

مقایسه RT-PCR با جداسازی ویروس در تشخیص ویروس‌های تحت تیپ H9 آنفلوآنزای طیور

حسن نوروزیان^۱ مهدی وصفی مرنندی^{۱*} مهدی رزازیان^۲

(۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۲) دامپزشک بخش خصوصی، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱ خرداد ماه ۱۳۸۵، پذیرش نهایی: ۱ آذر ماه ۱۳۸۶)

چکیده

تعداد ۲۲ نمونه بافتی از گله‌های طیور مبتلا به بیماری‌های تنفسی ارجاعی به آزمایشگاه ویروس شناسی بخش طیور دانشکده دامپزشکی طی سال‌های ۸۵-۱۳۸۳ گرفته شده و به منظور جداسازی ویروس آنفلوآنزای طیور بر طبق روش استاندارد به تخم مرغ‌های جنین دار ۹-۱۱ روزه تلقیح شدند. در آزمایش RT-PCR روی نمونه‌ها قسمتی از ژن هما گلو تینین H9 با قطعه‌ای به طول ۴۳۵bp با پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. نتایج نشان داد که آزمایش PCR-RT با آغازگرهای اختصاصی H9، قادر به شناسایی حداقل تیتراژ $10^{2.5}$ EID₅₀ از ویروس رفرانس آنفلوآنزای طیور (ZMT-101) است و حساسیت، ویژگی و میزان همبستگی RT-PCR در مقایسه با جداسازی ویروس‌های فیلد به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۹۴ درصد و ۹۵ درصد می‌باشد. با توجه به این نتایج، آزمایش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی H9 می‌تواند مستقیماً روی نمونه‌های بافتی برای تشخیص و تعیین تحت تیپ H9 ویروس آنفلوآنزای طیور به جای روش استاندارد جداسازی ویروس در آزمایشگاه‌های تشخیصی و تحقیقی طیور مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنفلوآنزای پرندگان، جداسازی ویروس، تحت تیپ H9N2، RT-PCR.

مقادیر قابل ردیابی می‌رسند، نمی‌توان از آنها برای تشخیص سریع اولیه بیماری آنفلوآنزا بهره برد (۱).

در مورد بیماری‌های تنفسی طیور از جمله آنفلوآنزا، تشخیص سریع بیماری در مراحل اولیه اهمیت بسیار زیادی دارد (۱۰). در طب انسانی هم با عرضه نسل جدید داروهای مهارکننده نورآمینیداز، تشخیص سریع بیماری در مراحل اولیه و شروع سریع دارو درمانی اهمیت بیشتری پیدا کرده است (۱۱، ۲).

مطالعات مختلف انجام گرفته بر روی نمونه‌های بالینی طیور یا انسان با استفاده از کیت‌های تشخیصی سریع آنفلوآنزا، نتایج متفاوت را نشان داده است (۲۹، ۱۹، ۵، ۴، ۲). در مجموع به نظر می‌رسد که حساسیت و ویژگی این کیت‌ها برای منفی‌های کاذب چندان مطلوب و قابل اعتماد نبوده به طوری که بر طبق بررسی‌های انجام شده در هیچ مطالعه‌ای این کیت‌ها به عنوان جایگزین روش استاندارد جداسازی مطرح نشده است. تنها حسن مهم این کیت‌ها سرعت در پاسخ‌گویی در فیلد می‌باشد.

روش RT-PCR آزمایش نسبتاً جدیدی است که برای تشخیص عوامل بیماری‌زای طیور در دامپزشکی به کار می‌رود. در مقایسه با روش استاندارد جداسازی، این روش سرعت عمل بیشتری دارد و ظرف مدت حداکثر یک روز پاسخ مشخص می‌شود. در روش جداسازی ویروس شرایط تهیه و حمل و نگهداری نمونه یا تماس با مواد ضد عفونی کننده (در مورد نمونه‌های اخذ شده از محیط) روی زنده ماندن ویروس و نتیجه آزمون اثر گذار است (۱)، اما در روش RT-PCR می‌توان از نمونه‌های ویروسی غیر فعال شده نیز، استفاده کرد (۹).

