چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

تشخيص همزمان تايپ و ساب تايپ هاي ويروس A انفلوانزا H5 و H9 با روش مولكولي Multiplex RT-PCR

دكتر اسماعيل صابرفر [**۳و۱] ، محمد مهدي فرقاني فرد** [*۳و۲] **و بابک پوراکبری** [۳]
۱- دانشكده علوم پزشكي بقيه ا... - گروه ميكروبيولوژي
۲- دانشگاه امام حسين (ع)- گروه علوم زيستي
۳- آزمايشگاه تخصصي ويرومد- بخش سلولي و ملكولي (آدرس: تهران،خ آزادي، خ اسكندري شمالي، پ۳۷/۲، واحد ۸ و ۹، تلفن ٦٩٢٤٠١٠، دورنگار ٦٩٤٩٦٤٣،**viromed@mail.com**)

خلاصه:

با توجه به شيوع ويروس انفلوانزاي مرغي H9N2 در بين گونه هاي طيور پرورشي ايران و نيز مشاهده ساب تايپ هاي خطرناك قابل انتقال به انسان مثل H7N7, H5N2 در كشورهاي خاور ميانه از جمله هند و پاكستان، تشخيص سريع و قطعي ويروس انفلوانزا با روش ملكولي Multiplex RT-PCR بمنظور شناسائي همزمان ساب تايپ هاي مختلف آنفلوانزاي مرغي قابل انتقال به انسان (H5 و H9) راه اندازي شد. بمنظور تعيين تايپ و ساب تايپ ويروس آنفلوانزا به ترتيب، پرايمرهاي اختصاصي از ژن ماتريكس (M) و پرايمرهاي اختصاصي ژن هماگلوتينين (HA) مربوط به ساب تايپ هاي H5 و H9 انتخاب و واكنشهاي زير راه اندازي شد:
۱- تعيين تايپ ويروس انفلوانزا A (ساب تايپ هاي H5 و H9) با استفاده از پرايمرهاي ژن M به روش RT-PCR.
۲- تشخيص ساب تايپ هاي ويروس انفلوانزا A (H5 و H9) با استفاده از پرايمرهاي ژن هاي HA اختصاصي هر ساب تايپ با روش RT-PCR.
۳- تشخيص همزمان ساب تايپ هاي ويروس انفلوانزا A (H5 و H9) با استفاده از پرايمرهاي ژن هاي HA اختصاصي هر ساب تايپ با روش Multiplex RT-PCR.
در اين بررسي ۱۴۷ نمونه سواپ كلوآك و تراكه تهيه شده از مرغهاي مشكوك به عفونت انفلوانزا، با روش Multiplex RT-PCR ساب تايپينگ شد كه به ترتيب ۳۹ و ۱۱ مورد از لحاظ وجود ساب تايپ H9 مثبت تشخيص داده شد در حاليكه هيچيک از نمونه های سوآپ جمع آوری شده از لحاظ وجود ساب تايپ H5 مثبت نبود. در بررسي ديگر از ۲۶ نمونه سوآپ نای انساني مشكوك به انفلوانزا، ۴ مورد عفونت با ويروس انفلوانزا تايپ A تشخيص داده شد. نتايج حاصل نشان داد كه Multiplex RT-PCR، روشي سريع و كاملا اختصاصي براي تشخيص همزمان تايپ A و ساب تايپ هاي H5 و H9 ويروس آنفلوانزا می باشد.
كلمات كليدي: انفلوانزا، هماگلوتينين، RT-PCR، ساب تايپ

مقدمه:

