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

شناسائي اختصاصي تايپ و ساب تايپ ويروس انفلوانزاي H7N7 با روش مولكولي 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:
از اولين گزارش شناسايي ويروس انفلوانزاي فوق العاده بيماريزاي H7N7 در سال ۲۰۰۳ هلند، اين ويروس درجمعيت هاي انساني و مرغي در كشورهاي آسياي شرقي مجددا بروز نموده بطوري كه اخيرا به كشورهای همسايه ايران (هند و پاكستان) نيز رسيده است. با توجه به بروز اپيدمي در كشورهای همسايه ايران و نيز احتمال انتقال آن به داخل كشور، لذا براي تشخيص سريع و جلوگيري از شيوع و گسترش آسيب هاي جاني و اقتصادي آن، شناسائي اختصاصي تايپ و ساب تايپ ويروس انفلوانزاي H7N7 با روش مولكولي RT-PCR در آزمايشگاه تخصصي ويرومد راه اندازي شد. در اين تحقيق با استفاده از پرايمر هاي مربوط به ناحيه اي از ژن ماتريكس (M) تايپ A انفلوانزا و همچنين پرايمر هاي مربوط به ژن هماگلوتينين (HA) ساب تايپ H7 كه مخصوص اين ساب تايپ است واكنش RT-PCR انجام گرديد كه با سنتز DNA مكمل از قطعات مورد نظر (cDNA) از آن به عنوان الگو براي واكنش PCR استفاده شد. قطعات تكثير شده هدف به طول ۱۰۰جفت باز مربوط به ژنهاي M و HA (قطعات ۷ و ۵ ژنوم) بر روي ژل آگارز با افزودن اتيديوم برمايد و با استفاده از ترانس ايلومیناتور در طول موج ۲۵۴ لاندا مشاهده گرديد. اين مطالعه نشان داد كه روش مولكولي RT-PCR براي شناسائي تايپ و ساب تايپ ويروس انفلوانزاي H7 روشي مناسب، سريع و كاملا اختصاصي است.
كلمات كليدي: انفلوانزا، هماگلوتينين، RT-PCR، ساب تايپ

Reverse transcription- PCR assay for typing and subtyping of Influenza A viruses (H7 subtype)

E.saberfar[**1,3]**, **M. M. Forghanifard**[*2,3]**, B. pourakbari**[3]
1. Department of microbiology, Medical faculty of baghiyatallah, Tehran
2. Department of biological science, IH University of Tehran, Tehran
3. Department of cellular and molecular biology, ViroMed diagnostic laboratory, Tehran(Viromed@mail.com)

abstract
Since the end of February 2003, the Netherlands has been reporting outbreaks of highly pathogenic avian influenza A (H7N7) in poultry and humans on several place. More recently, there have been reports of H7N7 infections among birds in Belgium and Germany and among pigs and humans in the neighboring countries of Iran as Pakistan and India. While it is unusual for people to get influenza infections directly from animals, sporadic human infections and limited outbreaks caused by avian influenza A viruses, including H7N7, have been reported. Then we need a powerful tools to rapid and specific detection of H7 subtype for preventing of human mortality and economic loss caused by these infection. A RT-PCR was developed using primers for the detection of influenza A virus and the H7 subtype. The influenza type A specific primers were directed to region of the influenza A matrix (M) gene that conserved among most type A influenza viruses. The H7 primers are directed to H7 heamagglutinin (HA) gene regions that are conserved in H7 subtype. The selected primer sets were used in RT-PCR. Our results suggest that RT-PCR assay can be a useful test for detecting and subtyping of avian influenza viruses (H7 subtype).
Key word: influenza, haemagglutinin, multiplex RT-PCR, subtyping

