

تشخیص همزمان تایپ و ساب تایپ های ویروس A آنفلوانزا H5 و H9 با روش مولکولی Multiplex RT-PCR

دکتر اسماعیل صابرفر^{۱*} و^۲ محمد مهدی فرقانی فرد^{۳*} و بابک پوراکبری^۳

- ۱- دانشکده علوم پزشکی بقیه ا... - گروه میکروبیولوژی
- ۲- دانشگاه امام حسین (ع)- گروه علوم زیستی
- ۳- آزمایشگاه تخصصی ویرومد- بخش سلولی و ملکولی (آدرس: تهران، خ آزادی، خ اسکندری شمالی، پ ۳۷/۲، واحد ۸ و ۹، تلفن ۶۹۴۰۱۰، دورنگار ۶۹۴۹۶۴۳، viromed@mail.com)

خلاصه:

با توجه به شیوع ویروس آنفلوانزا مرعی H9N2 در بین گونه های طيور پرورشی ایران و نیز مشاهده ساب تایپ های خطرناک قابل انتقال به انسان مثل H7N7, H5N2 در کشورهای خاور میانه از جمله هند و پاکستان، تشخیص سریع و قطعی ویروس آنفلوانزا با روش مولکولی Multiplex RT-PCR بمنظور شناسایی همزمان ساب تایپ های مختلف آنفلوانزا مرعی قابل انتقال به انسان (H5 و H9) راه اندازی شد. بمنظور تعیین تایپ و ساب تایپ ویروس آنفلوانزا به ترتیب، پرایمرهای اختصاصی از ژن ماتریکس (M) و پرایمرهای اختصاصی ژن همگلوئینین (HA) مربوط به ساب تایپ های H5 و H9 انتخاب و واکنشهای زیر راه اندازی شد:

- ۱- تعیین تایپ ویروس آنفلوانزا A (ساب تایپ های H5 و H9) با استفاده از پرایمرهای ژن M به روش RT-PCR.
- ۲- تشخیص ساب تایپ های ویروس آنفلوانزا A (H5 و H9) با استفاده از پرایمرهای ژن های HA اختصاصی هر ساب تایپ با روش RT-PCR.
- ۳- تشخیص همزمان ساب تایپ های ویروس آنفلوانزا A (H5 و H9) با استفاده از پرایمرهای ژن های HA اختصاصی هر ساب تایپ با روش Multiplex RT-PCR.

در این بررسی ۱۴۷ نمونه سوآپ کلوآک و تراکه تهیه شده از مرغهای مشکوک به عفونت آنفلوانزا، با روش Multiplex RT-PCR ساب تایپینگ شد که به ترتیب ۳۹ و ۱۱ مورد از لحاظ وجود ساب تایپ H9 مثبت تشخیص داده شد در حالیکه هیچیک از نمونه های سوآپ جمع آوری شده از لحاظ وجود ساب تایپ H5 مثبت نبود. در بررسی دیگر از ۲۶ نمونه سوآپ نای انسانی مشکوک به آنفلوانزا، ۴ مورد عفونت با ویروس آنفلوانزا تایپ A تشخیص داده شد. نتایج حاصل نشان داد که Multiplex RT-PCR، روشی سریع و کاملاً اختصاصی برای تشخیص همزمان ساب تایپ A و ساب تایپ های H5 و H9 ویروس آنفلوانزا می باشد. کلمات کلیدی: آنفلوانزا، همگلوئینین، RT-PCR، ساب تایپ

مقدمه:

