

بررسی اثر تغییرات ژنتیکی در ژن هم‌گلوتینین ویروس‌های آنفلوانزا H9N2 در تشخیص آنها توسط RT-PCR

پژمان بهاری^{۱*}، سیدعلی پوربخش^۲، عبدالحمید شوشتری^۲، محمدعلی بهمنی‌نژاد^۲

چکیده

تغییرات ژنتیکی در ژن هم‌گلوتینین یک ویژگی مهم در ویروس‌های آنفلوانزا می‌باشد. این تغییرات ممکن است تشخیص تحت تیپ‌های آنفلوانزا با روش RT-PCR را با محدودیت مواجه نماید. در این مطالعه از ۶ ویروس جدا شده از نای پرندگان صنعتی مشکوک به آنفلوانزا در استان خراسان شمالی، آزمایش RT-PCR جهت تشخیص آنفلوانزای گروه A بعمل آمد و هر ۶ نمونه جهت تشخیص داده شدند. سپس این خدایه‌ها با پرایمر اختصاصی H9N2 مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که چهار جدایه H9N2 مثبت بوده و دو جدایه فاقد باند در ژل الکتروفورز بوده و منفی تشخیص داده شدند. جهت ارزیابی بیشتر، ژن کامل هم‌گلوتینین ۶ ویروس جدا شده تعیین توالی شدند. با استفاده از نرم افزار BLAST بانک ژن، تمامی ویروس‌ها تحت تیپ H9N2 شناخته شدند. همچنین با مقایسه توالی پرایمرها با توالی هدف در ژن هم‌گلوتینین در دو ویروس آخر مشخص شد که سه اتصال غیر منطبق در انتهای 3' پرایمرهای جلویی و برگشتی وجود دارد که باعث کاهش حساسیت واکنش RT-PCR و کسب نتایج منفی کاذب شده است. بنابراین توصیه می‌گردد که آزمایشات RT-PCR در یک دوره زمانی خاص به روز رسانی گردند.

واژگان کلیدی: ویروس آنفلوانزا، H9N2، ژن هم‌گلوتینین، پرایمر، RT-PCR

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۱

مقدمه

آنفلوانزای گروه A بر اساس دو گلیکوپروتئین سطحی خود هم‌گلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) طبقه‌بندی می‌شوند و تاکنون ۱۶ تحت تیپ (HA) و ۹ تحت تیپ (NA) در گونه‌های مختلف پرندگان شناسایی شده است (۵). در این میان سویه H9N2 یکی از مهمترین بیماری‌های ویروسی در

سطح مرغداری‌های کشور می‌باشد و هر سال خسارت هنگفتی به این صنعت وارد می‌نماید. در طول دهه اخیر گزارشات زیادی از تلفات و خسارات ناشی از آنفلوانزا در کشور ایران گزارش شده است (۱۹ و ۱۰). بدیهی است یکی از روش‌های پیشگیری و جلوگیری از انتشار بیماری در منطقه تشخیص سریع و زود هنگام آن می‌باشد. روش‌های مختلفی جهت تشخیص و شناسایی تحت تیپ‌های آنفلوانزا بکار گرفته شده است. روش مبتنی بر ممانعت از هم‌گلوتیناسیون (HI) و نورآمینیداز (NI) به عنوان یک روش استاندارد شناخته شده است (۱۸). اما این روش دارای محدودیت‌هایی از قبیل واکنش‌های متقاطع، برداشت‌های شخصی و حساسیت و ویژگی پایین آن می‌باشد (۵ و ۸). سکانس و تعیین توالی RNA هم‌گلوتینین یک روش حساس و دقیقی برای این منظور می‌باشد ولی این روش زمان‌بر و گران می‌باشد (۵). لذا روش RT-PCR به عنوان یک روش سریع و موثر جهت تشخیص آنفلوانزا و تحت

تیپ‌های آن توسط پژوهشگران مختلف مطرح و بکار گرفته شده است (۳۰ و ۲۱، ۱۴، ۲). اما در مواردی کاهش حساسیت و ایجاد نتایج منفی کاذب گزارش شده است (۲۴ و ۱۱).

