoviridae، وهذه الفيروسات تحتوي على الحمض النووي RNA والذي يحتوي على ثمانية قطع سلبية. وهذه القطع الثمانية من فيروس الأنفلونزا تعبر عن عشرة بروتينات (ثمانية هيكلية واثنين غير هيكلية) والتي تشمل ثلاثة transcriptases (PA، PB2، PB1)، واثنين من البروتينات المصفوفة (M1 و M2)، واحدة من البروتين قفصية النواة (NP)، واثنين بروتينات غير هيكلية (NSP1 وNSP2)، واثنان من جلايكوبروتين الهيموقلوتينين، والنورامينيداز (HA، NA). وتوجد هذه البروتينات على سطح الفيروس، ويؤدي الاختلافات في هذه البروتينات إلى جيل من أنواع فرعية مختلفة من فيروسات الانفلونزا أ. واعتمادا على الاختلافات الجينية في الجينات HA و NA يتم تصنيفها إلى16 نوع فرعي من HA و 9 أنماط فرعية من NA .

ونظرا لطبيعة جينوم الأنفلونزا تجزئ هذه الفيروسات بحيث تكون لها القدرة على الخضوع والاندماج في حالة إصابة خلية واحدة في وقت واحد من أكثر من الفيروس، ويمكن لهذا الاندماج أن يحدث تغييرا هائلا في تطور فيروسات الأنفلونزا في مجموعة معينة.

تلعب الخنازير دورا هاما في النظام البيئي من فيروسات الأنفلونزا لأنها عرضة للفيروسات من الطيور والثدييات و الانسان.

في أبريل 2009 ظهرت سلالة جديدة من فيروس أنفلونزا A (H1N1) في المكسيك، الولايات المتحدة، والعديد من البلدان الأخرى أفادت منظمة الصحة العالمية . من بداية يونيو أن الفيروس انتشر في 66 دولة مع 19273 حالة تشخيص مؤكدة بينها 117 حالة وفاة. في الولايات ألمتحدة ابلغت مراكز السيطرة على الأمراض عن 11054 حاله منها 17 حالة وفاة.

تم التعرف على سلالة مشابهه لأنفلونزا الخنازير التي نتجت عن اندماج سلالتين الثلاثي الاختلاط إنفلونزا الخنازير التي تم تداولها في أمريكا الشمالية منذ عام 1998 وسلالة H1N1 التي تم تداولها على مدى عقود في مجتمع الخنازير في آسيا وأوروبا. السلالة الجديدة فيها ستة قطع من سلاله أمريكا الشمالية وجزئين من سلاله الأوروبية الآسيوية.

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تشخيص جزيئي وكشف تنوع فيروس أنفلونزا الخنازير في العزلات المختلفة من المرضى المصابين في منطقة مكة المكرمة.

وبدأ العمل بجمع عينات من وحدة الكائنات المعدية الخاصة بمركز الملك فهد للبحوث الطبية وعدد العينات كانت عشر عينات زهي عبارة عن مسحة من الانف والحنجرة. وتم زراعة الفيروس على خلايا MDCK.

وبعد عشرة ايام اخذت وعمل لها استخلاص للحمض النووي الرنا، وتم مسحها بواسطة الوقت الحقيقي لتفاعلات البلمرة التسلسلي لتشخيصها. وكانت النتيجة ايجابية ومن ثم تم مضاعفة للحمض النووي بالتفاعل العكسي لتفاعلات البلمرة التسلسلي RT-PCR. وبعد تنقيتها تم معرفه التسلسل النيكلوتيدي باستخدام BIG-dye terimntor من قبل المنظم ABI.

وأثبتت النتائج تماثل جيد على مستوى التسلسل النيكلوتيدي بين العينات المعزولة في المنطقة المختارة بنسبه (99%) لكلا القطعتين HA وNA .

سجلت التسلسل للمعزولات لجزء HA من السعودية أن جميع العينات كانت متشابهه مع بعضها البعض. أظهرت عزلات 2010 المزيد من التماثل مع بعضهم البعض بالمقارنة بعزلات لعام 2009. وأظهرت جميع العزلات السعودية اختلافات بنسبه ٪ 10-14 تقريبا مع غيرها من الفيروسات مختارة من بلدان أخرى.

من ناحية أخرى أظهر جزء NA من تحليل التسلسل تناظر مرتفع بين العينات التي تم جمعها من المملكة العربية السعودية مع العزلات من بلدان أخرى. ونسبة الاخلافات تراوحت بين ٪ 1 - 10 على مستوى تسلسل النوكليوتيدات.

وفقا لتحليلات النشوء والتطور والمحاذاة لتسلسل الجينات HA من إنفلونزا A فيروس (H1N1) ظهر ان العزلات السعودية انقسمت إلى ثلاث مجموعات. المجموعتين من عام 2010 قريبة من بعضها البعض ووضعت بالقرب من نسب نيويورك ونسب جاكرتا. و عزلات 2009 قريبة من سكوتلندا. في حين أن تسلسل النشوء والتطور لتحليل العزلات NA السعودية شكلت ثلاث مجموعات منفصلة. جميعها قريبة من منقوا، شيلي وهلسنكي.

ويمكن أن يعزى هذا الاكتشاف إلى أن تم تجميع هذه العزلات من الموجة الثانية من عدوى (2010) في النسب إلى آسيا للأنشطة السياحية لبعض السعوديين لمناطق آسيوية هي من ضمن المواقع السياحية كماليزيا وسنغافورة.

واقترح تحليلنا النشوء والتطور لفيروس انفلونزا الخنازير احتمالين لوجود التنوع الجيني. واحد هو إدخال الأشخاص المصابين حديثا من مختلف البلدان خلال مواسم الحج والعمرة والسياحة. والاحتمال الأخر بسبب وجود عمالة مجهولة الهوية من مختلف البلدان تسبب انتقال الفيروس وانتشار المرض باختلافات وراثية فيه.

إدارة المرض من خلال رصد الاستراتيجيات الهامة التي تحد من انتشار المرض الذي يحدث خلال فصل الشتاء ومواسم الخريف. ومن المستحسن أن نبدأ بأخذ العينات التي قد تساعد على رصد حالات وتنوع واختلافات الأنفلونزا الناجمة عن فيروس انفلونزا الخنازير وخاصة في موسم الحج.