Archive of SID

در
امور دام و آبزیان شماره ۷۸ بهار ۱۳۸۷
پژوهش و سازندگی

راه‌اندازی تست RT–PCR برای ردیابی نوکلئوپروتئین تیپ A و تحت تیپ‌های H_5 H_7 H_9 ویروس آنفلوانزای پرندگان و کاربرد آن در موارد مشکوک به آنفلوانزای فوق حاد پرندگان ایران

• رضا طرقی
بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد
• سیدعلی پوربخش
مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
• سعید چرخکار
سازمان دامپزشکی کشور
تاریخ دریافت: دی‌ماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش:اردیبهشت ماه ۱۳۸۶
Email: r.toroghi@rvsri.ir

چکیده

بیماری آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H_9N_2 یکی از بیماریهای ویروسی مهم است که به علت ایجاد افزایش تلفات و کاهش تخمگذاری در گله‌های مبتلا، خسارات اقتصادی فراوانی را به صنعت پرندگان کشور وارد آورده است. روش متداول برای تشخیص بیماری، جداسازی ویروس در تخم مرغ های جنین‌دار ۱۰-۹ روزه می‌باشد که گاهی بسیار وقت‌گیر می‌باشد. با توجه به وقوع آنفلوانزای فوق حاد در بسیاری از کشورهای جنوب شرقی آسیا و کشور همسایه پاکستان، این مطالعه شکل گرفت تا با استفاده از روشی سریع و مطمئن تشخیص تیپ A و تحت تیپ‌های H_5, H_7 و H_9 ویروس آنفلوانزای پرندگان در بافت‌نای صورت گیرد. چهار واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نوکلئوپروتئین تیپ A و تحت تیپ‌های H_5, H_7 و H_9 ویروس آنفلوانزای پرندگان بهینه شد. همچنین واکنش‌های RT-PCR نوکلئوپروتئین تیپ A و تحت تیپ H_9 برای ردیابی ویروس بر روی بافت نای بهینه و به صورت مدل مشابه برای واکنش‌های RT-PCR تحت تیپ‌های H_5 و H_7 بر روی بافت استفاده گردید. سپس با استفاده از واکنش‌های فوق ۵۰ وقوع مشکوک به آنفلوانزای فوق حاد که از نقاط مختلف کشور در طی سالهای ۱۳۸۲ الی ۱۳۸۳ نمونه برداری شده بودند مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. در هیچ یک از نمونه‌های بررسی شده ویروس‌های تحت تیپ H_5 یا H_7 شناسائی نشد. واکنش‌های RT-PCR برای H_9 و نوکلئوپروتئین به ترتیب در ۵۰ و ۵۷ درصد جمعیت پرندگان صنعتی مورد مطالعه مثبت ارزیابی شدند. حساسیت بیشتر واکنش نوکلئوپروتئین نسبت به تحت تیپ H_9 مربوط به قابلیت سنجش میزان کمتر RNA ویروسی در واکنش نوکلئوپروتئین بود. اگرچه ویروس‌های H_9N_2 ایران جزو ویروس‌های با حدت کم تقسیم‌بندی شده‌اند ولی به نظر می‌رسد این ویروس‌ها حضور گسترده‌ای در گله‌های با تلفات بالا دارند. به طور کلی می‌توان گفت روش RT-PCR به علت سرعت، حساسیت و ویژگی زیادش یک روش قابل اعتماد در تشخیص سریع آزمایشگاهی آنفلوانزای پرندگان در پرندگان مبتلا است که می‌توان ازاین روش در مراکز نظارتی که تشخیص سریع بیماری هدف عمده می‌باشد سود جست.

کلمات کلیدی: آنفلوانزای پرندگان، H_9N_2، RT-PCR و تحت تیپ H_5 و H_7

www.SID.ir

Archive of SID

Pajouhesh & Sazandegi No 78 pp: 139-146

Development of RT-PCR for detection of nucleoprotein type A and H_5, H_7, H_9 subtypes of highly pathogenic avian influenza viruses and its application among suspicious avian influenza cases in Iran

By: Toroghi, R, Department of Veterinary Research &Biotechnology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Mashhad Pourbakhsh, S.A. Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj., Iran Veterinary Organization

Avian influenza (AI) is one of the economical viral disease in Iranian poultry industry because of increased mortality and declines in egg production in affected chicken flocks. Virus isolation in embryonated SPF chicken eggs, a time consuming method, is the most common diagnostic test. Considering the occurrence of the highly pathogenic AI among South-East Asian countries and Pakistan, this study was conducted to optimize a rapid and accurate diagnostic test for detection of H_5, H_7 and H_9 AI viruses on the trachea organ. In this study, RT-PCR for detection of avian influenza virus targeting nucleoprotein (NP) of type A avian influenza virus and hemagglutinin genes (H_5, H_7 and H_9) were evaluated with trachea samples collected from 50 clinically affected flocks during 2003 to 2004. None of the samples was found to be positive for H_5 or H_7 subtypes. The positive rates by RT-PCR of the H_9 and NP among the commercial flocks included %50 and %57, respectively. Moreover, RT-PCR for nucleoprotein was found to be more sensitive than RT-PCR for hemagglutinin. Although, it has been proven that Iranian H_9N_2 isolates belong to non-highly AI viruses. The virus is quite prevalent among the suspicious avian influenza cases. In conclusion, RT-PCR is a reliable method for rapid laboratory diagnosis of avian influenza in diseased birds because of its speed, sensitivity and specificity. Therefore, it can be used as an alternative to VI method in surveillance centers where early detection of AI virus is agoal.