ویروس‌های آنفلوانزا جزء ویروس‌های RNA دار بوده و فاقد توانایی خاصیت ترمیم کنندگی در ژنوم خود می‌باشند و لذا زمینه مناسب برای موتاسیون و تغییرات اسیدنوکلئیک

*۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران

(pejmanbahari@gmail.com)

۲- بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، کرج،

ایران

A/ck/H9N2/284/2012
A/ck/H9N2/286/2012
A/ck/H9N2/86/2011
A/ck/H9N2/87/2011
A/ck/H9N2/89/2011
A/ck/H9N2/91/2011.

● استخراج RNA

جهت جدا سازی RNA ویروس از نمونه‌های نای از کیت High Pure Viral nucleic acid kit (Roche Germany) طبق دستورالعمل آن استفاده شد. کیت مزبور برای جدا سازی اسید نوکلئیک ویروس به منظور انجام RT-PCR طراحی شده است.

● واکنش RT-PCR

واکنش RT-PCR با استفاده از کیت Titan One Step Tube RT-PCR Systeme شرکت Roche آلمان انجام گرفت. مخلوط RT-PCR در مجموع ۵۰ میکرولیتر بود که حاوی ۱۰ میکرولیتر بافر ۱/۵ X میکرولیتر آنزیم نسخه برداری معکوس AMV (20-25 U/μl)، ۲/۵ میکرولیتر DDT (1 m M/mL)، ۴ میکرو لیتر مخلوط جفت پرایمر (10 pmol/ml)، ۴ میکرو لیتر RNA ویروسی مورد نظر و ۲۷/۵ میکرو لیتر آب عاری از آنزیم‌های مخرب RNA می‌باشد. شرایط دمایی RT-PCR برای تکثیر ژن H9 و ماتریکس M عبارت بود از ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه برای انجام نسخه برداری معکوس (Reverse Transcription)، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه (Primary Denaturation) و ۴۰ تکرار از ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (Denaturation)، ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (Anneling)، ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (Extention) که در نهایت با ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه (Late Extention) پایان یافت و محصول واکنش در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. شرایط RT-PCR جهت تکثیر کل ژن هماگلوتینین و ماتریکس مطابق روش توصیه شده توسط Hoffman و همکاران انجام پذیرفت (۸).

قابل توجه در ژن هماگلوتینین و نورآمینیداز فراهم می‌گردد (۱۷). این ویژگی عدم تطابق کامل پرایمر با توالی هدف در ژن هماگلوتینین را بدنبال دارد و باعث ایجاد اتصال ناجور بین دو نوکلئوتید غیر مکمل مقابل هم می‌گردد و به خصوص اگر این اتصال ناجور در انتهای 3' پرایمر باشد، حساسیت واکنش PCR به میزان زیادی کاهش می‌یابد (۲۷). هدف از این مطالعه بررسی اثر تغییرات ژنتیکی در ژن هماگلوتینین و تاثیر آن در تشخیص سویه H9N2 رایج در منطقه می‌باشد، لذا می‌توان با اطلاع از این تغییرات نسبت به بهینه سازی واکنش‌های RT-PCR جهت تشخیص سویه‌های بومی کشور استفاده کرد.

مواد و روش کار

● جداسازی ویروس

در این مطالعه نمونه‌گیری از نای پرندگان مشکوک به آنفلوانزا از مرغداری‌های صنعتی استان خراسان شمالی صورت گرفت. ابتدا بافت‌های نای در زیر هود برش طولی داده شد. سپس قسمت داخلی نای توسط پنس و اسکالپل تراشیده شد و حداکثر یک میلی لیتر محلول فسفات بافر سالین (PBS) حاوی آنتی‌بیوتیک به مخاط تراشیده شده افزوده گردید. این مخلوط توسط هاون استریل چینی به صورت سوسپانسیون درآمد. سپس سوسپانسیون حاصل توسط سرنگ در لوله استریل ریخته شد لوله‌ها با دور ۱۵۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع روئی برای تزریق به تخم مرغ‌های جنین‌دار ۱۰ SPF روزه برداشت شد. با استفاده از روش هماگلوتیناسیون در مایع آلتوتوئیک جمع آوری شده و جنین‌های تلف شده مورد تایید قرار گرفت. سپس با کمک آزمایش HI نوع ویروس دارای فعالیت هماگلوتیناسیون (ویروس آنفلوانزای طیور یا ویروس نیوکاسل) مشخص گردید. در نهایت ۶ ویروس آنفلوانزا از ۳۰ مرغداری دارای علائم تنفسی جداسازی شد و مطابق ذیل نامگذاری گردید:

