

## تشخیص سریع ویروس آنفولانزای A(H1N1) با استفاده از روش‌های RT-PCR و تعیین توالی

فریده قاضی<sup>1\*</sup>، پریسا غفوری<sup>2</sup>، نوشین سهرابی<sup>3</sup>، مرتضی تقی‌زاده<sup>4</sup>، زهره عطایی کجویی<sup>5</sup>

1- استاد گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران

2- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، واحد تهران شرق، تهران

3- استادیار گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، واحد پردیس تهران شرق

4- استادیار بخش ویروس‌شناسی انستیتو رازی، حصارک کرج

5- کارشناسی ارشد گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران

\* تهران، صندوق پستی 14665-354

ghazi.f@iums.ac.ir

(دریافت مقاله: 95/8/25 پذیرش مقاله: 95/11/18)

**چکیده -** ویروس آنفولانزا تیپ A دارای ژنوم RNA با قطبیت منفی می‌باشد که از 8 رشته تشکیل شده است که برحسب نوع ویروس برای 12-14 پروتیین کد گذاری می‌کند. تغییرات ژنتیکی این ویروس باعث بروز اپیدمی‌های جدید در سرتاسر دنیا در بین انسان‌ها می‌شود. از این رو وجود یک روش دقیق و سریع به منظور تشخیص سویه‌های جدید ضروری می‌باشد. این مطالعه با هدف تشخیص سریع زیر تیپ‌های جدید ویروس آنفولانزای A با به کارگیری روش RT-PCR اختصاصی بر اساس ژن هم‌گلو تینین انجام شد. در این مطالعه 30 نمونه ترشحات دستگاه تنفسی بیماران مبتلا به آنفولانزا در تخم‌مرغ جنین‌دار کشت داده شد؛ سپس RNA استخراج، cDNA تهیه شده و واکنش PCR با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی طراحی شده از ژن هم‌گلو تینین انجام شد. محصول PCR، پس از تخلیص تعیین توالی گردید. مقایسه توالی نوکلئوتیدهای محصول PCR با توالی موجود در بانک ژنی نشان داد که توالی نمونه‌های مثبت جدا شده از بیماران با توالی سویه‌های جدید جدا شده در سال‌های اخیر شباهت بالایی دارند؛ در نتیجه RT-PCR استفاده شده در این مطالعه کاملاً اختصاصی بوده و قادر به تکثیر و تشخیص آنفولانزا A و زیر گروه‌های آن از نمونه‌های کلینیکی می‌باشد. نتایج این مطالعه تأیید می‌کند که PCR بر اساس ژن هم‌گلو تینین به همراه تعیین توالی یک روش حساس و اختصاصی برای تشخیص سریع ویروس آنفولانزای تیپ A و زیر تیپ‌های جدید آن مستقیماً از نمونه‌های کلینیکی می‌باشد که برای تهیه و تولید واکسن سودمند است.

کلید واژگان: هم‌گلو تینین، آنفولانزای A، RT-PCR.