Key words: Avian influenza, RT-PCR , H_9N_2, H_5 and H_7 subtypes

مقدمه

آنفلوانزا یک بیماری ویروسی شدیداً مسری و حاد دستگاه تنفسی است که بیشترین آسیب را در قسمت تحتانی دستگاه تنفسی ایجاد می‌کند. ویروس این بیماری متعلق به خانواده ارتومیکسوویریده[1] می‌باشد. خانواده ارتومیکسوویریده، ویروس‌های پوشش دار با ژنوم RNA تک‌رشته‌ای و پلاریته منفی و به صورت قطعه‌ای می‌باشند. این خانواده شامل چهار جنس یا تیپ بنام آنفلوانزای A، B، C و D یا Thogotovirus (ویروس با منشاء کنه‌ای) می‌باشند. ویروس‌های آنفلوانزای جنس A، انسان و همچنین طیف وسیعی از حیوانات از جمله اردک وحشی، جوجه، بوقلمون، خوک و اسب را آلوده می‌نمایند. کلیه ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان متعلق به جنس A می‌باشند. ویروس‌های آنفلوانزای جنسA بر اساس خصوصیت آنتی‌ژنیک گلیکوپروتئین‌های سطحی هماگلوتینین[2] (HA) و نورآمینیداز[3] (NA) به تحت تیپ‌های متفاوتی تقسیم می‌شوند (۵).

ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان طیف وسیعی از حدت را از خود نشان می‌دهند. آنفلوانزای پرندگان با قدرت بیماریزائی بالا (HPAI)[4]، یک بیماری سیستمیک بسیار مسری است که باعث بوجود آمدن جراحات التهابی هموراژیک و نکروتیک در ارگان‌های داخلی و مرگ و میر بسیار بالا می‌گردد. در حالیکه واژه non-HPAI برای سوشهائی استفاده می‌شود که نمی‌توانند هیچگونه علائم کلینیکی یا مرگ و میر در جوجه‌های حساس ایجاد نمایند (۲۲). واگیری اخیر بیماری آنفلوانزا پرندگان درایران در سال ۱۳۷۷ با عامل تحت تیپ H_9N_2 صدمات و خسارات اقتصادی فراوانی را به بار آورد. اگرچه‌این ویروس جزء ویروس‌های non-HPAI طبقه‌بندی شده است (۱۳). بین وقوع اولیه بیماری تا تشخیص نهائی تحت تیپ ویروس مدتی به طول انجامید و این فاصله زمانی به اندازه کافی به ویروس‌این امکان را داد تا از کنترل خارج شده و بسیاری از مرغداری‌های صنعتی و سنتی را در بسیاری از استان‌های کشور آلوده نماید. از آنجا که علائم بیماری آنفلوانزا شبیه بسیاری از بیماری‌های عفونی تنفسی از قبیل نیوکاسل و برونشیت عفونی می‌باشد، تشخیص بیماری بر اساس علائم بالینی و کالبدگشائی بسیار مشکل می‌باشد (۲۴).

وقوع آنفلوانزای پرندگان بسیار حاد باتحت تیپ H_5 در بسیاری از کشورهای آسیای جنوب شرقی و همچنین وقوع آنفلوانزای بسیار حاد با تحت تیپ H_7 در کشور همسایه پاکستان در سالهای گذشته (۱)، نگرانی شدیدی را در میان پرورش دهندگان پرندگان کشور ما ایجاد نمود. شاید یکی از مهمترین علل‌این نگرانی عدم وجود امکانات سریع تشخیصی در سطح کشور بود. در واقع اقدامات ریشه کنی بیماری می‌بایستی پس از تشخیص و تائید بیماری صورت گیرد. در حال حاضر، مناسب‌ترین روش جهت مبارزه با آنفلوانزای پرندگان، کنترل و ریشه‌کنی می‌باشد. برنامه کنترل و به تبع آن ریشه‌کنی، زمانی موفق است که با تشخیص زودهنگام بیماری همراه باشد (۱۱). متداول‌ترین روش تشخیص، مبتنی بر روش جداسازی ویروس می‌باشد که گاهی حدود ۲۰-۷ روز به طول می‌انجامد. انجام پاساژهای کور دراین روش، خطر آلودگی نمونه را در شرایط آزمایشگاهی افزایش می‌دهد (۱۵،۱۲).

تشخیص سریع، جلوگیری از انتشار و کنترل عفونت را به همراه داشته و مانع از ضررهای اقتصادی می‌گردد. بنابراین تشخیص سریع عفونت آنفلوانزا

www.SID.ir

Archive of SID

بسیار با اهمیت می‌باشد (۱۰،۱۲، ۱۵). از این‌رو، روش‌های تشخیص سریع بیماری همچون RT-PCR ، نقش عمده‌ای را در کنترل اپیدمی‌های مختلف بیماری ایفا می‌نماید. به طوری که تمامی روند تشخیص عامل بیماری در یک روز کاری قابل انجام می‌باشد. علاوه براین، به دلیل‌اینکه در روش ، RT-PCR، DNA تکثیر می‌یابد وجود مقادیر اندک اسید نوکلئیک ویروسی در نمونه مرضی، جهت شناسائی عامل عفونی کافی می‌باشد. در حالیکه مقادیر کم ویروس در روش جداسازی ویروس قادر به رشد نمی‌باشد (۶، ۹، ۱۲). از طرفی دیگر قدرت عفونی و فعالیت ویروس، حین جمع‌آوری نمونه و اجرای روش‌های آزمایشگاهی، تحت شرایط غیرایده‌ال و یا در طی ذخیره‌سازیهای نامناسب از دست می‌رود. دراین شرایط روش RT-PCR که قادر به تکثیر اسید نوکلئیک ویروس غیرفعال می‌باشد روشی بسیار قابل اهمیت است (۷، ۹، ۱۲).این عوامل سبب شده است که روش RT-PCR نسبت به روش جداسازی، از حساسیت بالاتری برخوردار باشد. علاوه براین، ویژگی روش RT-PCR با روش جداسازی کاملاً سازگاری دارد (۷، ۱۴، ۲۰).حساسیت، ویژگی و سرعت بالا در روش اخیر، این روش را به عنوان یک روش کارآمد جهت تشخیص سریع عفونت آنفلوانزا معرفی می‌نماید، به طوریکه می‌تواند جایگزین روش‌های مرسوم گردد. با توجه به‌اینکه روش جداسازی ویروس آنفلونزا تنها روش تشخیص آزمایشگاهی برای این بیماری در ایران بود و آزمایش سریعی برای تشخیص قطعی بیماری وجود نداشت تا از بروز خسارت اقتصادی مانند آنچه برای ویروس H_9N_2 اتفاق افتاد جلوگیری کنداین مطالعه انجام شد تا واکنش RT-PCR جهت تشخیص سریع تحت تیپ‌های H_5، H_7، H_9 از نمونه‌های بافتی بهینه شده و از آن در موارد مشکوک به بیماری استفاده شود.