مقدمه:
ويروس های انفلوآنزاي H7 معمولا انسان را آلوده نمي سازند، به همين دليل آنتي بادي هاي مربوط به اين ويروس ها نيز در جمعيت هاي انساني وجود نداشته و يا بسيار كم است. بنابر اين اگر ويروسي قابليت آلوده نمودن انسان را پيدا كند، امكان زيادي وجود دارد كه عفونت بين جمعيت انساني گسترش يافته و باعث بروز پاندميك عفونت گردد (۱). از آنجا كه انتقال مستقيم عفونت انفلوانزايي از حيوان به انسان به علت تفاوت ژنتيكي ساب تايپهاي بيماريزاي انساني و حيواني غير معمول است، اما بروز اپيدمي هاي گسترده آن در جهان از جمله اپيدمي ۱۹۱۸ در اسپانيا مربوط به انتقال ويروس از خوك به جمعيت انساني مي باشد و نيز در اپيدميهاي مهم بعدي حيوانات از جمله طيور نقش مهمي در بروز سويه هاي جديد ايفا نموده اند براي مثال اپيدميهاي ۱۹۵۷ در آسيا، ۱۹۶۸ در هنگ كنگ، ۱۹۷۷ در روسيه و نيزبروز اپيدمي مجدد در هنگ كنگ در سال ۱۹۹۷ را مي توان برشمرد(۲و۳).از آغاز شيوع ويروس انفلوانزاي تايپ A (H7N7) در سال ۲۰۰۳ در هلند، تا كنون گزارشات متعددي مبني بر شيوع اين ويروس در جمعيت هاي مرغي و انساني در كشور هاي مختلف از جمله بلژيك، ايتاليا، آلمان، لهستان به ثبت رسيده و اخيرا نيز دامنه گسترش آن كشور هاي خاور ميانه از جمله

ایران را تهدید مي کند(۵).با توجه به تعدد گزارشات وقوع مرگ در اثر ابتلا به عفونت انفلوانزا، شناسايي به موقع اين ويروس از اهميت زيادي برخوردار است که با شناسايي به موقع اين ويروس، با ايجاد قرنطينه و نيز استفاده از داروها و واکسنهاي موثر مي توان خسارات جاني و مالي ناشي از اپيدمي را تا حد زيادي کاهش و کنترل نمود(۴).

مواد و روشها:

ویروسها: سویه ویروس آنفلوانزا که مورد استفاده قرار گرفت شامل آنتی ژن استاندارد ساب تایپ H7N7 تهیه شده از شرکت VLA (Veterinary Laboratories Agency) انگلستان بود. تیتر هماگلوتیناسیون این ویروسها بیشتر از ۱:۱۰۲۴ واحد هماگلوتینین معین گردید .

استخراج RNA از سویه ویروسی: تخلیص RNA با استفاده از کیت RNX^{TM}-Plus (سیناژن-ایران) صورت گرفت. استخراج RNA بوسیله کلروفرم، ترسیب آن بوسیله ایزوپروپانول، شستشوی رسوب با اتانول ۷۵% و حل کردن رسوب در 1mM EDTA صورت پذیرفت. محلول حاصل شامل RNA تخلیص شده است.

رونویسی معکوس : به این منظور پرایمر های الیگو نوکلئوتیدی مورد نظر طبق جدول ۱ انتخاب و سنتز گردید (سیناژن-ایران). واکنش رونویسی معکوس برای ژنهای M و HA ساب تایپ های مورد نظر بطور جداگانه و در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر برای هر ژن شامل ۲۰۰ng/µl از RNA تخلیص شده، ۱۰pmol از پرایمر جلویی، dNTPs با غلظت ۱۰mM، بافر ۵x، ۲۰U آنزیم Ribonuclease inhibitor و ۴۰U آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MuLV راه اندازی شده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۲ °C قرار داده شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR): این واکنش برای هر دو ژن M و HA ساب تایپ در حجم ۳۰ میکرولیترو بطور جداگانه شامل ۱۰ میکرولیتر از محصول مرحله رونویسی معکوس (cDNA) بعنوان الگو، ۱۰pmol از هر پرایمر، dNTP با غلظت ۱۰mM، بافر ۱۰X، MgCl2 با غلضت ۱۰mM و ۱,۵U آنزیم Taq DNA polymerase راه اندازی گردید

تعیین ترادف: محصولات PCR تعیین ترادف گردید (MWG/آلمان). به این منظور ابتدا بوسیله کیت تخلیص محصول PCR (فرمنتاز)، قطعات DNA تخلیص و تعیین غلظت گردید و بوسیله شرکت MWG تعیین ترادف شد.