## 1- مقدمه

خانواده ارتومیکسوویریده ویرونی‌های کروی چند شکلی، 80-120 نانومتر قطر دارند و دارای ژنوم تک‌رشته‌ای از جنس RNA قطعه قطعه با پلاریته منفی و پوشینه لیپیدی می‌باشند. ویروس‌های آنفولانزای A و B و C بر اساس تفاوت‌های آنتی‌ژنی پروتئین‌های ماتریکس (M) و نوکلئوپروتئین (NP) به سه تیپ طبقه‌بندی می‌شوند. تاکنون ویروس تیپ A بر اساس آنتی‌ژن‌های سطحی هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) به 17 زیر تیپ مختلف هماگلوتینین (H1 تا H17) و 10 زیر تیپ مختلف نورآمینیداز (N1 تا N10) تقسیم‌بندی شده است [1]. ویژگی برجسته این گروه، شایع بودن بازآرایی ژنتیکی است. ویروس‌های آنفولانزا باعث بیماری‌های همه‌گیر و عامل اساسی مرگ و میر در سراسر دنیا می‌باشند و سالانه جمعیت زیادی به این ویروس مبتلا می‌شوند. بعضی از این ویروس‌ها منجر به ایجاد پاندمی در میان جمعیت‌ها می‌شوند. همانند پاندمی H1N1 در سال 2009 [۲،۳]. وقوع پاندمی دیگری مشابه با این پاندمی در سال 1918 بوده، که 50 میلیون مرگ در سراسر دنیا به بار آورده است. در قرن بیستم سه مورد پاندمی آنفولانزا به وقوع پیوست که هر کدام با ظهور یک سویه ویروس انسانی ایجاد شد و ده‌ها میلیون انسان را به کام مرگ کشاند [۴،۵]. همه زیرتیپ‌های آنفولانزای A تا به حال از پرندگان جدا شده است اما زیرتیپ‌های H1N1، H2N2 و H3N2 به ترتیب در سال‌های 1918، 1957 و 1968 فقط از جوامع انسانی جدا شده‌اند [۶،۷]. ایجاد سوش‌های جدید از طریق موتاسیون و نوتریبی قطعات ژنی در بین سوش‌های مختلف انسانی و حیوانی زیرتیپ‌های متفاوت ویروس آنفولانزای A را ممکن می‌سازد [۸،۹]. اولین گزارش از شیوع ویروس آنفولانزای A در ایران در سال 2010 منتشر شده است که از بازآرایی ژنوم 3 نوع ویروس آنفولانزای انسانی، خوکی و پرندگان به وجود

آمده است و در حال حاضر به عنوان ویروس A/H1N1 پاندمیک شناخته می‌شود. با توجه به تغییرات آنتی ژنتیکی ویروس آنفولانزای A برای تشخیص سریع سویه‌های در حال گردش در این مطالعه از روش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای تهیه شده از ژن هماگلوتینین که نقش مهمی در عفونت زایی ویروس آنفولانزا A دارد و تعیین توالی محصول PCR برای تشخیص زیر تیپ‌های آن استفاده شد که در تهیه و تولید واکسن مناسب با سویه‌های در حال گردش مفید می‌باشد.

## 2- مواد و روش‌ها

30 نمونه بیمار مورد آزمایش قرار گرفتند.

## 1-2- استخراج RNA

ابتدا برای جلوگیری از آلودگی احتمالی میکروتیوب‌ها و سرسمپلرها با آنزیم RNase، این وسایل قبلاً به مدت یک شبانه روز در محلول 1% (حجمی حجمی) DEPC (Diethyl pyrocarbonate) قرار گرفتند و سپس اتوکلاو شدند تا DEPC غیر فعال گردد. برای جداسازی RNA از محلول (RNX شرکت سیناژن با cat:RN7713C) که حاوی guanidine salt و phenol solution می‌باشد، به شرح زیر طبق پروتوکول کیت مربوطه استفاده شد: در یک میکروتیوب 1.5 ml که حاوی 500µl از سوسپانسیون ویروس است، 800µl محلول RNX اضافه کرده و به مدت 10-15 ثانیه با دست تکان داده می‌شود. سپس به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق قرار داده و پس از آن 200µl کلروفرم به آن اضافه کرده، 30-15 ثانیه به شدت آنرا تکان داده و به مدت 5 دقیقه در 20°C- قرار داده شد، سپس در 4°C به مدت 15 دقیقه با دور 12000g سانتریفوژ گردید. بعد از سانتریفوژ محلول داخل میکروتیوب حاوی 3 فاز بود که فاز رویی فاز آبی و حاوی RNA می‌باشد. فاز رویی به آرامی به کمک سمپلر

