جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۱ ، شماره ۲ ، تابستان ۱۳۸۵
صفحات: ۱۱۹ - ۱۲۴

شناسایی اختصاصی ویروس آنفلوانزا تایپ A و ساب تایپ H7 با روش مولکولی RT-PCR

اسماعیل صابرفر* Ph.D. ، محمدمهدی فرقانی‌فرد* MS.c. ، علی نجفی** MS.c.

چکیـده

هدف: راه اندازی روش ملکولی RT-PCR برای شناسایی اختصاصی ویروس‌های آنفلوانزا تایپ A و ساب تایپ H7

روش بررسی: بر روی ۶ نمونه ویروس استاندارد آنفلوانزا تایپ A با استفاده از پرایمرهای مربوط به ناحیه‌ای از ژن ماتریکس (M) و همچنین پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن هماگلوتینین (HA) ساب تایپ H7 واکنش RT-PCR انجام گردید. در این راستا با سنتز DNA مکمل (cDNA) از قطعات ژن M و HA، از آن به عنوان الگو برای واکنش PCR استفاده شد.

یافته‌ها: قطعات تکثیر شده هدف مربوط به ژنهای M و HA به طول ۱۰۱ bp و ۹۸ bp بر روی ژل آگارز با افزودن اتیدیوم بروماید در طول موج ۲۵۴ نانومتر در دستگاه ترانس ایلومیناتور مشاهده گردید. باند مربوط به ژن M در تمامی ویروسهای تایپ A آنفلوانزا تأیید کننده تایپ A و باند مربوط به ژن HA اختصاصی ساب تایپ H7 تایید کننده ساب تایپ مربوطه است.

نتیجه‌گیری: روش مولکولی RT-PCR برای شناسایی ویروس آنفلوانزای تایپ A و ساب تایپ H7 آن روشی مناسب، سریع و اختصاصی می‌باشد. در صورت بروز احتمالی انواع خطرناک آنفلوانزا، این روش تشخیصی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنفلوانزا، هماگلوتینین، RT-PCR، H7

مقـدمـه

ویروسهای تایپ A آنفلوانزا دارای قابلیت عفونت‌زایی در پستانداران و پرندگان از جمله اسب، خوک و گونه‌های مختلف ماکیان و نیز انسان می‌باشند. این ویروسها دارای ژنوم قطعه قطعه هستند. دو گلیکوپروتئین غشایی این ویروسها شامل پروتئین‌های هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA)، جزو آنتی‌ژنهای اصلی ویروسی هستند که سبب القای تولید آنتی‌بادی‌های حفاظت کننده پس از عفونت می‌گردند. (۱)

مطابق با قابلیت تغییرپذیری آنتی ژن ویروس، این گلیکوپروتئین‌ها نیز دارای ویژگی‌های متنوعی می‌باشند. تغییرات ژنتیکی در ژنوم HA و NA باعث تفاوت در ساختمان پروتئینی آنها می‌گردد که نتیجه آن بروز ساب تایپ‌های مختلف آنتی‌ژنیک ویروس می‌شود. به طوری که گلیکوپروتئین HA به ۱۶ ساب تایپ جداگانه (H1-H16) و گلیکوپروتئین NA نیز به ۹ ساب تایپ جداگانه (N1-N9) تقسیم می‌شوند. (۲) این ساب‌تایپ‌ها برای میزبان‌های متفاوت حدت و بیماری‌زایی متفاوتی را ایجاد می‌نمایند.

دریافت مقاله: ۸۴/۸/۲۲، اصلاح مقاله: ۸۵/۵/۱۱، پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۲۹

✍ نویسنده مسئول: استادیار گروه میکروبیولوژی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله(عج) ، تهران ـ ایران
*گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)
** مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)
آدرس پست الکترونیکی: es_sab@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