مواد و روش‌ها

ویروس‌ها

ویروس آنفلوانزا (H_9N_2 A/Chicken/Iran/۷۷۲/۲۰۰۰) که قبلاً روی تخم‌مرغ توسط روش Limiting dilution کلون شده بود برای بهینه سازی واکنش RT-PCR برای H_9، نوکلئوپروتئین (NP) و تست حساسیت استفاده شد. از ویروس‌های غیرفعال آنفلوانزای H_5 وH_7 که از سوی سازمان دامپزشکی کشور یا موسسه رازی تامین شده بود جهت بهینه سازی RT-PCR تحت تیپ‌های H_5 و H_7 استفاده شد.

مواد شیمیائی و آنزیم‌ها

مواد شیمیائی و آنزیم‌های مختلف استفاده شده در این مطالعه از شرکت‌های Roche و Sigma تهیه شده بودند.

نمونه‌برداری

ارسال نمونه‌ها در این مطالعه مصادف با وقوع آنفلوانزای فوق حاد در کشورهای آسیایی جنوب شرقی و پاکستان شد. انجام واکنش‌های RT-PCR برای تحت تیپ‌های H_5،H_7،H_9 و NP در ۵۰ مورد مشکوک به آنفلوانزای فوق حاد پرندگان که از گله‌های مرغ گوشتی و مادر گوشتی، مرغ بومی، کبوتر و پرندگان مهاجر نقاط مختلف کشور ارسال شده بود انجام گرفت. تشخیص موارد مظنون براساس مشاهدات بالینی مشکوک به بیماری توسط دامپزشکان سازمان دامپزشکی کشور انجام شد. نمونه گیری در سال ۱۳۸۲ انجام شد. فقط نمونه‌های ردیف ۴۹ و ۵۰ از این مجموعه مربوط به سال ۱۳۸۳ بود. مشخصات کامل این نمونه‌ها در جدول ۱ آمده است.

استخراج RNA

استخراج RNA تام از ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون هموژنیزه بافت مخاط نای آلوده با استفاده از محلول تجارتی Tripure (Roche,Germany) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. برای انجام تست حساسیت، RNA ویروسی با استفاده از کیت تجارتی استخراج RNA ویروسی (Roche) بنا به پروتکل توصیه شده شرکت سازنده انجام گرفت.

روش RT- PCR

دراین مطالعه ابتدا واکنش RT- PCR برای تحت تیپ‌های H_5، H_7 و H_9 با استفاده از ویروس‌های خالص صورت گرفت. سپس با استفاده از تجربیات به دست آمده در مطالعه گذشته ما (۲۳) واکنش RT- PCR برای H_9 بر روی بافت نای انجام گردید. مراحل انجام RT- PCR بر روی بافت برای H_5 و H_7 کاملاً شبیه تحت تیپ H_9 بود. با استفاده از دو میکروگرم RNA تام، ۱۰ پیکو مول هر یک از پرایمرهای جلو برنده اختصاصی (۸)، ۰/۵ میلی مول dNTPS ۲۰ واحد آنزیم مهار کننده RNase ۲۵ واحد آنزیم ترانس کریپتاز معکوس M –MuLV (Roche, Germany) و با اجرای برنامه ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت، cDNAهای اختصاصی ساخته شد. در ابتدا با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی قطعه ۳۳۰ جفت باز از ژن نوکلئوپروتئین ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان تکثیر شد. این جفت پرایمر به صورت حفاظت شده در تمامی تحت تیپ‌های ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان وجود دارد به عبارتی‌این PCR وجود ویروس آنفلوانزا پرندگان را بدون در نظر گرفتن تحت تیپ آن نشان می‌دهد. سپس با استفاده از سه جفت پرایمر اختصاصی تحت تیپ‌های H_5، H_7، H_9، تست PCR برای تولید قطعات به ترتیب ۵۴۵، ۶۳۴ و ۴۸۸ جفت بازی انجام گرفت. تکثیراین قطعات در ۵۰ میکرو لیتر محلول واکنش PCR که حاوی ۶ میکرولیتر cDNA ۱۵ پیکومول از هریک از پرایمرهای گزارش شده، ۲۰۰ میکرومول dNTPs ۱/۵ میلی مول منیزیم و یک واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq (Roche) بود انجام گرفت. واکنش‌های فوق با استفاده از ماشین PCR (eppendorf, Mastercycler, gradient) و با برنامه ۹۴، ۵۰ و ۷۲ درجه سانتیگراد هریک به مدت یک دقیقه با ۳۵ بار تکرار و در انتها ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. تائید اندازه محصولات PCR به دست آمده با استفاده از جداسازی الکتروفورزی برروی ژل آگاروز یک درصد به همراه مارکر DNA استاندارد ۱۰۰ جفت بازی صورت پذیرفت. در تمامی واکنش‌های انجام گرفته از نای جوجه‌های SPF به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

آزمایش تعیین حساسیت RT-PCR برای تحت تیپ H_9

پس از استخراج RNA و اندازه‌گیری OD رقت‌های ۱۰۰، ۱۰ و ۱ نانوگرم در میکرولیتر و ۱۰۰، ۱۰ و ۱ پیکوگرم در میکرولیتر از RNA تهیه گردید. سپس در شش تیوب مستقل، ۱۰ میکرولیتر cDNA ساخته شد. به طوری که به هر کدام ازاین تیوب‌ها ۲ میکرولیتر RNA در رقت‌های یاد شدهٔ فوق افزوده شده بود. در انتها واکنش PCR، با افزودن ۵ میکرولیتر

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مشخصات گله های مورد آزمایش و نتایج ردیابی ویروس به روش RT-PCR