ویروسهای تایپ A آنفلوانزا جزو خانواده اورتو میکسو ویریده هستند که قابلیت عفونت زایی در پستانداران و پرندگان از جمله اسب، خوک و گونه های مختلف طيور و نیز در انسان را دارا می باشند (۱). پس از شیوع عفونت های آنفلوانزای H5N1 در انسان (۱۹۹۷، هنگ کنگ) و نیز ایزوله کردن ویروس H9N2 از انسان در سال ۱۹۹۹، همگلوئینین های ساب تایپ های H5 و H9 مورد توجه قرار گرفت (۷). ویروس آنفلوانزا ساب تایپ H9N2 اولین بار در سال ۱۹۶۶ بدنبال بیماری تنفسی از بوقلمون ایزوله گردید. در آسیا مراقبت های طولانی مدت در طيور بین سالهای ۸۵/۱۹۷۵ (در هنگ کنگ)، وجود ساب تایپ H9N2 را در مرغی های بظاهر سالم تایید کرد (۶). از اوایل دهه ۱۹۹۰ شیوع ویروس H9N2 در بین جوجه ها نیز در آسیا آغاز شد. نتایج مطالعات انجام شده نشان میدهد که ویروس آنفلوانزای H5 که در انسان در سال ۱۹۹۷ سبب ایجاد عفونت گردید، حاصل نوآرایی ژنتیکی بین ساب تایپ های H5N1 و H9N2 بوده است (۳). مطالعات انجام شده در سال ۱۹۹۷ نشان داد که این دو ساب تایپ بطور همزمان در جمعیت طيور انتشار داشته است. همین موضوع سبب ایجاد پیش فرضیه ای گردید که بر طبق آن، در پی عفونت زایی همزمان این دو ساب تایپ در یک میزبان، تعویض های قطعات ژنتیکی بین این دو ساب تایپ روی داده است (۳). بنابراین با توجه به قدرت بالای بیماری زایی این ساب تایپ ها در انسان و طيور (خصوصاً H5) اهمیت شناسایی اختصاصی این ویروسها در برنامه های نظارتی و مراقبتی شایان توجه است (۲). در این مطالعه با استفاده از روش مولکولی Multiplex RT-PCR که یکی از اختصاصی ترین روشهاست، و همچنین با استفاده از پرایمر های اختصاصی تایپ و ساب تایپ، شناسایی دقیق، اختصاصی و همزمان ساب تایپ های H5 و H9 راه اندازی و انجام شد.

مواد و روشها:

ویروسها: سویه های ویروس آنفلوانزا که مورد استفاده قرار گرفتند شامل آنتی ژن استاندارد ساب تایپ H5N1 تهیه شده از شرکت VLA (Veterinary Laboratories Agency) انگلستان و نیز ساب تایپ H9N2 تهیه شده در آزمایشگاه تخصصی ویرومد (ایران/تهران)، بود و استخراج RNA از سویه های ویروسی با استفاده از کیت RNXTM-Plus (سیناژن-ایران) صورت گرفت. به منظور رونویسی معکوس 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 راه اندازی شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) برای هر دو ژن

M و HA از هر ساب تایپ در حجم ۳۰ میکرولیتر راه اندازی گردید. برای واکنش Multiplex RT-PCR مانند مرحله PCR عمل گردید با این تفاوت که واکنش در حجم ۵۰ μ l انجام شد. محصولات PCR تعیین ترادف گردید (M/WG/آلمان). شناسایی محصولات PCR روی ژل بوسیله الکتروفورز محصولات انجام پذیرفت. نمونه های بالینی نیز با این روش مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج:

به منظور تعیین حساسیت واکنش، از رقت های مختلف RNA استخراج شده استفاده شد که در نهایت غلظت ۵ ng/ μ l 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 واکنش Multiplex 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 آنفلوانزا 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 کلوآک 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.

رفرنس 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, Mical 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 they 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 gonorrhoea 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, Structural 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	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG
	MR	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG
Avian H5	H5F	ACG TAT GAC TAT CCA CAA TAC TCA G
	H5 R	AGA CCA GCT ACC ATG ATT GC
Avian H9	H9F	AAG GGC TTT CAC CGA AGA G
	H9R	CCC ATT CTC ATT ACT GCT TCT