هدف از این مطالعه، طراحی روشی است که بتواند با حساسیت و ویژگی

مقدمه

ویروس‌های آنفلوآنزا متعلق به خانواده اورتومیکسوویروس‌ها است. سه تیپ A، B و C در بین ویروس‌های آنفلوآنزا شناسایی شده است که تیپ A در پرندگان، پستانداران و انسان ایجاد بیماری می‌کند. ویروس‌های تیپ A دارای ژنوم RNA، ۸ قطعه‌ای اند که هر یک کد کننده پروتئین‌های پلی مرز، هما گلو تینین، نوکلئوپروتئین، نورآمینیداز، ماتریکس و پروتئین‌های غیر ساختمانی اند. گلیکوپروتئین‌های هما گلو تینین (HA) و نورآمینیداز (NA) در سطح ویروس قرار دارند و نقش مهمی در پاتوژنز ویروس آنفلوآنزا دارند (۲۴، ۱۶).

تاکنون ۱۶ تحت تیپ HA و ۹ تحت تیپ NA شناخته شده‌اند (۲۴). بیماری آنفلوآنزای پرندگان ناشی از تحت تیپ H9N2 از سال ۱۳۷۷ در ایران گزارش شده است و خسارات فراوانی به صنعت مرغداری کشور وارد نموده است (۲۶، ۱۷).

جداسازی ویروس (VI) یکی از روش‌های تشخیص آنفلوآنزا است که به عنوان روش استاندارد طلایی تشخیص ویروس به کار می‌رود. این روش به علت کاروری ویروس زنده، برای بررسی عمیق و همه جانبه خصوصیات ویروس اهمیت زیادی دارد و از این جنبه هیچ تستی نمی‌تواند جایگزین آن شود (۱). اما در این روش حداقل ۵-۴ روز برای رسیدن به پاسخ نهایی، زمان لازم است (۸).

روش‌های سرم شناسی با توجه به هزینه اندک و سرعت عمل، در همه‌گیری‌ها و بررسی وضعیت گله‌های طیور از نظر آنفلوآنزا جایگاه مهمی دارند. اما با توجه به اینکه به طور معمول پادتن‌ها یک هفته پس از ابتلا، به



0.5µl (20 u) + template RNA 5 µl (1-5 µg) + DEPC water 5.5 µl, total vol.= 20µl.

توالی پرایمر 12- Uni: (5'-AGCAAAAGCAGG-3')
مخلوط فوق به مدت یکساعت در ۴۳ درجه سانتیگراد در گرمخانه نگهداری شد.

آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن H9 با توالی:

پرایمر Sense (5'-TTGCACCACAGAGACAAT-3')

پرایمر Anti-sense (5'-TGATGTATGCCCCACATGAA-3')

روی نمونه‌ها انجام شد (۱۸).

واکنش PCR بشرح زیر بهینه و انجام گردید:

cDNA 3µl + 10x PCR buffer 2.5µl + 50mMMgCl2 0.75µl (1.5 mM)
+ 10mM dNTPs 0.5µl + Sense & Antisense primers (each) 1 µl (10 pmol) + Taq DNA polymerase (CinnaGen) 0.25 µl (1.25 u) + DD H2O 16µl,
total vol.= 25µl.

برنامه حرارتی زیر با استفاده از ترموسایکلر Master gradient Eppendorf Com) Eppendorf انجام شد: دناتوراسیون اولیه (Initial denaturation) به مدت دو دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد، سپس ۴۰ سیکل شامل دناتوراسیون (Denaturation) به مدت یک دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد، اتصال پرایمر (Annealing) به مدت یک دقیقه در ۵۰ درجه سانتیگراد، گسترش (Extension) به مدت یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و در انتها، گسترش نهایی (Final extension) به مدت ده دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گردید.

تعیین حساسیت و ویژگی RT-PCR: در این مطالعه ویروس رفرانس A/Chicken/ZMT-101/98(H9N2) به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد. تیتراسیون ویروس بر اساس روش استاندارد انجام شد (۲۷). آزمایش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی H9 روی رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-9} و ویروس رفرانس انجام شد و حساسیت RT-PCR محاسبه گردید. برای تعیین ویژگی، آزمایش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی H9 روی مایعات آلتوتوئیک حاوی ویروس نیوکاسل (سویه La Sota) و برونشیت عفونی (سویه HI20) انجام شد.