ردیف	نام نمونه	محل	نوع مرغداری	RT-PCR برای H_7 و H_5	RT-PCR برای H_9	RT-PCR برای NP
۱	۳۱۳ A	زابل	کبوتر	-	-	-
۲	۳۱۳ B	زابل	مرغ بومی	-	-	-
۳	۳۱۳ C	زابل	گوشتی	-	+	+
۴	۳۱۳ D	زابل	گوشتی	-	-	-
۵	۳۱۳ E	زابل	گوشتی	-	-	-
۶	۳۱۶	استان مرکزی	گوشتی	-	+	+
۷	۳۱۷	استان کردستان	گوشتی	-	+	+
۸	۳۲۰	استان فارس	گوشتی	-	+	+
۹	۳۲۱	سیستان بلوچستان	گوشتی	-	-	-
۱۰	۳۲۲ A	اصفهان	گوشتی	-	+	+
۱۱	۳۲۲ B	فلاورجان	گوشتی	-	+	+
۱۲	۳۲۲ C	فلاورجان	گوشتی	-	+	+
۱۳	۳۲۶ A	استان فارس	گوشتی	-	-	-
۱۴	۳۲۶ B	شیراز	گوشتی	-	+	+
۱۵	۳۲۶ C	اردبیل	گوشتی	-	-	-
۱۶	۳۲۶ D	قزوین	گوشتی	-	+	+
۱۷	۳۲۶ F	همدان	گوشتی	-	+	+
۱۸	۳۲۶ E	همدان	گوشتی	-	+	+
۱۹	۳۲۵ A	کرمان	گوشتی	-	-	-
۲۰	۳۲۵ B	کرمان	گوشتی	-	+	+
۲۱	۳۳۲ A	استان تهران	گوشتی	-	+	+
۲۲	۳۳۲ B	استان تهران	گوشتی	-	-	-
۲۳	۳۳۲ C	استان تهران	گوشتی	-	+	+
۲۴	۳۳۲ D	استان تهران	گوشتی	-	+	+
۲۵	۳۳۳	اردبیل	گوشتی	-	+	+
۲۶	۳۳۴	استان سیستان و بلوچستان	گوشتی	-	-	-
۲۷	۳۳۵	استان سیستان بلوچستان	بومی	-	-	-

www.SID.ir

Archive of SID

ادامه جدول -۱

۲۸	۳۳۶	اردبیل	گوشتی	-	--	-
۲۹	۳۴۱	استان فارس	گوشتی	-	-	+
۳۰	۳۴۲	نامشخص	بومی	-	-	-
۳۱	۳۴۳	اصفهان	گوشتی	-	+	+
۳۲	۳۴۴	اردبیل	گوشتی	-	+	+
۳۳	۳۴۵ A	استان فارس	گوشتی	-	-	+
۳۴	۳۴۵ B	استان فارس	گوشتی	-	+	+
۳۵	۳۴۶	استان سیستان وبلوچستان	بومی	-	-	-
۳۶	۳۴۷	استان مرکزی	پرنده مهاجر	-	-	-
۳۷	۳۴۹	استان مازندران	گوشتی	-	-	-
۳۸	۳۵۰ A	اصفهان	گوشتی	-	+	+
۳۹	۳۵۰ B	اردبیل	گوشتی	-	-	-
۴۰	۳۵۵ A	زاهدان	گوشتی	-	-	-
۴۱	۳۵۵ B	زاهدان	بومی	-	-	-
۴۲	۲۹۵ A	استان سیستان وبلوچستان	گوشتی	-	+	+
۴۳	۲۹۵ B	سراوان	گوشتی	-	-	-
۴۴	۲۹۵ C	استان سیستان و بلوچستان	گوشتی	-	-	-
۴۵	۲۹۵ D	استان سیستان و بلوچستان	گوشتی	-	-	-
۴۶	۲۹۶	نهبندان	گوشتی	-	-	-
۴۷	۳۰۸rA	بیرجند	گوشتی	-	-	+
۴۸	۳۰۸ B	قزوین	گوشتی	-	-	-
۴۹	۱۷	اراک	بومی	-	-	-
۵۰	۱۰۱	بیرجند	مادر گوشتی	-	+	+

از cDNA ساخته شده انجام شد. در ژل آگاروز، محصولات PCR به دست آمده الکتروفورز شد و عکس‌برداری از ژل انجام گردید.