حضور یا عدم حضور و نیز میزان فعالیت آنزیمهای اختصاصی در سلولهای میزبان و ایجاد برش در هماگلوتینین ویروس در گونه‌های مختلف میزبانی متفاوت است. این مسأله بروز عفونت و حدت آن را وابسته به سویه ویروسی و گونه میزبان می‌نماید، زیرا فعالیت آنزیمی میزبان در ایجاد واکنش پروتئولایتیک در پروتئین HA به عنوان پیش نیاز اصلی عفونت‌زایی ویروس آنفلوانزا در میزبانهای مختلف می‌باشد. (۳)

یکی از ساب تایپ‌های ویروس آنفلوانزا تایپ A که اخیراً به عنوان بیماریزا در انسان و طیور مطرح شده است H7N7 می‌باشد. ویروس‌های آنفلوانزای H7 معمولاً انسان را آلوده نمی‌نماید، به همین دلیل آنتی‌بادی‌های مربوط به این ویروس‌ها نیز در جمعیت‌های انسانی وجود نداشته، یا بسیار کم است. به همین دلیل اگر این ویروس قابلیت آلوده نمودن انسان را بدست آورد امکان زیادی وجود دارد که عفونت بین جمعیت انسانی گسترش یافته، باعث بروز همه‌گیری منطقه‌ای یا جهانی گردد. (۴) به طور کلی، انتقال مستقیم عفونت آنفلوانزا از حیوان به انسان به علت تفاوت ژنتیکی ساب تایپ‌های بیماریزا و نیز اختلاف آنزیمی سلولهای گیرنده انسانی غیر معمول است، اما در اثر موتاسیون امکان این انتقال وجود دارد. همانطور که بروز اپیدمی‌های گسترده آنفلوانزایی در جهان از جمله اپیدمی ۱۹۱۸ در اسپانیا در نتیجه انتقال ویروس از خوک به جمعیت انسانی گزارش شده است. در اپیدمیهای مهم بعدی نیز حیوانات از جمله طیور نقش مهمی را در بروز سویه‌های جدید ایفا نموده‌اند. برای مثال اپیدمی‌های ۱۹۵۷ در آسیا، ۱۹۶۸ در هنگ‌کنگ، ۱۹۷۷ در روسیه و نیز بروز اپیدمی مجدد در هنگ‌کنگ در سال ۱۹۹۷ را می‌توان برشمرد. (۵) از آغاز شیوع ویروس آنفلوانزای تایپ A (H7N7) در سال ۲۰۰۳ در هلند تاکنون، گزارشهای متعددی مبنی بر شیوع این ویروس در جمعیت‌های مرغی و انسانی در کشورهای مختلف از جمله بلژیک، ایتالیا، آلمان و لهستان به ثبت رسیده است و اخیراً نیز دامنه گسترش آن کشورهای خاورمیانه از جمله ایران را تهدید می‌کند. (۶)

با توجه به تعدد گزارشهای منجر به مرگ در اثر ابتلا به عفونت آنفلوانزای مرغی، شناسایی به موقع این ویروس در کنترل دامنه عفونت از اهمیت زیادی برخوردار است؛ به‌طوری که با شناسایی به موقع ویروس و اعمال قرنطینه و نیز استفاده از دارو و دیگر مراقبتهای بهداشتی می‌توان خسارات جانی و مالی ناشی از اپیدمی را تا حد زیادی کنترل نمود. (۸،۷) نظر به ضرورت تشخیص سریع عامل عفونت و تعیین تایپ آن برای اجرای سیاستهای کنترلی و بهداشتی در حداقل زمان ممکن، مناسبترین روش تشخیصی که از طرف سازمان بهداشت جهانی (WHO) نیز توصیه شده است، روش ملکولی RT-PCR است که به صورت معمولی (RT-PCR) یا به صورت تغییر یافته (Real time PCR) برای تشخیص مورد استفاده قرار می‌گیرد. اگرچه دیگر روشهای تشخیصی همچون ایمنوفلئورسانس، الیزا و کشت سلول نیز معتبر می‌باشند، اما در مقایسه با روش ملکولی RT-PCR نیاز به زمان و امکانات بیشتری دارند. (۹)