ويروسهای تايپ A انفلوانزا جزو خانواده اورتو ميكسو ويريده هستند كه قابليت عفونت زايی در پستانداران و پرندگان از جمله اسب، خوک و گونه های مختلف طيور و نيز در انسان را دارا می باشند (۱). پس از شيوع عفونت های آنفلوانزای H5N1 در انسان (۱۹۹۷، هنگ كنگ) و نيز ايزوله كردن ويروس H9N2 از انسان در سال ۱۹۹۹، هماگلوتينين های ساب تايپ های H5 و H9 مورد توجه قرار گرفت (۷). ويروس آنفلوانزا ساب تايپ H9N2 اولين بار در سال ۱۹۶۶ بدنبال بيماری تنفسی از بوقلمون ايزوله گرديد. در آسيا مراقبت های طولانی مدت در طيور بين سالهای ۸۵/ ۱۹۷۵(در هنگ كنگ)، وجود ساب تايپ H9N2 را در مرغابی های بظاهر سالم تاييد كرد (۶). از اوايل دهه ۱۹۹۰ شيوع ويروس H9N2 در بين جوجه ها نيز در آسيا آغاز شد. نتايج مطالعات انجام شده نشان ميدهد كه ويروس آنفلوانزای H5 كه در انسان در سال ۱۹۹۷ سبب ايجاد عفونت گرديد، حاصل نوآرايی ژنتيكی بين ساب تايپ های H9N2 و H5N1 بوده است (۳).مطالعات انجام شده در سال ۱۹۹۷ نشان داد كه اين دو ساب تايپ بطور همزمان در جمعيت طيور انتشار داشته است. همين موضوع سبب ايجاد پيش فرضيه ای گرديد كه بر طبق آن، در پی عفونت زايی همزمان اين دو ساب تايپ در يک ميزبان، تعويض های قطعات ژنتيكی بين اين دو ساب تايپ روی داده است (۳). بنابراين با توجه به قدرت بالای بيماری زايی اين ساب تايپ ها در انسان و طيور (بخصوص H5) اهميت شناسايی اختصاصی اين ويروسها در برنامه های نظارتی و مراقبتی شايان توجه است (۲).در اين مطالعه با استفاده از روش مولكولی Multiplex RT-PCR كه يكی از اختصاصی ترين روشهاست، و همچنين با استفاده از پرايمر های اختصاصی تايپ و ساب تايپ، شناسايی دقيق، اختصاصی و همزمان ساب تايپ های H5 و H9 راه اندازی و انجام شد.

مواد و روشها:

ويروسها: سويه های ويروس آنفلوانزا كه مورد استفاده قرار گرفتند شامل آنتی ژن استاندارد ساب تايپ H5N1 تهيه شده از شركت VLA (Veterinary Laboratories Agency) انگلستان و نيز ساب تايپ H9N2 تهيه شده در آزمايشگاه تخصصی ويرومد (ايران/تهران)، بود و استخراج RNA از سويه های ويروسی با استفاده از كيت RNX^{TM}-Plus (سيناژن-ايران) صورت گرفت. به منظور رونويسی معكوس پرايمر های اليگو نوكلئوتيدی مورد نظر طبق جدول ۱ انتخاب و سنتز گرديد (سيناژن/ايران). واكنش رونويسی معكوس برای ژنهای M و HA ساب تايپ های مورد نظر بطور جداگانه و در حجم كلی ۲۰ ميكروليتر برای هر ژن راه اندازی شد. واكنش زنجيره ای پليمراز (PCR) برای هر دو ژن

M و HA از هر ساب تایپ در حجم ۳۰ میکرولیتر راه اندازی گردید. براي واکنش Multiplex RT-PCR مانند مرحله PCR عمل گردید با این تفاوت که واکنش در حجم ۵۰µl انجام شد. محصولات PCR تعیین ترادف گردید (MWG/آلمان). شناسایی محصولات PCR روی ژل بوسیله الکتروفورز محصولات انجام پذیرفت. نمونه هاي بالیني نیز با این روش مورد بررسي قرار گرفت.

نتایج:

به منظور تعیین حساسیت واکنش، از رقت های مختلف RNA استخراج شده استفاده شد که در نهایت غلظت ۵ ng/µl از RNA استخراجی نیز قدرت شروع RT-PCR را داشت. در تمامی واکنش ها شامل RT-PCR ژنهای M و HA ساب تایپ های H5 و H9 و نیز واکنشMultiplex RT-PCR ژن HA ساب تایپ های H5 و H9 ، محصولات واکنش ها با طول مورد نظر بر روی ژل آگارز و با رنگ آمیزی EtBr تحت UV قابل رویت بود. مقایسه نتایج حاصل از تعیین ترادف محصولات PCR با توالی های گرفته شده از بانک ژنی NCBI نیز همولوژی بالای ۹۸% قطعات محصول تکثیر یافته توسط PCR را با سکانس استاندارد سویه های مورد نظر را نشان می داد. بمنظور بررسی نمونه های کلینیکی مرغی مشکوک به حضور ویروس انفلوانزا بوسیله Multiplex RT-PCR بر طبق روش گفته شده، ۱۴۷ سوآپ کلوآک و تراکه مورد آزمایش قرار گرفت که در این بین، از میان ۹۸ نمونه کلواک ۳۹ مورد و از میان ۴۹ نمونه تراکه ۱۱ مورد از لحاظ وجود ساب تایپ H9 مثبت تشخیص داده شد. در حالیکه هیچیک از نمونه های سوآپ جمع آوری شده حضور ساب تایپ H5 را نشان نمی داد. همچنین در بین نمونه های انسانی مشکوک به عفونت آنفلوانزا، از بین ۲۶ نمونه سوآپ نای مورد بررسی، ۴ مورد عفونت با ویروس آنفلوانزا تایپ A را نشان دادند (محصول PCR تنها مربوط به ژن M بود). در حالیکه از لحاظ وجود ساب تایپ های H5 و H9 نمونه مثبتی مشاهده نگردید.