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده جهت RT-PCR ژن‌های ماتریکس M و هم‌گلویتینین سویه H9 در این مطالعه

منبع	توالی	اندازه محصول PCR	پرایمرها
(۲۸)	TTC TAA CCG AGG TCG AAA CG ACA AAG CGT CTA CGC TGC AG	۲۳۲	MF
(۶ و ۲۱)	TTGCTCCACACAGAGCACAAAT TGATGTATGCCCCACATGAA	۴۳۷	H9F H9R

(BLAST) در بانک ژن H9N2 بودن ویروس‌ها مورد تایید قرار گرفت. از طرف دیگر توالی نوکلئوتیدی ۶ ویروس مورد مطالعه نشان داد که دارای ۴ تا ۱۱/۹ درصد اختلاف ژنتیکی داشتند. با استفاده از نرم افزار Oligo version 7 میزان کارایی پرایمرها مورد سنجش قرار گرفت و مشاهده گردید که در ویروس‌های A/ck/H9N2/284/2012، A/ck/H9N2/286/2012، سه اتصال ناجور، در ویروس‌های A/ck/H9N2/87/2011، A/ck/H9N2/89/2011 دو اتصال ناجور و در ویروس‌های A/ck/H9N2/86/2011، A/ck/H9N2/91/2011 یک اتصال ناجور در انتهای 3' پرایمرهای H9N2 با سکانس هدف در ژنوم هم‌گلویتینین وجود دارد (جدول ۲). ولی هیچ گونه اتصال ناجوری با سکانس هدف بر روی ژن ماتریکس در انتهای 3' پرایمرها دیده نشد.

MF: پرایمر جلویی ماتریکس، MR: پرایمر برگشتی ماتریکس، H9F: پرایمر جلویی سویه H9N2، H9R: پرایمر برگشتی سویه H9N2

• تعیین توالی نوکلئوتیدی (Sequencing)

محصول RT-PCR بدست آمده ناشی از کل ژنوم هم‌گلویتینین و ماتریکس جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت MWG Biotech آلمان ارسال شد. با وارد نمودن سکانس ژن‌های هم‌گلویتینین و ماتریکس و توالی پرایمرهای استفاده شده در نرم افزار Oligo، کارایی پرایمرهای تشخیصی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

در این تحقیق قسمتی از ژن HA که شامل ۱۶۷۰ نوکلئوتید می‌باشد، تعیین توالی گردید. با همترازی و استفاده از نرم‌افزار

جدول ۲: تعداد اتصالات ناجور در انتهای 3' پرایمرهای جلویی و برگشتی سویه H9N2 با ژن هم‌گلویتینین

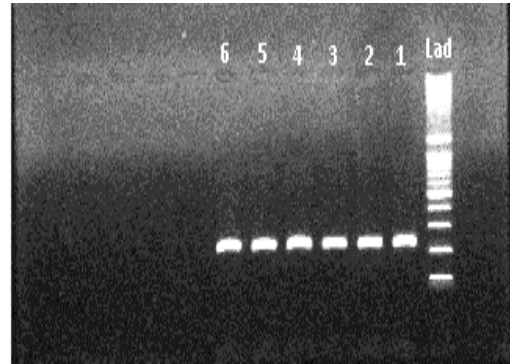
نام ویروس	تعداد اتصالات ناجور در انتهای 3' پرایمر جلویی	تعداد اتصالات ناجور در انتهای 3' پرایمر برگشتی	بازن هم‌گلویتینین و نوکلئوتیدهای جهش یافته
A/ck/H9N2/86/2011	۰	۱: (T553G)	
A/ck/H9N2/91/2011	۰	۱: (T553G)	
A/ck/H9N2/87/2011	۱: (C165A)	۱: (T553G)	
A/ck/H9N2/89/2011	۱: (C165A)	۱: (T553G)	
A/ck/H9N2/284/2012	۲: (G162A)-(C165A)	۱: (C551T)	
A/ck/H9N2/286/2012	۲: (G162A)-(C165A)	۱: (C551T)	

هدف شناسایی اولیه ویروس‌های آنفلوانزا را فراهم ساخته است.