جدا گردید، به نحوی که هیچ تداخلی با فاز میانی پیدا نکند و به یک میکروتیوب استریل جدید منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول به آن افزوده شد. برای تشکیل رسوب به مدت 2 ساعت در فریزر  $20^{\circ}\text{C}$  قرار داده و سپس در  $4^{\circ}\text{C}$  به مدت 15 دقیقه با دور 12000 سانتریفوژ گردید. محلول رویی را خالی کرده و  $500\mu\text{l}$  اتانول 70% اضافه کرده و به مدت 3 دقیقه با دور 7500g در  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفوژ شد. الکل را خالی کرده و میکروتیوب را به صورت وارونه بر روی دستمال تمیز قرار داده تا اتانول آن تبخیر شود. زیرا اتانول موجود در میکروتیوب در صورت عدم تبخیر موجب تداخل در مراحل PCR می شود. با توجه به اندازه رسوب موجود در میکروتیوب،  $12-25\mu\text{l}$  DEPC treated water به آن اضافه کرده و به مدت 5-10 دقیقه در بن ماری  $55-60^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد (حرارت به باز شدن ساختارهای ثانویه احتمالی در RNA کمک می کند) و بلافاصله به یخ منتقل شد تا به سرعت وارد مرحله ساخت cDNA بشود. RNA بلافاصله بعد از سنتز تبدیل به cDNA گردید. در صورت نگهداری برای مدت محدود به حجم های  $12\mu\text{l}$  تقسیم گردیده در میکروتیوب ها در فریزر  $80^{\circ}\text{C}$  نگهداری می شود.

### 2-2- سنتز cDNA

برای سنتز از کیت سنتز cDNA استفاده شد. طبق پروتکل کیت به میزان  $10\text{ng}-5\mu\text{g}$  RNA نیاز است. میزان RNA استخراج شده با کمک دستگاه نانودراپ بدست آمد و با توجه به دستور پروتوکول،  $9\mu\text{l}$  از RNA را برداشته و به آن  $1\mu\text{l}$  از پرایمر U 12 (جدول 1) با غلظت  $200\text{ng}/\mu\text{l}$  اضافه کرده و به مدت 5 دقیقه در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  قرار داده سپس به میزان  $10\mu\text{l}$  از محلول RT Premix اضافه کرده

### 3-2- PCR

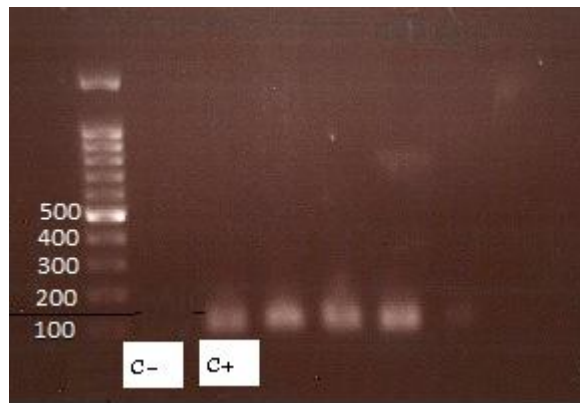
جدا گردید، به نحوی که هیچ تداخلی با فاز میانی پیدا نکند و به یک میکروتیوب استریل جدید منتقل شد و هم حجم آن ایزوپروپانول به آن افزوده شد. برای تشکیل رسوب به مدت 2 ساعت در فریزر  $20^{\circ}\text{C}$  قرار داده و سپس در  $4^{\circ}\text{C}$  به مدت 15 دقیقه با دور 12000 سانتریفوژ گردید. محلول رویی را خالی کرده و  $500\mu\text{l}$  اتانول 70% اضافه کرده و به مدت 3 دقیقه با دور 7500g در  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفوژ شد. الکل را خالی کرده و میکروتیوب را به صورت وارونه بر روی دستمال تمیز قرار داده تا اتانول آن تبخیر شود. زیرا اتانول موجود در میکروتیوب در صورت عدم تبخیر موجب تداخل در مراحل PCR می شود. با توجه به اندازه رسوب موجود در میکروتیوب،  $12-25\mu\text{l}$  DEPC treated water به آن اضافه کرده و به مدت 5-10 دقیقه در بن ماری  $55-60^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد (حرارت به باز شدن ساختارهای ثانویه احتمالی در RNA کمک می کند) و بلافاصله به یخ منتقل شد تا به سرعت وارد مرحله ساخت cDNA بشود. RNA بلافاصله بعد از سنتز تبدیل به cDNA گردید. در صورت نگهداری برای مدت محدود به حجم های  $12\mu\text{l}$  تقسیم گردیده در میکروتیوب ها در فریزر  $80^{\circ}\text{C}$  نگهداری می شود.