روش بررسی

ویروسها . سویه ویروس آنفلوانزا که مورد استفاده قرار گرفت، شامل آنتی‌ژن استاندارد ساب‌تایپ‌های H5N1, H7N7 و H9N2 تهیه شده از کمپانی VLA (Veterinary Laboratories Agency) انگلستان بود که از طریق سازمان دامپزشکی کشور دریافت گردید. تیتر هماگلوتیناسیون این ویروسها طبق روشی که قبلاً توضیح داده شد، انجام گرفت. (۱۰) میزان تیتر هماگلوتیناسیون آن آنتی‌ژنها برابر ۱۰۲۴ واحد هماگلوتیناسیون (HAU) تعیین گردید. سویه‌های ویروس انسانی H3N2 و H1N1 از مرکز ملی آنفلوانزا واقع در دانشکده بهداشت دانشگاه تهران دریافت گردید.

استخراج RNA از سویه ویروسی . تخلیص RNA با استفاده از کیت RNX^{TM}-Plus (سیناژن- ایران)، طبق دستورالعمل داده شده از سوی شرکت سازنده کیت صورت گرفت. بر این اساس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ویروسی با یک میلی لیتر از محلول RNX^{TM}-Plus مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ $^{\circ}C$ قرار داده شد. استخراج RNA به وسیله کلروفرم، رسوب آن به وسیله ایزوپروپانول، شستشوی رسوب با اتانول ۷۵٪ و حل کردن رسوب در 1mM EDTA صورت پذیرفت. محلول

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۱. پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی انتخابی برای **ویروس آنفلوانزا و ساب‌تایپ H7**

Specificity	Primers	Sequences	Location	Size
Influenza A virus	MF	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG	24-47	
	MR	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG	124-101	101
Avian flu H7	H7F	ATT GGA CAC GAG ACG CAA TG	1238-1257	
	H7R	TTC TGA GTC CGC AAG ATC TAT TG	1335-1313	98

حاصل شامل RNA تخلیص شده است.

رونویسی معکوس . پرایمر اختصاصی برای ناحیه‌ای از ژن M به طول ۱۰۱ جفت باز، برای شناسایی ویروس‌های آنفلوانزا تایپ A به صورت عمومی و نیز پرایمر اختصاصی برای شناسایی ناحیه ثابت ژن HA به طول ۹۸ جفت باز در ساب تایپ H7N7 ویروس آنفلوانزا، برای شناسایی اختصاصی ساب‌تایپ H7 از تحقیقاتی که قبلاً در امریکا انجام شده است، اقتباس گردید. (۸) به این منظور پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی مورد نظر طبق جدول ۱ انتخاب و سنتز گردید. (سیناژن–ایران)

واکنش رونویسی معکوس . برای ژنهای M و HA، ساب‌تایپ‌های مورد نظر به طور جداگانه و در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر برای هر ژن شامل ۲۰۰ng/µl از RNA تخلیص شده، ۱۰pmol از پرایمر پیشرو، dNTPs با غلظت ۱۰mM، بافر ۵x، ۲۰ واحد آنزیم Ribonuclease inhibitor و ۴۰ واحد آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MuLV راه اندازی شده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۲ °C قرار داده شد.

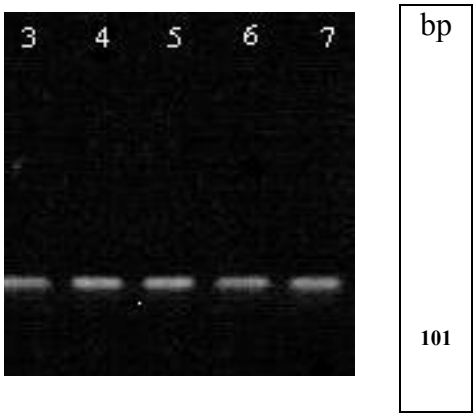
واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) . این واکنش برای هر دو ژن M و HA در حجم ۳۰ میکرولیتر و به طور جداگانه شامل ۱۰ میکرولیتر از محصول مرحله رونویسی معکوس (cDNA) به عنوان الگو، ۱۰pmol از هر پرایمر، dNTP با غلظت ۱۰mM، بافر ۱۰X، MgCl2 با غلظت ۱۰mM و ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase راه‌اندازی گردید. پس از دناتوراسیون اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل مرحله دناتوراسیون (۹۴°C به مدت ۱۰ ثانیه)، مرحله چسبیدن پرایمر (دما برای ژن M، ۵۴°C و برای ژن HA، ۵۵°C به مدت ۲۰ ثانیه) و مرحله Extension (۷۲°C) به مدت ۲۰ ثانیه) تعیین گردید. مرحله Extension نهایی نیز به مدت ۳ دقیقه در ۷۲°C در نظر گرفته شد.