تکثیر موفقیت آمیز PCR بستگی به طراحی پرایمر مناسب دارد. از لحاظ تئوری هر قدر توالی پرایمر با سکانس هدف منطبق باشد، اتصال پرایمر و تکثیر قطعه مورد نظر بهتر صورت می‌گیرد (۱۳ و ۲۷). میزان تغییر پذیری ژن هم‌گلوپتینین در بین تحت تیپ‌های مختلف HA بین ۲۰ تا ۷۴ درصد و در یک تحت تیپ مشابه ۰ تا ۹ درصد گزارش شده است (۱). سلطانی الوار و همکاران (۲۰۱۰) میزان تفاوت ژن HA ویروس‌های H9N2 جدا شده در استان

لرستان را ۶۳-۶۴ درصد بدست آوردند (۲۲). همایونی مهر و همکاران با بررسی سکانس نوکلئوتیدی ژن HA ویروس‌های H9N2 جدا شده در سال‌های ۱۹۹۸-۲۰۰۲ در ایران، اختلاف بین ۷-۴/۸٪ درصد را گزارش نمودند (۹). در پژوهشی توسط موسی خانی و همکاران، میزان شباهت نوکلئوتیدی هم‌گلوپتینین ۱۲ سویه آنفلوانزا جدا شده از ۱۲ استان مختلف ایران ۹/۸-۰/۱ درصد مشاهده نموده و اختلاف زیاد ویروس‌های مورد مطالعه خویش را در مقایسه با مطالعات مشابه، ناشی از گردش وسیع ویروس‌ها در بین گله‌های طیور دانستند (۱۶). میزان تغییر پذیری ژن هم‌گلوپتینین در ویروس‌های H9N2 تحت بررسی این

مطالعه ۹-۱۱/۹٪ تعیین شد که همانند سایر مطالعات دارای تغییر پذیری قابل توجهی می‌باشد. سایر تحت تیپ‌های آنفلوانزا از جمله تحت تیپ‌های H5N1 که به عنوان یک خطر جدی برای بهداشت عمومی محسوب می‌شوند نیز از این قاعده مستثنی نیستند. تغییرات ژنتیکی مداوم در این ویروس باعث شده است تا سازمان بهداشت جهانی اعتبار پروتکل‌های تشخیصی ویروس H5N1 را مورد ارزیابی مجدد قرار داده و تاکید کرده است جهت حفظ و تداوم حساسیت آزمایشات PCR به منظور تشخیص آنفلوانزا ضروری است که روش‌ها و پرایمرهای استفاده شده پس از



نگاره ۱: تشخیص آنفلوانزا تیپ A با استفاده از RT-PCR ژن

ماتریکس به طول ۲۳۲bp

، A/ck/H9N2/284/2012:۱

A/ck/H9N2/286/2012:۲

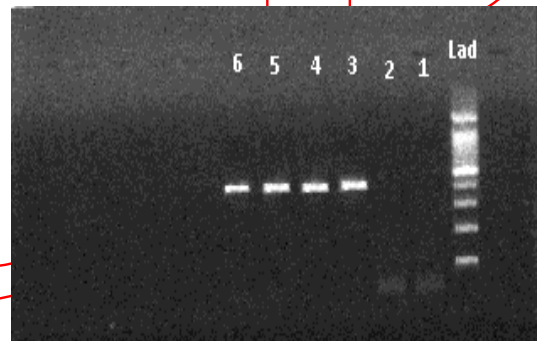
A/ck/H9N2/89/2011:۳

A/ck/H9N2/87/2011:۴

A/ck/H9N2/91/2011:۵

A/ck/H9N2/86/2011:۶

Lad:Ladder 100bp



نگاره ۲: تشخیص آنفلوانزا سویه H9N2 با استفاده از RT-PCR ژن

هم‌گلوپتینین به طول ۴۳۷bp

شماره ۱-۶ مشابه نگاره (۱) می‌باشد.