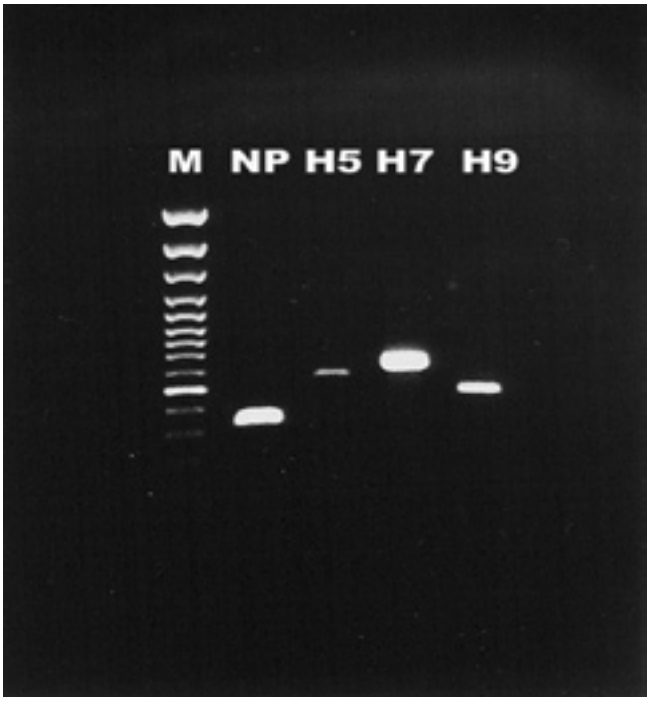
نتایج

نتایج واکنش‌های RT-PCR

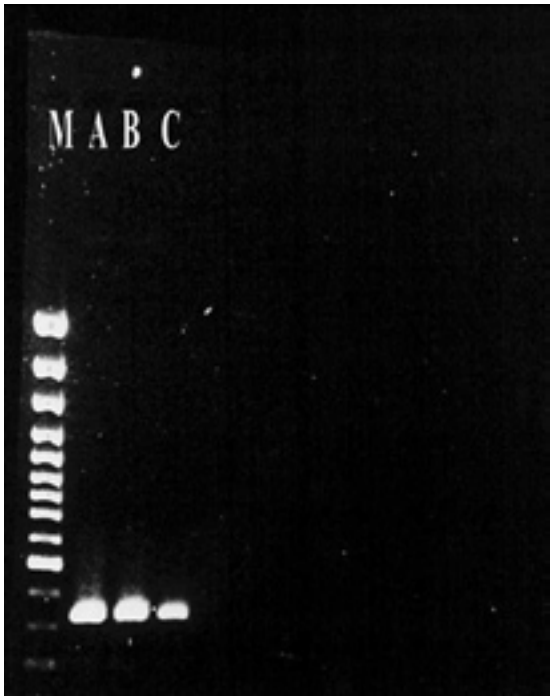
واکنش RT-PCR برای نوکلئو پروتئین (NP) و H_9 با استفاده از ویروس آنفلوانزای پرندگان ۷۷۲ و واکنش RT-PCR برای H_7،H_5 با استفاده از پادگن‌های کشته H_5 و H_7 توانست به ترتیب قطعات DNA با اندازه‌های ۵۴۵، ۳۳۰، ۴۸۸ و ۶۳۴ جفت باز را تولید نماید (شکل ۱). سپس واکنش‌های فوق بر روی بافت نای در ۵۰ وقوع مشکوک به آنفلوانزای فوق حاد که از نقاط مختلف کشور در طی سال ۱۳۸۲ و ابتدای سال ۱۳۸۳ ارسال شده بود (استان سیستان و بلوچستان ۱۶ مورد، استان فارس ۶ مورد، استان اصفهان ۵ مورد، استان اردبیل ۵ مورد، استان تهران ۴ مورد،استان مرکزی ۳ مورد، استانهای قزوین، همدان، کرمان و خراسان هر یک دو مورد و استان‌های مازندران و کردستان هر کدام یک مورد) انجام گرفت. دو نمونه آزمایش انجام شده که برای H_9 مثبت بوده اند در شکل ۲ نشان داده شده است. در تمامی واکنش‌های انجام شده کنترل مثبت و منفی لحاظ گردید. از ۵۰ نمونه بررسی شده توسط واکنش‌های RT-PCR

www.SID.ir

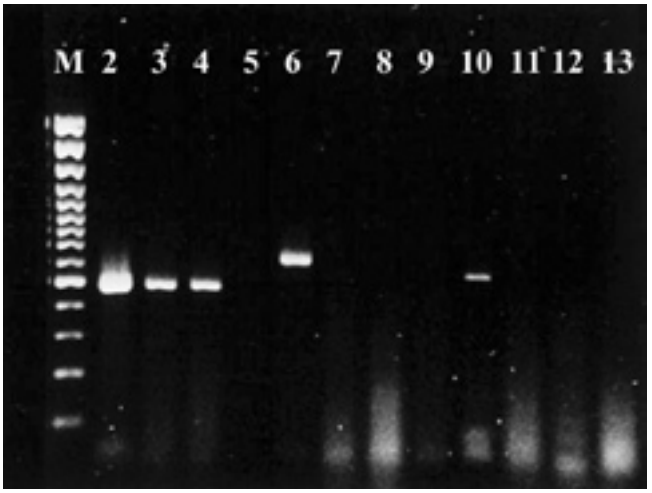
Archive of SID



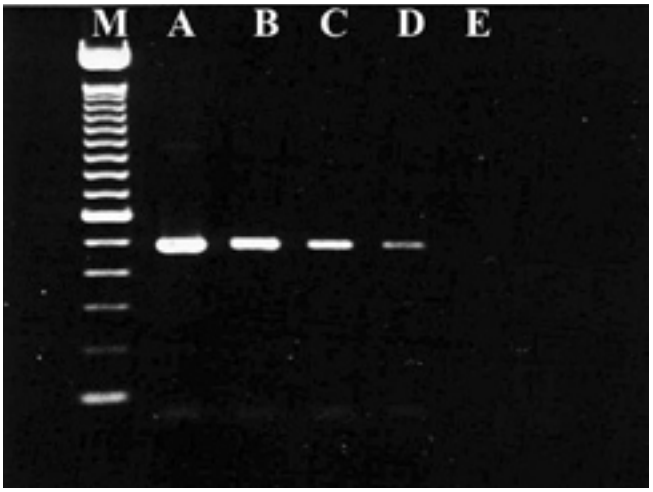
شکل ۱: نتایج واکنشهای RT-PCR برای نوکلئوپروتئین ویروسهای آنفلوانزای تیپ A و تحت تیپ های H۹،H۷،H۵ ، M : مارکر ۱۰۰ DNA جفت بازی



شکل ۳: نتایج واکنشهای RT-PCR برای NP در سه نمونه فیلد که در واکنش RT-PCR برای H۹ منفی بودند. M : مارکر ۱۰۰ DNA جفت بازی A,B,C: سه نمونه فیلد



شکل ۲: نتایج واکنشهای RT-PCR انجام شده برای دو نمونه فیلد ، ستون یک مارکر ۱۰۰ DNA جفت بازی ، ستون دو کنترل مثبت H_9 ، ستون ۳،۴ واکنشهای H_9 برای دو نمونه ، ستون ۵ کنترل منفی H_9 ، ستون ۶ کنترل مثبت H_5 ، ستون ۷و۸ واکنشهای H_5 برای دو نمونه ، ستون ۹ کنترل منفی H_5 ، ستون ۱۰ کنترل مثبت H_7، ستون ۱۱و ۱۲ واکنشهای H_7 برای دو نمونه ، ستون ۱۳ کنترل منفی H_7.



شکل ۴: نتایج تست حساسیت واکنش RT-PCR برای تحت تیپ H_9.