### 3- نتایج

30 نمونه ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به آنفلانزا مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج RNA و تهیه cDNA به روش PCR با استفاده از پرایمرهای تهیه شده از ژن هماگلوتینین تکثیر شد؛ سپس همراه با کنترل منفی و DNA مارکرو سوش استاندارد (تهیه شده از انستیتو رازی) در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید. پس از مشاهده باند صحیح (173bp) (شکل 1) محصول PCR تخلیص و تعیین توالی گردید (شکل 2). نتایج آنالیز توالی نوکلئوتیدها در این مطالعه با توالی سویه های ثبت شده در بانک ژنی شباهت بالایی داشتند (شکل 3).

جدول 1 توالی و موقعیت پرایمرهای طراحی شده از ناحیه هماگلوتینین ژنوم آنفلانزا تیپ A (H1N1) Purto Rico

پرایمرها	توالی	موقعیت
Influenza H1N1 Purto Rico P-F	GAGTTCAGTATCTTCATTTGAG	386-407
Influenza H1N1 Purto Rico p-R	TGCTCAGGTTTGGGTACAAA	536-555
U12	AGCAAAAGCAGG	1-12



شکل 1 تصویر ژل محصول PCR: نمونه های بیماران همراه با کنترل مثبت (C+) و کنترل منفی (C-) و مارکر

Accession number: CY121656.1

```

1 ggaaaaataaa aacaacccaaa atgaaagtaa aactactggt cctattatgc acatttacag
61 ctacatatgc ggacacaata tgtatcggct accatgccaa caactcaacc gacactggtg
121 acacagtact tgaaaagaat gtgacagtga cacactctgt caacctgctt gaggacaacc
181 acaatggaaa actatgtcta ttaaaaggaa aagccccatt acaattgggt aactgcagcg
241 ttgccgggtg gatcttagga aaccagaat gcggattact gatttccaag gagtcatggt
301 cctacattgt agaaagacca aatcctgaga atggaacatg ttaccaggg catttcgccc
361 actatgagga actgaggag caattgagtt cagtatcttc atttgagagg ttcgaaatat
421 tccccaaaga aagctcatgg cccaaccaca ccgtaaccgg agtatcagca tcatgctccc
481 ataacgggga aagcagcttt tacaaaaatt tgctatggct gacgggaaaag aatggtttgt
541 acccaaacct gagcaagtcc tatgcaaaaca acaaagagaa agaagtctc gtactatggg
601 gtgttcatca cccgccaaac ataggtaacc aaatgaccct ctatcataaa gaaaatgctt
661 atgtctctgt agtgtcttca cattatagca gaaattcac ccagaaata gccaaaagac
721 ccaaagtaag agatcaagaa ggaagaatca attactactg gactctgctt gaaccggggg
781 atacaataat atttgaggca aatgggaatc taatagcgcc aagatatgct ttcgactga
841 gtagaggctt tggatcagga atcatcaact caaatgcacc aatggatgaa tgtgatgcca
901 agtgccaaac acctcagggg gctataaaca gcagtcttcc tttccagaat gtacaccag
961 tcacaatagg agaatgtcca aagtatgtca ggagtgcaaa attaaggatg gttacaggac
1021 taaggaacat cccatccatt caatccagag gtttgtttgg agccattgcc ggtttcattg
1081 aaggggggtg gactggaatg gtagatgggt ggtatggtta tcatcaccag aatgagcaag
1141 gatctggcta tgctgcagat caaaaaagca cacaaaatgc cattaatggg attacaaaca
1201 aggtgaactc tgtaattgag aagatgaaca ctcaattcac agctgtaggc aaagaattca
1261 acaaattgga aagaaggatg gaaaacttaa ataaaaaagt tgatgacggg tttatagacg
1321 tttggacata taatgcagaa ctggtgggtc tactggaaaa tgaaaggact ttggatttcc
1381 atgactcaa tgtgaagaat ttgtatgaga aagtaaaaaa ccaattaaaa aataatgcca
1441 aagaaatagg aaatgggtgt tttgaatttt atcacaagtg taacgatgaa tgcattggaga
1501 gtgtaaaaaa tggaaactat gattatccaa aatattccga agaatcaaag ttaagcaggg
1561 agaaaattga tggagtgaat ttggaatcaa tgggagtcta tcagattctg gcgatctact
1621 caacagtcgc cagttctctg gttcttttgg tctccctggg ggcaatcagc ttctggatgt
1681 gttccaatgg gtctttgcag tgtagaatat gcactaaga ccagaatttc agaaataaa
1741 gaaaaaacac
    
```