بحث

در این مطالعه نشان داده شد که وجود اتصالات ناجور در انتهای 3' پرایمرهای اختصاصی ژن هم‌گلوپتینین، موجب کاهش حساسیت و اکنش RT-PCR شده است در صورتیکه انطباق کامل پرایمرهای اختصاصی ژن ماتریکس با سکانس

و یک اتصال ناجور در پرایمر برگشتی) روند تکثیر واکنش را مختل نموده است (جدول ۲). طبق مطالعات گذشته پرایمرهای اختصاصی مختلفی جهت تشخیص سویه‌های H9N2 توسط محققین سایر کشورها طراحی شده است (۳۰ و ۱۳، ۲) ولی میزان حساسیت و ویژگی آن برای سویه‌های ایران نیاز به بررسی بیشتر دارد. با این دیدگاه که میزان تفاوت نوکلئوتیدی ژن هم‌گلوتینین ویروس‌های جدا شده در این استان نیز بالا بوده است، کاهش کارایی پرایمرهای قدیمی اجتناب ناپذیر می‌باشد و لزوم بازنگری در انتخاب پرایمرها بر اساس سکانس ژن هم‌گلوتینین ویروس‌های رایج در منطقه احساس می‌گردد. به منظور انجام یک واکنش RT-PCR به صورت مطلوب عوامل مختلفی دخالت دارند و نقش سایر عوامل که در این زمینه تأثیر گذار هستند نباید فراموش گردد، از جمله می‌توان به محدودیت‌های آزمایش RT-PCR بر روی نمونه‌های کلینیکی اشاره کرد. به طور کلی انجام واکنش RT-PCR بر روی نمونه‌های کلینیکی به صورت ایده‌آل صورت نمی‌گیرد و دشوارتر از نمونه‌هایی است که از کشت ویروس داخل تخم مرغ جنین دار یا کشت سلول حاصل می‌گردد، زیرا عوامل مهارکننده به صورت طبیعی در نمونه‌های کلینیکی شامل مدفوع، خون، ادرار و بافتها وجود دارند و واکنش‌های PCR را با محدودیت مواجه می‌سازند (۲۵ و ۲۰). این عوامل مهاری ممکن است همراه با RNA در طی پروسه استخراج و خالص سازی آن باقی بمانند و کیت‌های تجارتي استخراج RNA که در دسترس هستند قادر به حذف کامل این عوامل نمی‌باشند (۲۶ و ۱۵). لذا مجموعه عوامل فوق نیز می‌تواند اثرات مهاری را تشدید نموده و در کاهش حساسیت آزمایشات دخیل باشند. از آنجایی که تعویض پرایمرها در مدت زمان کوتاه ممکن است عملی نباشد یا از سکانس ویروس‌های جدید اطلاعی نداشته باشیم بهتر است منطقه ژنومی دیگری در ویروس آنفلوآنزا که کمتر تغییر پذیر بوده و دارای حفاظت بیشتری باشد، تحت آزمایشات مولکولی قرار گیرد. در این میان ژن ماتریکس به علت داشتن