بحث:

بر طبق مطالعات انجام شده، روش Multiplex RT-PCR قادر به شناسایی همزمان نواحی جداگانه DNA کروموزومی بوده و همچنین تشخیص چندین گونه باکتری بیماریزا را فراهم نموده است (۴). با این وجود استفاده از این روش برای تشخیص و شناسایی همزمان چند عامل بیماریزا با ژنوم RNA محدودیت های زیادی دارد که از آن جمله می توان به ناکارایی ذاتی مرحله رونویسی معکوس و دشواری های غلبه بر آن، و نیز استخراج و تخلیص اسید نوکلئیک از نمونه های فاقد کیفیت لازم اشاره نمود. آنچه در این مطالعه به آن پرداخته شده، به همراه نتایج حاصل از آن نشان می دهد که استفاده از روش Multiplex RT-PCR قدرت شناسایی اختصاصی و همزمان چند عامل بیماریزا را در یک نمونه کلینیکی فراهم می نماید. که بوسیله آن می توان عفونت همزمان یک بیمار را به دو ساب تایپ بیماریزای مختلف، در مدت زمانی کوتاه تشخیص داد. این نوع تشخیص کمک قابل توجهی به کنترل عفونت و پیشگیری از خسارات جانی و اقتصادی خواهد نمود،

رفرانس ها:

1. Easterday, B. C., V. S. Hinshaw and D. A. Halvorson .1997, Disease of poultry ,10th ed. pp. 583 - 605
2. Erica Spakeman, Denis A.Senne, T. S. Myers, Lesli L. Bulaga, Lindsey P. Garber, Miceal L.. Perdue. Kenten Lohman. 2002, : Development of real time RT-PCR assay for type A influenza viruses and the avian H5 and H7 heamagglutinin subtypes. Journal of clinical microbiology. Sept.2002. p:3256 – 3260
3.Guan Y., Kennedy F. Shortridge, Scott Kruss, Robert G. Webster, 1999. molecular characterization of H9N2 influenza viruses : were tshey the donors of the " internal " genes of H5N1 virus in Hong Kong ? Microbiology . 96: 9363 – 9367
4.Mahoney J. B., Luinestra , M. Tyndall, S.W. Sellars, S. Kereple and M.Chernesky . 1995. Multiplex RT-PCR for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoaea in genitourinary specimens. Journal of clinical microbiology , 33: 7049 – 3053
5. Munch M., L. P. Neilson, K. S. handberg and P. H. Jorgensen. 2001. Detection and subtyping (H5 & H7) of avian type A influenza viruses by RT-PCR and PCR-ELISA , Archives of virology . 146: 87 – 97
6. Murphy, B. R. and R. G. Webster.1996. Orthomixoviruses . In: Field virology , 3rd ed. S. N. fields. D. M. Knipe, P.M. Howley, R. M. Chanok . Philadelphia, pp: 1397 – 1445
7. Nikolai V. Kaverin, Irina A. Rudneva, Natalia A.Ilyushina, Aleksander S. Liptov, Scott Kruss and R.G. Webster. 2004, Stractural difference among heamagglutinin of influenza A viruses subtypes are reflected in their antigenic architector, Journal of virology , 78: 240 – 249
8. Shortridge K. F. 1992, Semin. Respir, Infect. 7 , 11 – 25
9. Stockton J, S. S. Ellis, M. Sauille, J . P. Clewley and M. C. Zambon . 1999. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. Journal of clinical microbiology. Oct.1998, p: 2990 – 2995

جدول ۱: مشخصات پرایمر های مورد استفاده.

specificity	primers	sequences
Influenza A virus	M F MR	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG
Avian H5	H5F H5 R	ACG TAT GAC TAT CCA CAA TAC TCA G AGA CCA GCT ACC ATG ATT GC
Avian H9	H9F H9R	AAG GGC TTT CAC CGA AGA G CCC ATT CTC ATT ACT GCT TCT