شناسایی محصولات PCR روی ژل بوسیله الکتروفورز: به این منظور با استفاده از ژل ۲% آگارز در بافر TBE(۰/۵X)، ۱۰µl از محصولات PCR با کمک loading buffer روی ژل الکتروفورز گردید

نتایج:

RNA ژنومیک تخلیص شده از ویروسها با روش اسپکتروفوتو متری تعیین غلظت گردید، میزان جذب و غلظت نمونه ها در ۲۶۰^{nm} عبارت است از:

H7N7: OD=0.288, C= 123.6 ng/µl, 260/280=1.96

پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژنی ژنهای M و HA ی ساب تایپ های H5 و H9 از لحاظ درصد GC، Tm و طول پرایمر مورد بررسی قرار گرفتند. این پرایمر ها برای واکنش های RT-PCR جداگانه،مناسب بودند. به منظور تعیین اختصاصیت واکنش از پرایمر HA ساب تایپH7 در واکنش RT-PCR سویه های استاندارد ویروس انفلوانزا ساب تایپ های H1، H3، H5، H7 و H9 استفاده شد که تنها واکنش RT-PCR ساب تایپ H7 صورت گرفته و در نهایت باند مورد انتظار از محصول PCR بدست آمد. 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 هر دو واکنش RT-PCR ژنهای M و HA ساب تایپ H7، محصول واکنش ها با طول مورد نظر بر روی ژل آگارز و با رنگ آمیزی EtBr تحت UV قابل رویت بود. بر این اساس باند مربوط به ناحیه ای از ژن M که تایید کننده تایپ A ویروسی بود با طول ۹۹ جفت باز و باند مربوط به ناحیه ای از ژن HA ساب تایپ H7 که اختصاصی ساب تایپ نیز بود با طول ۱۰۰ جفت باز بدست آمد.نتایج حاصل از تخلیص محصول PCR بوسیله سوسپانسیون سیلیکا نیز پس از خواندن جذب و تعیین غلظت عبارت بود از :

H7N7: C= 60.55ng/µl, 260/280=1.97

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.

بحث:

با توجه به پيشرفت و توسعه انواع روشهاي تشخيصي ويروس انفلوانزا از جمله کشت ويروس، ايمونوفلورسانس و تستهاي سرولوژيکي از قبيل الايزا و HI (Heamagglutinin Inhibition test)، بررسي مزايا و معايب هر روش براي تسريع و اطمينان در نتايج حاصل از آن ضروري است. اگر چه روش کشت سلولي ويروس داراي بيشترين اختصاصيت است اما در مقايسه با ساير روشها به زمان بيشتري نياز دارد، روش ايمونو فلئورسانس و تستهاي سرولوژيکي با توجه به سرعت انجام آنها از حساسيت و اختصاصيت بالايي برخوردار نيستند و فقط در مراکزي که بصورت عادي به تشخيص آنفلوانزا مي پردازند کاربرد دارد و در مواقع بروز سويه هاي جديد نمي توان از آنها به عنوان روشهاي تشخيصي مطمئن

استفاده نمود. ما در اين مطالعه روش مولكولي RT-PCR را براي شناسايي و تشخيص ويروس راه اندازي نموديم. دراين روش ابتدا با استفاده از پرايمرهاي مربوط به ژن ماتريكس ويروس كه در ميان تمامي ويروسهاي تايپ A حفاظت شده است، واكنش RT-PCR راه اندازي شد. در ادامه نيز با استفاده از پرايمرهاي ژن هماگلوتينين كه اختصاصي ساب تايپ H7N7 است، واكنش RT-PCR صورت گرفت. با توجه به نتايج بدست آمده، اين روش علاوه بر زمان كوتاهي كه براي انجام نياز دارد، از اختصاصيت و حساسيت بالايي نيز برخوردار بوده و مي تواند جايگزين مناسبي براي تستهاي تشخيصي ويروس انفلوانزا باشد.

رفرانس ها :

1.Koopmans M et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet 2004 Feb 21; 363:587-93
2.Human Cases of Avian Influenza A (H7N7) Infection - The Netherlands, May 20, 2003
3.Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, van der Nat H, Vennema H et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet 2004; 363: 587-93
4.Highly Pathogenic Avian Influenza Virus HPAI H7N7 - 2003 Epidemic in Europe, European Union control measures and epidemic review: April 24 2003
5.Fatal Human H7N7 Influenza A Virus Infection in The Netherlands
A call to identify patients with influenza-like illness and to collect specimens for respiratory agent isolation.April 21, 2003

جدول ۱: مشخصات پرايمر های مورد استفاده

specificity	primers	sequences
Influenza A virus	MF	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG
	MR	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG
Avian H7	H7F	ATT GGA CAC GAG ACG CAA TG
	H7R	TTC TGA GTC CGC AAG ATC TAT TG