نتایج

جداسازی ویروس: مایع آلتوتوئیک جنین‌های تلف شده در شرایط استریل برداشت شده و مورد آزمایش هم‌اگلوتیناسیون قرار می‌گرفت. هفت مورد از نمونه‌ها، از نظر هم‌اگلوتیناسیون مثبت بود. در آزمایش ممانعت از هم‌اگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصی نیوکاسل و آنفلوانزا تحت تیپ H9 انجام شد. در نهایت پنج نمونه از نظر آنفلوانزا مثبت تشخیص داده شد. نمونه‌هایی که در پاساژ دوم تلقیح شدند، همگی از نظر آنفلوانزا منفی بودند

مطلوب، تحت تیپ H9 آنفلوانزای پزندگان را به سرعت و در مراحل اولیه بیماری و با استفاده از نمونه‌های بافتی معمول تشخیص دهد و در تشخیص تفریقی بیماری‌های تنفسی عفونی طیور مثل نیوکاسل، لارینگو تراکئیت عفونی، برونشیت عفونی، CRD و سایر تحت تیپ‌های آنفلوانزا مفید باشد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه و جداسازی ویروس: از تعداد ۲۲ نمونه بافتی (شامل نای، ریه و روده) بدست آمده از گله‌های مشکوک به آنفلوانزا که طی سالهای ۸۵-۱۳۸۳ به آزمایشگاه ویروس‌شناسی بخش طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارجاع شده بود، هموزن تهیه و طبق دستورالعمل (۲۰) Senne به تخم مرغ‌های جنین دار ۹-۱۱ روزه تهیه شده از یک فارم مرغ مادر گوستی عاری از میکرو پلاسما تلقیح شد. تخم مرغ‌ها به مدت ۶-۷ روز در دمای ۳۷/۵ درجه سانتیگراد نگهداری و هر روز یک بار تحت نوربینی قرار می‌گرفتند. تخم مرغ‌هایی که جنین آنها تلف شده بود، جمع‌آوری و در یخچال نگهداری می‌شد. پس از پایان روز هفتم بعد از تلقیح، همه تخم مرغ‌ها به یخچال منتقل و پس از ۲۴ ساعت، مایع آلتوتوئیک همه تخم مرغ‌ها استخراج تا آزمایش هم‌اگلوتیناسیون روی آنها انجام شود.

آزمایش هم‌اگلوتیناسیون و ممانعت از هم‌اگلوتیناسیون: آزمایش هم‌اگلوتیناسیون و ممانعت از هم‌اگلوتیناسیون بر اساس دستورالعمل OIE انجام گردید (۱۴). در صورت مثبت بودن هم‌اگلوتیناسیون، آزمایش ممانعت از هم‌اگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصی نیوکاسل و آنفلوانزا تحت تیپ H9 انجام شد. آن تعداد از مایعات آلتوتوئیک که از نظر آنفلوانزا منفی شدند، جهت اطمینان از منفی بودن آنها، مجدداً در پاساژ دوم به تخم مرغ‌های جنین دار تلقیح شدند.

استخراج RNA ویروس: استخراج RNA ویروس از هموزن بافتی با استفاده از محلول استخراج RNA به نام RNXTM-Plus (شرکت CinnaGen) انجام شد. به طور خلاصه، به $200\mu\text{l}$ از هموزن‌های بافتی را به 1ml از RNXTM-Plus افزوده و پس از تکان دادن، $200\mu\text{l}$ از محلول کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) اضافه و سپس در 10°C به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. فاز آبی (بالایی) به میکروتیوب دیگری منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه و در ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری و در 10°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب با اتانل ۷۰ درصد شستشو و خشک گردید. در نهایت، رسوب را در آب مقطر حاوی DEPC (Diethylpyrocarbonate) حل نموده و در ۷۰-درجه سانتیگراد نگهداری یا بلافاصله برای واکنش RT استفاده می‌شد.

آزمایش RT-PCR: آزمایش رونوشت برداری معکوس (RT) به شرح زیر بهینه و انجام گردید:

5xRT buffer 4µl + 10mM dNTPs 2µl + Uni- 12 primer 2µl (20 pmol)
+
M-MVLV RT (Fermentas) 1µl (200u) + RNase inhibitor (CinnaGen)



جدول ۲- حساسیت و ویژگی روش RT-PCR در مقایسه با روش جداسازی (به عنوان روش استاندارد).

| کل نمونه های RT-PCR | روش جداسازی | | روش RT-PCR مثبت |
|---------------------|-------------|------|----------------------|
| | منفی | مثبت | |
| ۶ | ۱ | ۵ | روش RT-PCR مثبت |
| ۱۶ | ۱۶ | - | روش RT-PCR منفی |
| ۲۲ | ۱۷ | ۵ | کل نمونه های جداسازی |