تعیین ترادف محصول PCR . محصول PCR به منظور تایید اختصاصیت، ابتدا به وسیله کیت تخلیص محصول PCR (فرمنتاز)، با استفاده از سوسپانسیون سیلیکا و بافر TE، قطعات DNA تخلیص و تعیین غلظت گردید. محصولات PCR تخلیص شده به شرکت MWG در آلمان ارسال و تعیین ترادف گردید. سکانس نواحی تکثیر یافته ژنهای M و HA ساب تایپ H7 نیز جهت بررسی همولوژی، از بانک اطلاعات ژنوم NCBI گرفته شد.

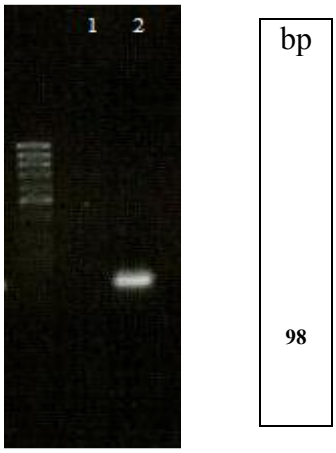
شناسایی محصولات PCR روی ژل بوسیله الکتروفورز. با استفاده از ژل ۲٪ آگارز در بافر TBE(۰/۵X)، ۱۰µl از محصولات PCR با کمک Loading buffer روی ژل الکتروفورز گردید. پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم برمایـد (۰/۱mg/ml)، ژل مورد نظر به وسیله نور فرابنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر در ترانس ایلومیناتور مورد بررسی قرار گرفت. از نشانگر ۵۰bp به عنوان شاخص طول قطعات استفاده گردید.

یافته‌ها

RNA ژنومیک تخلیص شده از ویروسها با روش اسپکتروفوتومتری تعیین غلظت گردید. میزان جذب و غلظت نمونه‌ها در ۲۶۰nm عبارت است از:



تصویر ۱. شناسایی ناحیه‌ای از ژن M (۱۰۱ bp) برای تشخیص عمومی ویروس آنفلوانزا تایپ A در ژل آگارز با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید: ستون بدون شماره شاخص طول قطعات، ستون شماره ۱ کنترل منفی (H_2O control)، ستونهای شماره ۲ تا هفت به ترتیب محصول PCR ویروس‌های ژن M از ساب تایپ‌های زیر می‌باشد: ستون ۲ H1N1، ستون ۳ H3N2، ستون H5N1۴ ، ستون ۵ H5N9، ستون ۶ H7N7 و ستون۷ H9N2.



تصویر ۲. شناسایی ناحیه‌ای از ژن HA (۹۸ bp) برای تشخیص اختصاصی ویروس آنفلوانزا ساب تایپ H7، در ژل آگارز با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید: اولین ستون بدون شماره شاخص طول قطعات، ستون شماره ۱ کنترل منفی (H_2O control) و ستون شماره ۲ محصول PCR ویروس H7N7 می‌باشد.

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

پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژنهای M و نیز ژن HA از لحاظ درصد GC، Tm و طول پرایمر مورد بررسی قرار گرفتند. این پرایمرها برای واکنش‌های RT-PCR جداگانه، مناسب بودند.