یک دوره زمانی خاص، بروزسانی گردند (۲۹). موارد فوق نشان می‌دهند که ژن هم‌گلوتینین پیوسته در حال موتاسیون و تغییرات ژنتیکی است و تغییرات مذکور می‌تواند در طی زمان حساسیت پرایمرهای تشخیصی بر اساس ژن هم‌گلوتینین را تحت تأثیر قرار دهد و احتمال اتصالات ناجور پرایمر با سکانس هدف را افزایش دهد. این اتصال ناجور به خصوص اگر در انتهای 3' پرایمر واقع شده باشد، می‌تواند کارایی واکنش PCR را به میزان زیادی کاهش دهد (۲۷). عدم شناسایی ویروس آنفلوآنزا در پاندمی ناشی از تحت تیپ H1N1 سال ۲۰۰۹ در افراد بیمار توسط Real time RT-PCR ناشی از یک اتصال ناجور در انتهای 3' پرایمر شناسایی شد و باعث منفی شدن کاذب واکنش در ۲۳ بیمار گردید، پس از بررسی‌های لازم، پرایمر و پروب مناسب بر اساس سکانس ویروس سال ۲۰۰۹ طراحی و نتایج مورد انتظار بدست آمد. پژوهشگران فوق اعلام نمودند که موتاسیون در ژن هم‌گلوتینین اثر بازدارنده در تشخیص این ویروس‌ها توسط پرایمر و پروب‌های قبلی داشته است (۱۱). همچنین در سال ۲۰۱۱ هنگام تشخیص یک واریانت جدید از آنفلوآنزای گروه B در سنگاپور مشخص شد که روش مرسوم RT-PCR قادر به شناسایی آن نمی‌باشد. با تعیین توالی این ویروس معلوم شد که دو تغییر نوکلئوتیدی در ناحیه‌ای که پروب به آن متصل می‌شود رخ داده است، این اتصالات ناجور توانایی واکنش را تحت تأثیر قرار داده و باعث کاهش حساسیت آن شده است (۱۲).

بررسی که توسط این مطالعه صورت گرفته است نشان می‌دهد یک تا دو اتصال ناجور در انتهای 3' ویروس‌های A/ck/H9N2/86/2011, A/ck/H9N2/87/2011, A/ck/H9N2/91/2011, A/ck/H9N2/89/2011 قابل تحمل بوده و منجر به کاهش تراکم باند مورد نظر گردیده است در حالی که در ویروس‌های A/ck/H9N2/284/2012 و A/ck/H9N2/286/2012 سه اتصال ناجور در انتهای 3' پرایمرها (دو اتصال ناجور در پرایمر جلویی

بکار گرفته می‌شود که طبق آن ابتدا تشخیص آنفلوانزای گروه A با استفاده از ژن ماتریکس صورت می‌گیرد در صورت مثبت بودن، تحت تیپ آن از لحاظ سروتیپ‌های H5 و H7 بررسی می‌گردد (۲۳).

بطور کلی، تغییرات ژنتیکی در هم‌آگلوتینین آنفلوانزا باعث کاهش حساسیت پرایمرهای انتخابی جهت سویه H9 در نمونه‌های کلینیکی شده و منجر به کسب نتایج منفی کاذب می‌گردد. انتخاب مناسب پرایمرها بر اساس سکانس سویه‌های رایج در منطقه و انجام RT-PCR بر روی ژن ماتریکس علاوه بر هم‌آگلوتینین تفسیر نتایج را با سهولت بیشتری امکان پذیر خواهد ساخت

REFERENCES

- 1- Air, G.M. (1981): Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 12 : 7639-43.
- 2- Chaharaein, B., Omar, A.R., Aini, I., Yusoff, K., Hassan, S.S. (2009): Detection of H5, H7 and H9 subtypes of avian influenza viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. Microbiol. Res. 164 (2): 174-9.
- 3- Ebrahim, S.M., Aghaiypour, K., Nili, H. (2008): Sequence analysis of M2 gene of avian influenza virus strain (A/Chicken/Iran/101/98 (H9N2)) as an oil vaccine seed. Iran. J. Biotech. 6(4): 235-238.
- 4- Fouchier, R.A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Van der kemp, L., Rimmelzwa, G.F., Osterhaus, A.D. (2000): Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene. J. Clin. Microbiol.. 38(11): 4096-4101.
- 5- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D. (2005): Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J. Virol. 79(5): 2814-22.
- 6- Ghadi, S., Bozorgmehri-Fard, M., Karimi, V., Tavassoti-Kheiri, M., Rafiei, M. (2009):