M : مارکر ۱۰۰ DNA جفت بازی

A : ۱۰ میکروگرم B: ۱ میکروگرم

C: ۱۰۰ پیکوگرم D: ۱۰ پیکوگرم

E : ۱ پیکوگرم

برای H_9 و NP به ترتیب ۲۲ نمونه (۴۴٪) و ۲۵ نمونه (۵۰٪) مثبت ارزیابی شدند (جدول۱). هیچ یک از نمونه‌های آزمایش شده در واکنش RT-PCR برای H_5، H_7 مثبت نبودند. آزمایش‌های RT-PCR برای تمامی موارد مرغ بومی، کبوتر و پرندگان مهاجر آبزی منفی بود. به عبارتی دیگر درصد نمونه‌های مثبت برای گله‌های مرغ صنعتی در واکنش‌های RT-PCR برای H_9 و NP به ترتیب ۵۲ (۲۲/۴۲) و ۶۰ (۲۵/۴۲) درصد بود. درسه مورد واکنش RT-PCR برای NP توانست ویروس آنفلونزا را ردیابی کند در صورتیکه‌این نمونه‌ها در واکنش RT-PCR برای H_9 منفی بودند (شکل۳). تمامی مواردی که در روش RT-PCR برای H_9 مثبت گزارش شده بودند با روش RT-PCR برای NP نیز مثبت ارزیابی شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش حساسیت RT-PCR

پس از انجام تست حساسیت مشخص گردید که واکنش RT-PCR برای H_9 قادر به تشخیص RNA ویروس آنفلوانزای پرندگان (H_9N_2) تا حد ۱۰ پیکوگرم می‌باشد (شکل ۴).

بحث

در هیچیک از بیماریهای پرندگان سرعت در تشخیص به آن اندازه‌ای اهمیت ندارد که در بیماری آنفلوانزای پرندگان فوق حاد مطرح می‌باشد. روش‌های متفاوتی برای تشخیص آنفلوانزای پرندگان مطرح می‌باشد ولی از نقطه نظر سرعت در تشخیص شاید RT-PCR یکی از مهمترین روش‌های جاری می‌باشد. با توجه به شیوع آنفلوانزای پرندگان فوق حاد در سال گذشته در بیشتر کشورهای آسیای جنوب شرقی و کشور همسایه پاکستان (۱) و از طرفی مشکلات تشخیص‌این بیماری صرفاً براساس علائم بالینی و کالبدگشائی، دراین مطالعه روش RT-PCR جهت تشخیص سریع تحت تیپ‌های H_5، H_7، H_9 و نوکلئوپروتئین (NP) ویروس‌های آنفلوانزای بهینه گشت. اخیراً گزارشات متعددی در خصوص تشخیص آنفلوانزای پرندگان با استفاده از روش‌های سریع تشخیصی مطرح شده است که بیانگر اهمیت استفاده ازاین روش‌هاست (۲،۳،۴،۱۶،۱۷،۱۸،۱۹، ۲۱). ولی استفاده ازاین روش‌ها در عفونتهای طبیعی پرندگان بسیار نادر بوده است. از این رو این مطالعه شکل گرفت تا مزیت روش مولکولی RT-PCR جهت تشخیص سریع تحت تیپ‌های H_5، H_7، H_9 ویروس آنفلونزا در گله‌های مشکوک را نشان دهد. در ابتدا واکنش‌های RT-PCR برای تحت تیپ‌های H_7، H_9، H_5 ، NP ویروس‌های آنفلونزای پرندگان با استفاده از ویروس‌های مربوطه بهینه شد. در مطالعه گذشته ما واکنش RT-PCR برای ردیابی H_9N_2 بر روی بافتهای نای جوجه‌های آلوده بهینه شد (۲۳). سپس با استفاده از نتایج به دست آمده از مطالعه اخیر واکنش تحت تیپ‌های H_5، H7، H9 و NP بر روی بافتهای نای آلوده انجام گردید. نمونه برداری از ۵۰ مورد مشکوک به آنفلوانزای فوق حاد ارسال شده از نقاط مختلف کشور در طی سالهای ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳ صورت گرفت.این دوره مصادف با وقوع آنفلوانزای فوق حاد در کشورهای آسیای جنوب شرقی و پاکستان بود. برای تمامی نمونه‌های ارسال شده انجام واکنش RT-PCR برای NP و تحت تیپ‌های H_5، H_7، H_9 صورت گرفت. این نمونه‌ها از ۱۲ استان کشور ارسال شده بودند که استان سیستان و بلوچستان بیشترین آمار ارسالی را به خود اختصاص داده بود (۱۶ مورد). با توجه به وجود مرز مشترک این استان با کشور پاکستان طبیعی به نظر می‌رسد که حساسیت بیشتری برای احتمال وقوع آنفلوانزی حاد باشد. استان‌های فارس، اردبیل و تهران با ارسال ۴ تا ۶ نمونه در شرایط آماری تقریباً یکسانی قرار داشتند. به نظر می‌رسد بدون احتساب استان سیستان و بلوچستان بیشترین ارسال نمونه از نواحی مرکزی ایران صورت گرفته است. ولی به طورکلی نمی توان الگوی مشخصی برای تعداد ارسال نمونه‌ها که مبتنی بر شاخص خاصی همچون تراکم مرغداری‌ها و یا میزان جمعیت پرندگان استان باشد در نظر گرفت. شاید سهولت در ارسال نمونه به علت بعد کم مسافت تا موسسه عامل مهمتری بوده است.

عدم اثبات وجود تحت تیپ‌های H_5 و H_7 آنفلوانزا در هیچیک از نمونه‌های بررسی شده بیانگر این مهم است که خوشبختانه تاکنون علیرغم وجود تلفات سنگین در برخی از مرغداریهای کشور صنعت طیور کشور ما بااین تحت تیپ‌ها مواجه نشده است.