به منظور تعیین میزان اختصاصیت واکنش از پرایمر HA ساب تایپ H7 در واکنش RT-PCR سویه‌های استاندارد ویروس آنفلوانزا ساب تایپ‌های H1، H3، H5، H7 و H9 استفاده شد که تنها واکنش RT-PCR ساب تایپ H7 صورت گرفت و در نهایت باند مورد انتظار از محصول PCR فقط در مورد ساب تایپ H7 به دست آمد. به منظور تعیین حساسیت واکنش، از رقت‌های مختلف RNA استخراج شده استفاده شد که در نهایت غلظت ۵ ng/µl از RNA استخراجی نیز قدرت شروع RT-PCR را دارا بود. در هر دو واکنش RT-PCR برای ژن M در ساب تایپ‌های مختلف و ژن HA در ساب تایپ H7، محصول واکنش‌ها با طول مورد انتظار بر روی ژل آگارز با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید تحت اشعه فرابنفش (UV) قابل رویت بود. بر این اساس باند مربوط به ناحیه‌ای از ژن M که تایید کننده تایپ A در ساب تایپ‌های مختلف ویروس بود، با طول ۹۹ جفت باز (تصویر یک) و باند مربوط به ناحیه‌ای از ژن HA ساب تایپ H7 که اختصاصی این ساب تایپ بود، با طول ۱۰۱ جفت باز به دست آمد که در تصویر ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تخلیص محصول PCR به وسیله 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 توالی‌های گرفته شده از بانک ژنی NCBI به وسیله نرم افزار DNAsis نیز همولوژی بالای ٪۹۸ قطعات محصول تکثیر یافته توسط PCR را با سکانس استاندارد سویه‌های مورد نظر نشان می‌داد.

بحـث

بروز سویه‌های خطرناک آنفلوانزا در چند سال اخیر موجب گردید که سازمان بهداشت جهانی روشهای شناسایی سریع ویروس آنفلوانزای مرغی را راه اندازی و به شبکه جهانی تشخیص آنفلوانزا توصیه نماید. (۱۱) با توجه به پیشرفت و توسعه انواع روشهای تشخیصی ویروس آنفلوانزا از جمله کشت ویروس، ایمونوفلورسانس و تستهای سرولوژی از قبیل الایزا و ممانعت از