شکل 2 توالی ژن هم‌آگلوتینین ویروس آنفولانزای A و پرایمرهای (F,R) Puerto Rico (Hong Kong/1870/2008 x Puerto Rico/8/1934)(H1N1)

```

Query 386 GAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGGTTTCGAAATATTTCCCAAAGAAAGCTCATGGCCCAA 445
          |||
Sbjct 1 GAGTTCAGTATCTTCATTTGAGAGGTTTCGAAATATTTCCCAAAGAAAAGCTCATGGCCCAA 60

Query 446 CCACACCGTAACCGGAGTATCAGCA 470
          |||
Sbjct 61 CCACACCGTAACCGGAGTATCAGCA 85
    
```

شکل 3 بلاست توالی نمونه بیمار با سوسش رفرنس

**4- بحث**

از سال 1977 دو زیرتیپ آنفولانزا A شامل H3N2 و H1N1 در جمعیت‌های انسانی به گردش درآمده‌اند. در سال 2009، ویروس آنفولانزای A(H1N1) جدید در بین انسان‌ها اپیدمی و باعث آنفولانزای پاندمیک شد. چرخش گروه و زیرگروه‌های آنفولانزا در بین انسان‌ها تشخیص این ویروس را دچار اشکال کرده است [10].

روش‌های معمول برای تشخیص عفونت آنفولانزا، شامل کشت ویروس و تشخیص آنتی‌ژنی می‌باشند. با این وجود، تکنیک‌های مولکولی به منظور تشخیص مستقیم مواد ژنتیکی آنفولانزا در نمونه‌های کلینیکی می‌توانند به میزان زیادی در تشخیص سریع زیرگروه‌های آنفولانزای A انسانی و زیرگروه‌های آن که قدرت ایجاد پاندمی را دارند مفید باشند [11]. با وجود سرمایه‌گذاری‌های عظیم تحقیقاتی و ساخت واکسن‌های متعدد علیه ویروس آنفولانزا، هنوز بیماری ناشی از این ویروس کنترل نشده است. هرچند سال یک بار نوع جدیدی از ویروس آنفولانزا در اثر پدیده نوترکیبی پدیدار شده و به سرعت گسترش می‌یابد، به نحوی که قبل از هر گونه اقدامی موجب همه‌گیری جهانی می‌شود و زندگی میلیون‌ها نفر را به خطر می‌اندازد [11]. تشخیص زودهنگام و تعیین خصوصیت واریانت‌های آنفولانزا یکی از اهداف سازمان بهداشت جهانی است. از این رو دستیابی به تست‌های سریع که بتواند ویروس‌های جدید و غیر معمول را شناسایی کند، ضروری است. از میان پروتئین‌های ویروس آنفولانزا، هم‌اگلوتینین مهمترین پروتئین درگیر در ایجاد ایمنی بر علیه این ویروس است که ساختمان آن به خوبی شناسایی شده است و کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن می‌باشد [12-14]. این پروتئین روی پوشش ویروس وجود دارد و با اتصال به اسید سیالیک سطح غشای سلول‌های اپیتلیال موجود در مجرای تنفسی میزبان، در آلوده نمودن سلول‌ها نقش مهمی دارد [12].