با توجه به مجموع جوابهای مثبت به دست آمده توسط روش‌های بکار گرفته شده در ۴۴ درصد (۲۲ مورد) موارد بررسی شده ویروس آنفلوانزای H_9N_2 ردیابی شد. بدون احتساب ۸ مورد مرغهای بومی، کبوتر و پرندگان مهاجر از مجموع نمونه‌های بررسی شده می‌توان گفت ویروس آنفلوانزای پرندگان H_9N_2 در ۵۲ درصد موارد در مرگ و میرهای بالای پرندگان صنعتی ما شرکت داشته است. مشخص نیست کدام ویروس یا ویروس‌ها در ۴۸ درصد باقیمانده با تلفات بالا شرکت داشتند. واکنش RT-PCR برای NP در تمامی موارد واکنش مثبت RT-PCR برای H_9 نیز مثبت ارزیابی شد همچنین‌این واکنش در سه مورد توانست ردپای ویروس آنفلونزا را مشخص سازد درحالیکه واکنش‌های RT-PCR برای تحت تیپ‌های H_5، H_7، H_9 دراین موارد منفی بود. ازاین مطالعه نمی‌توان استنتاج نمود که کدام تحت تیپ ویروس آنفلوانزا دراین سه مورد حضور داشته است. به خصوص‌اینکه تلاش برای جداسازی ویروس بر روی تخم‌مرغهای SPF دراین موارد منفی بود. ولی به نظر می‌رسد چون حساسیت واکنش RT-PCR برای NP بیشتر از RT-PCR برای H_9 است به احتمال فراوان این سه مورد مربوط به حضور تحت تیپ H_9 بوده است که میزان RNA ویروسی در نمونه‌های بررسی شده بسیار کم بوده است. حساسیت بیشتر واکنش NP نسبت به H_9 مربوط به قابلیت سنجش میزان کمتر RNA ویروسی دراین روش است. حساسیت واکنش RT-PCR برای H_9 دراین مطالعه تا ۱۰ پیکوگرم RNA ویروسی ارزیابی شد در حالیکه Lee و همکاران حساسیت واکنش RT-PCR برای NP را بین ۱ تا۰/۱ پیکوگرم RNA ویروسی اعلام کردند (۸) به عبارتی دیگر حساسیت واکنشNP ۱۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر از واکنش H_9 می‌باشد. چنانچه احتمال فوق الذکر را صحیح پنداریم می‌توان اظهار داشت که ویروس H_9N_2 در ۵۰ درصد موارد بررسی شده و یا به عبارتی در ۶۰ درصد گله‌های پرندگان صنعتی بررسی شده حضور داشته است. به طورکلی از روش RT-PCR برای NP می‌توان برای نشان دادن حضور تحت تیپ‌های غیر معمول آنفلوانزا درمنطقه و نشان دادن ویروس آنفلوانزا در منطقه‌ای که قبلاً آنفلوانزا گزارش نشده استفاده کرد چون در مورد اخیراین تست مانند تست AGPT برای آنفلوانزا عمل می‌کند ولی با این تفاوت که‌این تست نسبت به AGPT بسیار حساس تر و سریع تر است.

اگر چه ویروس‌های H_9N_2 ایران جزو ویروس‌های non-HPAI تقسیم بندی شده اند ولی به نظر می‌رسد این ویروس‌ها نقش عمده‌ای را در تلفات گله‌های مبتلا به عهده داشته‌اند . همچنین وجود ۴۰ تا ۴۸ درصد گله‌های مبتلا با تلفات بالا به همراه عدم ردیابی ویروس‌های آنفلوانزا این تصور را تقویت می‌کند که آنچه در فیلد می‌گذرد بسیار پیچیده تر از آن چیزی است که بتوان تلفات بالا را به یک یا دو عامل نسبت داد. دراین میان بایستی به عوامل تضعیف کننده ایمنی و سایر عوامل ویروسی و باکتریایی بیماری‌های تنفسی توجه خاص نمود.

به طور کلی در روش جداسازی ویروس نیاز به ذرات ویروسی با قدرت عفونت زائی است. قدرت عفونت زائی و فعالیت ویروس حین جمع آوری، ذخیره نمونه و اجرای تست‌های آزمایشگاهی تحت شرایط غیرایده‌ال می‌تواند از بین برود. به عبارتی دراین روش توانائی ردیابی ویروس در نمونه‌های حاوی ویروس غیر فعال شده یا دز پائین واحد عفونی وجود ندارد.

www.SID.ir

Archive of SID

در صورتیکه در روش RT-PCR نیازی به وجود جرم عفونت زا نیست. اسید نوکلئیک ویروسی بدون توجه به زنده بودن یا نبودن ویروس تکثیر می‌شود. علاوه براین، در روش RT-PCR وجود مقادیر کم اسید نوکلئیک ویروسی در نمونه مرضی کافی است تا DNA ویروس به میزان کافی تکثیر شود (۱۲). از این رو به نظر می‌رسد که روش RT-PCR نسبت به روش جداسازی از حساسیت بالاتری برخودار باشد (۶،۷،۹،۱۵، ۲۰). اخیراً Cattoli و همکاران حساسیت بیشتر RT-PCR نسبت به روش جداسازی را در شرایط تجربی و فیلد برای ردیابی تحت تیپ H_7 در پرندگان را نشان داده اند. همچنین در روش جداسازی گاهی تا سه بار پاساژ ضرورت می‌یابد به طوریکه این روش را به روشی زمان برو وقت گیر تبدیل کرده است. در حالی که روش RT-PCR می‌تواند شناسائی ویروس در نمونه‌های بافتی را در یک روز کاری انجام دهد، بدون آنکه نیاز به تکثیر ویروس باشد (۷،۸،۱۰،۱۲،۱۴، ۱۵).این امر بخصوص در گله‌هائی که تحت قرنطینه هستند و بایستی سریعاً مشخص شوند که از حیث وجود یا عدم وجود عفونت در چه وضعیتی هستند بسیار بااهمیت می‌شود (۲). در روش جداسازی به علت پاساژ نمونه احتمال موتاسیون وجود دارد. در حالیکه، در روش RT-PCR ژنوم ویروس به طور مستقیم از نمونه تکثیر می‌شود و چنین احتمالی وجود ندارد (۱۵). همچنین باید به‌این مطلب نیز اشاره کرد که روش جداسازی در مقایسه با RT-PCR روش مناسبی برای تعیین عفونت در مراحل اولیه بیماری نیست همچنین در اپیدمی بیماری که بایستی تعداد بسیار زیادی نمونه کنترل شود مجدداً به نظر می‌رسد روش RT-PCR دارای مزیت عمده باشد (۲). به طور کلی حساسیت، ویژگی و سرعت بالا در روش RT-PCR نشانگر ارجحیت و کارآمد بودن‌این روش به عنوان یک روش جانشین شونده، جهت تشخیص سریع عفونت آنفلوانزا می‌باشد. با این همه اگرچه در بسیاری از موارد روش RT-PCR نسبت به روش جداسازی ارجحیت دارد ولی بدون وجود ویروس زنده نمی‌توان اطلاعات تکمیلی را به دست آورد. لذا پیشنهاد می‌شود در مراکز تشخیص اصلی کشوراین دو تست به صورت همزمان انجام گیرد. ولی در مراکز تشخیصی استانی که تهیه مستمر مواد لازم برای انجام روش جداسازی میسر نمی‌باشد روش RT-PCR پیشنهاد می‌شود. دراین حالت با انجام تست غربالگری مولکولی اولیه دراین آزمایشگاه‌ها فقط نمونه‌های کاملاً مشکوک به مرکز ارسال می‌شود.این امر باعث کاهش فشار کاری در آزمایشگاه‌های مرکزی و کاهش احتمال انتقال بیماری از نواحی مرزی به داخل کشور می‌شود. البته‌این امر در صورتی محقق خواهد شد که آزمایشات مولکولی دراین آزمایشگاه‌ها در حداقل اشکالات تکنیکی انجام گیرد.