مثبت و با جداسازی ویروس منفی شد. البته پزندگانی که این ۹ نمونه از آنها گرفته شده بود، از نظر سرولوژی مثبت بودند. بر پایه محاسبات آماری، حساسیت و ویژگی روش RT-PCR و میزان همبستگی دو روش به ترتیب ۸۵ درصد، ۶۱ درصد و ۶۹ درصد بوده است که چندان مطلوب نمی باشد. در این مطالعه و برخی مطالعات دیگر روش های HA و RT-PCR در تشخیص حضور ویروس در رقت های مختلف مایع آلتوتوئیک مقایسه شدند. ثابت شده است که روش RT-PCR از HA در تشخیص NDV در مایع آلتوتوئیک حساستر است (۹،۲۱). به این ترتیب ممکن است در نمونه هایی که نتیجه RT-PCR مثبت و جداسازی منفی گزارش شده، ویروس در مایع آلتوتوئیک حضور داشته باشد ولی تیتراژ آن کمتر از حداقل مقدار قابل تشخیص در HA باشد.

Gohm و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که روش RT-PCR قادر به تشخیص NDV در پرند های مبتلا از یک روزگی تا ۲۸ روزگی در نمونه های بافتی اندام های مختلف می باشد (۹). مطالعه Bell و Moloudi در سال ۱۹۸۸ نشان داد که افزایش سطح آنتی بادی در خون، هر چه که از آغاز عفونت بگذرد، حساسیت روش جداسازی را برای تشخیص ویروس نیوکاسل کم می کند، ولی بر حساسیت RT-PCR کمتر اثر منفی می گذارد (۳). Handberg و همکاران در سال ۱۹۹۹ روش های RT-PCR و ایمنوهیستوشیمی (IHC) را روی نای جوجه های تلقیح شده با ویروس برونشیت عفونی تا ۳ روز بعد از آلودگی، مقایسه کردند. نتایج نشان داد که ۸۲ درصد نمونه ها در آزمایش RT-PCR و ۶۰ درصد نمونه ها در آزمایش IHC مثبت بودند و همبستگی خوبی بین داده های این دو روش وجود داشت. البته حساسیت RT-PCR در مورد سویه های مختلف IBV، از ۶۷ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود که احتمالاً ناشی از تفاوت سویه ها در تمایل به بافت نای و توانایی تکثیر آنها در بافت نای بوده است (۱۰).

نتایج مطالعه مقایسه ای روش های RT-PCR و جداسازی ویروس آنفلوانزای پرندگان روی نمونه های فیلد، به وسیله Cattoli و همکاران در سال ۲۰۰۴، حاکی از همبستگی خوبی بین نتایج این دو آزمون و حساسیت بیشتر RT-PCR بود. این محققان نشان دادند که روش جداسازی ویروس از ۱۰-۳ روز بعد از آلودگی و روش RT-PCR از ۱۲-۳ روز بعد از آلودگی قادر است ویروس را در نمونه ها تشخیص دهد (۴).

در مطالعه Atmar و همکاران در سال ۱۹۹۶، روش RT-PCR و کیت های تجاری مختلف تشخیص سریع آنفلوانزا در مقایسه با روش جداسازی

جدول ۱- نتایج آزمایشات جداسازی و RT-PCR (فقط نمونه های مثبت آورده شده است).

| نمونه شماره | تاریخ جداسازی | جداسازی HI | | | RT-PCR |
|---------------------------|---------------|------------|--------|---------|---------|
| | | AIV | NDV | HA | |
| ۲ | ۱۳۸۳ | + | - | + | + |
| ۶ | ۱۳۸۴ | + | - | + | + |
| ۹ | ۱۳۸۴ | - | + | + | - |
| ۱۱ | ۱۳۸۴ | + | - | + | + |
| ۱۳ | ۱۳۸۴ | + | - | + | + |
| ۱۶ | ۱۳۸۴ | + | - | + | + |
| ۱۹ | ۱۳۸۵ | - | + | + | - |
| ۲۰ | ۱۳۸۵ | - | - | - | + |
| فراوانی مشاهده شده (درصد) | - | ۵ (۲۳٪) | ۲ (۹٪) | ۷ (۳۲٪) | ۶ (۲۷٪) |

(جدول ۱).