هم‌اگلوتینین ویروس آنفولانزای A/H1N1 دچار جهش‌های ژنتیکی بسیار زیادی شده است و همین امر یکی از دلایل فرار این ویروس از دست سیستم ایمنی میزبان می‌باشد. در حال حاضر در کشور ما هیچ‌گونه فن‌آوری بومی شده‌ای برای تولید واکسن آنفولانزا و کیت‌های تشخیصی به منظور پیش‌گیری و ارزیابی سرمی افراد واکسینه شده و در معرض ویروس وجود ندارد و تهیه بانک ژن‌های ویروس به ویژه هم‌اگلوتینین در این راستا حائز اهمیت می‌باشد. در بررسی که در پرتغال در سال 2011 بر روی 351 نفر از افراد دارای علائم آنفولانزا با استفاده از تکنیک RT-PCR و به منظور تشخیص ژن هم‌اگلوتینین آنفولانزای A/H1N1 انجام شد، 54/4 درصد از افراد مبتلا، A/H1N1 مثبت بوده‌اند که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد [12]. در سال 2009، در غرب استرالیا 11/2 درصد آنفولانزای فصلی با استفاده از تکنیک RT-PCR و پرایمرهای تهیه شده از ژن هم‌اگلوتینین مشخص شد [15]. در سال 2009، WHO یک آنفولانزای پاندمیک را اعلام کرد و تست غربالگری با استفاده از یک نوار استریپ برای بیماران مبتلا به آنفولانزای A و B صورت گرفت. برای مقایسه، تکنیک RT-PCR نیز برای تعیین ویروس آنفولانزای A(H1N1) انجام شد و به این نتیجه رسیدند که تست استریپ از حساسیت و اختصاصیت پایینی برخوردار است [16]. آزمایش‌های بالینی بعد از پاندمی سال 2009 در مورد ویروس آنفولانزا A(H1N1) که دائماً در حال تغییر می‌باشد و تغییرات جدید اسید آمینه‌ها که باعث تغییر در خصوصیات آنتی ژنیکی، بیماری‌زایی و حساسیت به داروهای ضد ویروسی شده است، بسیار مهمتر جلوه کردند. تا این تاریخ، روش‌های تشخیصی متفاوت از کلاسیک تا مولکولار در دسترس هستند که زمان‌گیر بوده و از حساسیت و دقت کافی برخوردار نمی‌باشند. با استفاده از روش مولکولی RT-PCR اختصاصی که پرایمرها صحیح طراحی و

ایران، تحقیقات بیوتکنولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق و بخش ویروس شناسی انستیتو رازی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود. این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی خانم پریسا غفوری در مقطع کارشناسی ارشد با شماره ثبت 2276769 و با حمایت مالی فردی می‌باشد.

### 7- منابع

- [1] Shaw, M. L., and Palese, P. (2013) Orthomyxoviridae. In: Knipe DM, Howley P M, editor. Fields virology. 6<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins publication, New York, NY, pp. 1151-1151.
- [2] Kramarow, E. A., and Pastor, P. N. (2012) Evaluation of 11 Commercially Available Rapid Influenza Diagnostic Test. *MMWR*. 61(43), 873-876.
- [3] Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2001) Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Robert A. Lamb, Robert M. Krug, editor. *Fundamental of Virology*. 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins publication; New York, NY, PP 724-761.
- [4] Xie, Z., Pang, Y., Liu, J., Deng, X., Tang, X and Sun, J. (2006) A multiplex RT-PCR for detection of type A influenza virus and differentiation of avian H5, H7 and H9 hemagglutinin subtypes. *Mol Cell Probes*. 20(3), 245-249.
- [5] Lee, M.S., Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. (2009) Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription – PCR. *J Virol Methods*. 97(1), 13-22.
- [6] Russell, R., Gamblin, S., Haire, L., Stevens, D., Xiao, B., Ha, Y. (2004) H1 and H7 influenza hemagglutinin structures extend a structural classification of hemmagglutinin subtypes *Virology*. 325(2), 287-296.
- [7] Webster, R., Shortridge, Ka., Kawaoka, Y. (2006) Influenza: interspecies transmission and emergence of new pandemics. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 18(4), 275-279.
- [8] Murray, P. R., Rosenthal, K.S., and Pfaller, M. A. (2013) *Medical Microbiology*. 7th edition Mosby publication, Philadelphia, p. 189.
- [9] Octaviani CP<sup>1</sup>, Goto H, Kawaoka Y. Reassortment between seasonal H1N1 and pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses is restricted by limited compatibility among