خصوصیات فوق مدنظر آزمایشات تشخیصی قرار گرفته است. اگر چه این روش مختص تعیین آنفلوانزا گروه A می‌باشد ولی به منظور بررسی اولیه پایش آنفلوانزا حساسیت و ویژگی بالایی دارد (۷ و ۵). در مطالعه حاضر نیز میزان انطباق پرایمرهای انتخابی با ژن ماتریکس فاقد اتصال ناجور در انتهای 3' پرایمرها بوده و حساسیت بالایی در تشخیص ویروس‌های منطقه داشته است نگاره (۱ و ۲). گزارشات متعددی موید این مطلب هستند از جمله : Fouchier و همکاران (۲۰۰۰) به علت وجود مناطق بسیار محافظت شده در ژن ماتریکس روشی را ابداع نمودند که قادر به تشخیص آنفلوانزای A از گونه‌های مختلف (پرنندگان،

انسان، اسب، خوک و فک) با استفاده از یک جفت پرایمر می‌باشد زیرا میزان تغییرپذیری در ژن ماتریکس گونه‌های مختلف را ۴٪ اعلام نمودند و تفاوت گونه‌ای باعث ایجاد تغییر عمده در توالی ژن ماتریکس نگردیده است (۴). ابراهیمی و همکاران (۲۰۰۸) میزان مشابهت سکانس آمینواسیدی ژن ماتریکس M2 بین تمام تحت تیپ‌های H5 و H9 را در جنس‌ها و مکان‌های جغرافیایی متفاوت، بین ۹۲ تا ۱۰۰ درصد گزارش کردند. در این پژوهش میزان اختلاف نوکلئوتیدی ژن ماتریکس یک سویه ایران با سویه‌های H9N2 پاکستان، دویی و هنگ کنگ و نیز سویه H5N1 در هنگ کنگ ۲ درصد برآورد شد ولی از لحاظ توالی اسیدهای آمینه ۱۳ درصد با هم مشابه بودند (۳). این یافته‌ها به وضوح نشان می‌دهند که ژن ماتریکس در زمان و مکان‌های متفاوت کمتر دچار موتاسیون شده‌اند حتی تغییر گونه‌های میزبان اثر ناچیزی در این مرحله داشته است، بطوریکه می‌توان با یک جفت پرایمر مختص ژن ماتریکس، ویروس آنفلوانزا را در گونه‌های مختلف حیوانات شناسایی کرد (۴). مزیت دیگر این روش شناسایی سویه‌های جدیدی است که از سکانس ژن هم‌آگلوتینین آنها اطلاعات کافی نداریم و می‌توان با بررسی ژن‌هایی که ثبات بیشتری دارند حساسیت آزمایشات را بالا برده و کمک شایانی به تفسیر نتایج نمود. بر این اساس روشی در آمریکا جهت پایش آنفلوانزا