هماگلوتیناسیون (Heamagglutinin Inhibition test –HI)، بررسی مزایا و معایب هر روش برای تعیین زمان لازم برای دستیابی به نتایج و نیز کسب اطمینان از اختصاصیت و حساسیت نتایج ضروری است. اگرچه روش جداسازی و کشت ویروس در تخم‌مرغ نطفه‌دار و کشت سلول Madine-Darby canine kidney (MDCK) دارای بیشترین اختصاصیت است، اما در مقایسه با سایر روشها به زمان بیشتری نیاز دارد. روش ایمونو فلئورسانس مستقیم و تستهای سرولوژی با توجه به سرعت انجام آنها ازحساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار نیستند و فقط در مراکزی که به صورت عادی به تشخیص آنفلوانزا می‌پردازند، کاربرد دارند؛ به همین دلیل در مواقع بروز سویه‌های جدید نمی‌توان از آنها به عنوان روشهای تشخیصی مطمئن استفاده نمود. (۱۲) ارزش روش ملکولی RT- PCR برای شناسایی و بررسی ساب‌تایپ‌های مختلف ویروس آنفلوانزای انسانی قبلاً بیان شده است. (۱۳) از آنجایی که در گذشته این کار فقط بر روی سویه‌های انسانی ویروس انجام شده، ضرورت شناسایی ویروسهای جدید که انسان و حیوان را به طور خطرناک مبتلا می‌نمایند، واضح و آشکار است. ما در این مطالعه روش مولکولی RT-PCR را برای شناسایی و تشخیص ویروس آنفلوانزا تایپ A و ساب تایپ H7N7 بر روی سویه‌های استاندارد راه‌اندازی نمودیم تا امکان تشخیص این ساب تایپ در صورت بروز احتمالی عفونت خطرناک آن در کشور فراهم باشد. این روش در مقایسه با روش کشت ویروس و یا تست خنثی‌سازی ویروس به مراتب سریعتر عمل می‌نماید و ضمن تشخیص تایپ ویروس، ساب‌تایپ آن را نیز تعیین می‌نماید. از آنجایی که در کشت ویروس احتمال غیر فعال شدن ویروس به دلیل نوع نمونه‌برداری و زمان تلقیح و دیگر عوامل تاثیرگذار زیاد است، روش ملکولی این مزیت را دارد که در صورت غیر فعال شدن ویروس، امکان شناسایی ژنوم مورد نظر همچنان باقی می‌ماند. از طرف دیگر در روش کشت سلول در صورت رشد ویروس انجام آزمایشات تأییدی سرولوژی و استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال برای تعیین ساب‌تایپ لازم است که ضمن زمان‌بر بودن، دسترسی مراکز مختلف آزمایشگاهی به انواع آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نیز به سادگی امکان‌پذیر نیست ولی در روش ملکولی RT-PCR این مزیت وجود دارد که پس از راه‌اندازی اولیه در عرض چند ساعت تایپ و ساب‌تایپ ویروس با اختصاصیت و حساسیت زیاد تعیین می‌شود. ما ابتدا با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن ماتریکس ویروس که در میان تمامی ویروسهای آنفلوانزا تایپ A حفاظت شده است، واکنش RT-PCR را راه‌اندازی نمودیم که شناسایی ساب‌تایپ‌های انسانی H1، H3 و ساب‌تایپ‌های طیور H5، H7 و H9 را به صورت عمومی به عنوان تایپ A آنفلوانزا ممکن ساخت و در ادامه با استفاده از پرایمرهای ژن هماگلوتینین که اختصاصی ساب‌تایپ H7 است، واکنش RT-PCR انجام گرفت که ژنوم استخراج شده از سویه استاندارد، در رقت‌های مختلف مورد آزمایش و شناسایی واقع شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، این روش علاوه بر اینکه به زمان کوتاهی نیاز دارد، از اختصاصیت و حساسیت بالایی نیز برخوردار بوده، می‌تواند جایگزین مناسبی برای دیگر روشهای تشخیصی ویروس آنفلوانزا به طور عمومی و ساب‌تایپ H7 به‌طور اختصاصی باشد.

References

1. Ludwig S, Stitz L, Planz O, Van H, Fitch WM, Scholtissek C. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? Virology 1 1995; 212(2):555-61.

2. Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. Virol 79 2005; 5: 2814-22.

3. Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. Virol 1999; 258(1):1-20.

4. 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; 363: 587-93.

5. Webster RG, and Hulse DJ. Microbial adaptation and change: avian influenza. Rev Sci Tech 2004; 23(2): 453-65.

6. Fouchier Ron AM, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, and Osterhaus A. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome Clinical Microbiol 2000; 4096-4101.

7. Kemink SA, Fouchier RA, Rozendaal FW, Broekman JM, Koopmans M, Osterhaus AD, Schneeberger PM. A fatal infection due to avian influenza-A (H7N7) virus and adjustment of the preventive measures. Ned Tijdschr Geneeskd 2004; 148 (44): 2190-4.

8. Spakeman E, Senne DA, Myers TS, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, and Lohman K. Development of real time RT-PCR assay for type A influenza subtypes. Clinical microbial 2002; 3256-3260.

viruses and the avian H5 and H7 heamagglutinin

9. Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans. WHO Geneva 2005.

10. Saberfar E, Marschall M, Mohammadi H, Fayas A, and Meier-Ewert H. A Sensitive Neutralization Assay for Influenza C Viruses Based on the Acetylesterase Activity HEF Glycoprotein. J Iran. Biomed 2001; 5(1): 27-32.

11. Webster RG, and Hulse DJ. Microbial adaptation and change: avian influenza. Rev Sci Tech 2004; 23(2): 453-65.

12. Murphy P, Roberts ZM, Waner JL. Differential diagnoses of influenza A virus, influenza B virus and respiratory syncytial virus infections by direct immunoflourescence using mixtures of monoclonal antibodies of different isotypes. J clin Microbiol 1996; 1798-800.

13. Zhang W, Evans D. Detection and identification of human influenza viruses by polymerase chain reaction. J Virol Meth 1991; 165-89.