پاورقی‌ها

1 – Orthomyxoviride

2- Hemagglutinin

3- Neuraminidase

4- Highly pathogenic avian influenza

منابع مورد استفاده

1- Capua, I and Alexander, D.J. 2004; Avian influenza : Recent developments. Avian pathology,33,4,393-404.

2- Cattoli, G., Drago,A., Maniero, S., Toffan, A., Bertoli, E., Fassina, S., Terregino, C., Vicenzoni, G and Capua, I., 2004 , Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. Avian Pathology, 33, 4, 432-437.

3- Davison, S, Ziegler , A.F. and Eckeoade , R,J., 1998; Comparison of an antigen – capture enzyme immunoassay with virus isolation for avian influenza from filed samples, Avian Diseases, 42, 791-279.

4- Dybkaer, K., Munch, M. Handberg K.J., and Jorgensen. P.H. , 2003; RT-PCR –ELISA as a tool for diagnosis of low pathogenicity avian influenza. Avian Diseases, 42.791-795.

5- Knipe David, M.,Howley, M Peter. 2001; Fields Virology., Fourth edition Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, U.S.A Chapter 46,47.

6- Fouchier, R,A.M,. Bestebroer , T.M. Herfst , S., van der Kemp, L. Rimmelzwaan , G. F. and Osterhaus , A.D.M.E., 2000; Detection of influenza a viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. Journal of Clincal Microbiology , 38, 4096-4101.

7- Horimoto,T., Kawaoka, Y., 1995; Direct reverse transcriptase PCR to determine virulence potential of influenza a viruses in birds. Journal of Clinical Microbiology,Vol.33,No.3,P.748-751.

8- Lee, M.S., Chang, P.C., Shien, J.H., Cheng, M.C and Shieh, H.K., 2001; Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription- PCR. Journal of Virological Methods, 97,13-22.

9- Liolios, L., Jenney,A., Spelman, D. Kotsimbos, T., Catton, M., and Wesselingh, S., 2001; Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. Journal of Clinical Microbiology, Vol 39, No.8 P.2779-2783.

10- Munch, M., Nielsen, L.P., Handberg, K.J. and Jorgensen, P.H., 2001; Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription – PCR and PCR –ELISA. Archives of virology, 146,87-97.

11- Poss, P.E. Avian influenza in the turkey industry, 1997; Proceeding of the fourth International Symposium of Avian Influenza. PP:335-341.

12- Pregliasco, F., Mensi, C., Camorali, L. and Anselmi, G., 1998 , Comparison of RT-PCR with other diagnostic assays for rapid detection of influenza viruses. Journal of Medical Virology. 56,168-173.

13- Pourbakhsh,S.A., Khodashenas, M., Kianizadeh, M. and Goodarzi, H., 2000; Isolation and identification of avian influenza

www.SID.ir

Archive of SID

virus H_9N_2 Subtype. Arch. Razi Ins.51, 27-38.

14- Rebelo-de-Andrade, H., Zambon,M.C., 2000; Different diagnostic methods for detection of influenza epidemics. Epidemiology Infect., 2000, 124,515-522.

15- Schorr, E., Wentworth, D., Hinshow, V.S., 1994; Use of polymerase chain reaction to detect swine influenza virus in nasal swab specimens. Am J Vet Res, vol 55,No.7,p.952-956.

16- Spackman.E., Senne, D,A., Myers , T.J., Bulaga L.L., Garaber L.P., Perdue M.L. Lohman K. Daum L.T. and Suarez. D.L., 2002; Development of a real – time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H_5 and H_7 hemagglutinin subtypes. Journal of Clinical Microbiology. 40, 3256-3260.

17- Spackman , E. Senne.D.A. Bulaga , L.L. Trock. S. and Suarez , D.L., 2003; Development of multiplex real – time RT-PCR as a diaganostic tool for avian influenza. Avian Diseaes 47,1087-1090.

18- Starick , E., Romer, Oberdorfer, A. and Werner , O., 2000; Type and sutype specific RT- PCR for avian influenza A viruses (AIV) Journal of veterinary Medicine B. 47, 295-301.

19- Starick , E. & Werner, O., 2003; Detection of H_7 avian influenza virus directly from poultry specimens. Avian Disesases ,47,1187-1189.

20- Steininger, C., Kundi, M., Aberle, S.W., Aberle, J.H. and Popow-Kraupp, T., 2002; Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 40, No.6,P.2051-2056.

21- Suarez, D.L., 1997; Molecular diaganostic techniques can we identify influenza viruses differentiate subtypes and determine pathogenicity potential of virus by RT-PCR ? In D.E. Swayne & R.D. Slemons (Eds), Proceedings of the 4th international symposium on Avian influenza (pp.313-317).Athens. Athens. GA,USA.

22- Swayne, D.E., Suarez, D.L., 2000; Highly pathogenic avian influenza. Review. Science. Office International Epizooties (OIE),19(2) , 463-482.

23- Tajmanesh, Sh., Toroghi, R., Momayez, R and Pourbakhshv, S.A., 2005; Rapid diagnosis of avian influenza virus (H9N2) infection in field cases by RT-PCR compared to virus isolation method (submitted)

24- Ziggers, D., 1999; Avian influenza in Iran : Unpredictable outbreak with serious losses. World Poultry – Elsevier. Vol.15.,No.4: 49-50.

www.SID.ir