انتخاب شده باشند، این مشکل تا حد زیادی برطرف می‌گردد [17، 18]. همچنین تعیین توالی ژنوم ویروس برای تشخیص ژنوتیپ و خصوصیات مولکولی مورد نیاز می‌باشد [19]. استفاده از روش PCR در تشخیص ویروس آنفولانزا برای اولین بار در سال 1991 انجام شد [20]. در این مطالعه از روش مولکولی RT-PCR و با طراحی پرایمرهای اختصاصی از ژن HA (جدول 1) که از اختصاصیت و حساسیت بالایی برخوردار است و قابلیت تشخیص و افتراق آنفولانزا A و تحت تیپ‌های آن را دارد و یک روش سریع و اختصاصی می‌باشد، استفاده شد. 10 محصول PCR مثبت پس از تخلیص تعیین توالی گردیدند و نتایج توالی بدست آمده با توالی سویه‌های جدید موجود در بانک ژنی، شباهت زیادی داشتند. با توجه به اهمیت تهیه بانک ژن هماگلوتینین و نتایج به دست آمده، چنین نتیجه‌گیری می‌شود که با به‌کارگیری دستاوردهای این تحقیق، در صورت تأمین بودجه مناسب به راحتی می‌توان چنین سازه‌هایی را تهیه نمود تا در صورت بروز اپیدمی یا پاندمی آنفولانزا، با سرعت بیشتری به واکسن مؤثر و کیت‌های تشخیص سریعی دسترسی داشت.

### 5- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه تأیید می‌کند که روش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای جدید تهیه شده از ژن هماگلوتینین از اختصاصیت و حساسیت و سرعت عمل بالاتری برخوردار است و قابلیت تشخیص و افتراق سریع آنفولانزای A و زیرتیپ‌های آن را مستقیماً از نمونه‌های کلینیکی دارد و می‌توان از این روش همراه با روش تعیین توالی در تشخیص ژنوتیپ‌های جدید آنفولانزای A که برای تهیه واکسن ضروری می‌باشد، استفاده نمود.

### 6- سپاسگزاری

بدینوسیله از همه کارکنان آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک و بیولوژی مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی

- influenza A(H1N1) 2009 pandemic viruses in Australian swine. *Influenza* 6(3), 42-47.
- [16] Miarka, M., Horban, A. (2014) A clinical utility of a strip test for influenza A/B and comparison with detection by RT-PCR. *Acta Biochim Pol.* 61(3), 485-487.
- [17] Aline, G. D., Francisco, E., Pedro, A. (2015) Diagnostic methods of influenza A from clinical specimens: A critical review of literature. *Virus Review and Research.* 20(2), 391-403 .
- [18] Myers, K.P., Olsen, C.W., Gray, G.C. (2007) Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin Infect Dis.* 15,(8), 1084-1088.
- [19] Ghazi, Ataei, Z., Dabirmanesh, B. (2012) Molecular detection of human parechovirus type 1 in stool samples from children with diarrhea. *Int J Infect Dis.* 16(9), 673-676.
- [20] Zhang, W.D., Evans, D.H. (1991) Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 33(1-2), 165-189.
- polymerase subunits. *J Virol.* 85(16), 8449-8452.
- [10] Ojo, S., Guffy, M. (1975) Facial-digital syndrome in purebred angus cattle. *Vet Med Small Anim Clin.* 70 (1), 28-29.
- [11] Wiley, D.C., Wilson, I.A., Skehel, J.J. (1981) Structural identification of the antibody binding sites of Hong Kong influenza hemmagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature.* 289 (10), 373-380.
- [12] Ramalho-santos, J., de lima, M.C. (1998) The influenza virus hemmagglutinin: a model protein in the study of membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta.* 29 (1), 147-154.
- [13] LaRussa, P., Pandemic novel 2009 H1N1 influenza: what have we learned. (2011) *Semin Respir Crit Care Med.* 32 (4), 393-399.
- [14] Muller, M., Renzullo, S., Brooks, R., Ruggli, N., Hofman, M.A. (2010). Antigenic characterization of recombinant hemagglutinin proteins derived from different avian influenza virus subtypes. *PLoS One.* 5 (2), 1-9.
- [15] Deng, Y.M., Iannello, P., Smith, I., Watson, J., Watson, Y.K. (2012). Transmission of