- Tehran Province in 2007-2008. *Iran. J. Virol.* 3(3): 7-15.
- 7- Heydarchi, B., Hosseini, S.M., Sheykhi, N., Tabatabaian, M., Bashar, R., SF, F.M., and MT, K. (2009): A molecular survey of avian Influenza among captive birds in the city of Tehran between November 2008 and February 2009. *Iran. J. Microbiol.* 1: 32-35.
 - 8- Hoffmann, E., Stech, L., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R. (2001): Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 146: 2275-2289.
 - 9- Homayounimehr, A.R., Dadras, H., Shoushtari, A., Pournakhsh, S.A. (2010): Sequence and phylogenetic analysis of the haemagglutinin genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commercial chickens in Iran. *Trop. Anim. Health. Prod.* 42(6): 1291-7.
 - 10- Kianizadeh, M., Pournakhsh, S.A., Toroghi, R., Momayez, R. (2006): Pathogenicity and haemagglutinin gene sequence analysis of Iranian influenza H9N2 virus isolated during 1998-2001. *Iran. J. Vet. Res.* university of shiraz 7(3):12-20.
 - 11- Klungthong, C., Chinnawirotpisan, P., Hussem, K., Phonpakobsin, T., Manasatienkij, W., Ajariyakhajorn, C., Rungrojcharoenkit, K., Gibbons, R.V., Jarman, R.G. (2010): The impact of primer and probe-template mismatches on the sensitivity of pandemic influenza A/H1N1/2009 virus detection by real-time RT-PCR. *J. Clin. Virol.* 48(2): 91-5.
 - 12- Lee, H.K., Lee, C.K., Loh, T.P., Chiang, D., Tang, J.W. (2011): Missed diagnosis of influenza B virus due to nucleoprotein sequence mutations, Singapore, April 2011. *Eurosurveillance*, Volume 16, Issue 33, 18 August 2011 16(33): 1-3.
 - 13- Lee, M.S., Chang, P.c., Shien, J.H., S, H.K. (2001): Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods.* 97: 13-22.
 - 14- Lee Ms Fau - Chang, P.C., Chang Pc Fau - Shien, J.H., Shien Jh Fau - Cheng, M.C., Cheng Mc Fau - Shieh, H.K., Shieh, H.K. (2001): Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods.* 97: 13-27.
 - 15- Liu, S., Hou, G., Zhuang, Q., Shu, Y., Chen, J., Jiang, W., Li, J. (2009): A SYBR Green I real-Genetic Analysis of Hemagglutinin Protein of H9N2 Isolated from Live Bird Markets in time RT-PCR assay for detection and differentiation of influenza A (H1N1) virus in swine populations. *J. Virol. Methods.* 162(1): 184-187.
 - 16- Moosakhani, F., Shoshtari, A.H., Pournakhsh, S.A., Keyvanfar, H., Ghorbani, A. (2010): Phylogenetic Analysis of the Hemagglutinin Genes of 12 H9N2 Influenza Viruses Isolated from Chickens in Iran from 2003 to 2005. *Avian. Dis.* 870-874.
 - 17- Nobusawa, E., Aoyama, T., Kato, H., Suzuki, Y., Tateno, Y., Nakajima, K. (1991): Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *J. virol.* 182(2): 475-85.
 - 18- OIE. (2009): Avian influenza, in OIE Terrestrial Manual P: 1-20.
 - 19- Pournakhsh, S.A., Khodashenas, M., Kianizadeh, M., Goodarzi, H. (2000): Isolation and identification of avian influenza virus H9N2 subtype. *Arch. Razi. Ins.* 51: 27-34.
 - 20- Rådström, P., Knutsson, R., Wolfs, P., Lövenklev, M., Löfström, C. (2004): Pre-PCR processing. *Mol. biotechnol.* 26(2): 133-146.
 - 21- Saberfar, E., Najafi, A., Lashini, H. (2008): A Reverse transcription-PCR assay for detection of type A influenza virus and differentiation of avian H7 subtype. *Iran. J. Virol.* 2008. 2(4): 23-26.
 - 22- Soltanialvar, M., Shoushtari, H., Bozorgmehrifard, M., Charkhkar, S., Eshratbadi, F. (2010): Molecular characterization of hemagglutinin and neuramidase genes of H9N2 avian influenza viruses isolated from commercial broiler chicken in Iran. *J. Biol. Sci.* 10(2): 145-150.
 - 23- Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., Suarez, D.L. (2002): Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 40(9): 3256-3260.
 - 24- Suarez, D. (2011): Evaluation of primer and probe mismatches in sensitivity of select RRT-PCR tests for avian influenza American Association of Avian Pathologists Meeting, July 16-19.

- 25- Suarez, D.L. (2008): Avian Influenza Virus RNA Extraction from Tissue and Swab Material,. Methods Mol Biol , Humana Press, Totowa, NJ, USA. 1st. P: 22-27.
- 26- Tomaso, H., Kattar, M., Eickhoff, M., Wernery, U., Al Dahouk, S., Straube, E., Neubauer, H., Scholz, H.C. (2010): Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of Brucellae in tissue using quantitative real-time PCR. BMC. Infect. Dis. 10: 1-5.
- 27- Vinay, K., Singh, k., Anil, k. (2001): PCR Primer Design. Mol. Biol. Today,2(2): 27-32.
- 28- WHO. (2007): Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases: Geneva.
- 29- WHO. (2011): The use of PCR in the surveillance and diagnosis of influenza, in Report of the 4th meeting of the WHO working group on polymerase chain reaction protocols for detecting subtype influenza A viruses Geneva, : Switzerland.
- 30- Xie, Z., Pang, Y.S., Liu, J., Deng, X., Tang ,X., Sun, J., Khan, M.I. (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(3-4): 245-9.