RT-PCR: قسمتی از ژن همگلوکوتینین به طول ۴۳۵bp با پرایمرهای اختصاصی در PCR دیگری تکثیر شد. از ۲۲ نمونه بررسی شده، ۶ نمونه مثبت با باندهای قوی مشاهده شد (تصویر ۱).

تعیین حساسیت و ویژگی RT-PCR: ارزیابی حساسیت در این مطالعه نشان داد که آزمایش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی H9، قادر به شناسایی حداقل تیتراژ $10^{3.5}$ EID₅₀ از ویروس رفانس آنفلوانزای طیور (سویه ZMT-101) است. آزمایش RT-PCR با استفاده از مایعات آلتوتوئیک حاوی ویروس نیوکاسل و برونشیت عفونی طیور منفی بود.

محاسبه حساسیت، ویژگی و میزان همبستگی روش RT-PCR در مقایسه با روش جداسازی ویروس (به عنوان روش استاندارد): از تعداد ۲۲ نمونه بررسی شده، ۵ نمونه در هر دو روش جداسازی و RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن HA مثبت شد. تعداد ۱۶ نمونه در هر دو روش منفی شد و یک نمونه در RT-PCR مثبت و در جداسازی منفی شد. هیچ یک از موارد منفی شده در RT-PCR، در جداسازی مثبت نشد. بر پایه آزمون مجذور کای (χ^2)، حساسیت (Sensitivity) و ویژگی (Specificity) نسبی RT-PCR در مقایسه با جداسازی به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۴ درصد محاسبه شد. میزان همبستگی (Correlation Rate) نتایج دو روش ۹۵ درصد بدست آمد (جدول ۲).

بحث

مطالعات متعددی درباره مقایسه روش PCR، کشت و جداسازی ویروس و دیگر روش های تشخیص ویروس های تنفسی طیور از جمله آنفلوانزا انجام شده است. Gohm و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مطالعه خود تشخیص حضور ویروس نیوکاسل را در بافت های مختلف با روش های RT-PCR و کشت در تخم مرغ های جنین دار را بررسی کردند. از ۳۶ نمونه بررسی شده، ۲۰ نمونه با روش RT-PCR و ۱۳ نمونه با جداسازی ویروس مثبت شد. ۲ نمونه با جداسازی ویروس مثبت و با RT-PCR منفی و ۹ نمونه با RT-PCR



باشد. منجر به پاسخ منفی کاذب می‌شود. از این رو باید پرایمرها بر اساس محل‌های بدون تغییر یا کم تغییر طراحی شوند (۱۰، ۱۵). البته در مطالعه دیگری کارایی پرایمرهای اختصاصی H9 در تشخیص جدایه‌های انسانی، خوکی و مرغی و اختصاصی بودن آنها برای تحت تیپ H9 (ویژگی آزمایش RT-PCR)، با موفقیت بررسی شده است (۱۸).

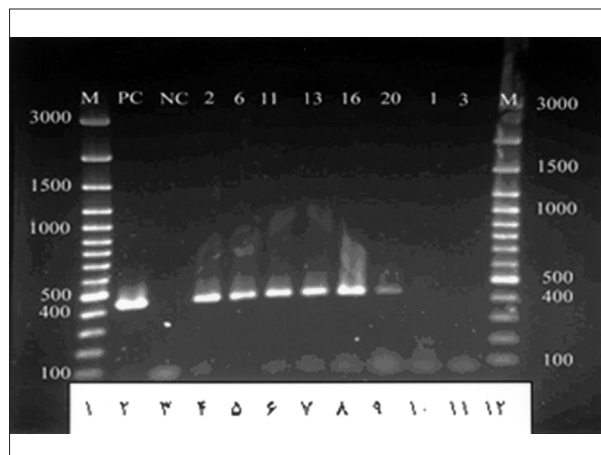
در مطالعه حاضر، روش جداسازی، ۲۳ درصد و RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن HA، ۲۷ درصد از نمونه‌ها را مثبت نشان داد. با محاسبات آماری، حساسیت نسبی RT-PCR در مقایسه با روش جداسازی، ۱۰۰ درصد و ویژگی آن ۹۴ درصد بدست آمد که نتایج بسیار مطلوب و درخور توجه است. به علاوه میزان همبستگی نتایج دوروش ۹۵ درصد برآورد شد که نتیجه بسیار مطلوبی است. علت کمتر بودن ویژگی روش RT-PCR در این مطالعه، این است که در واقع تنها نمونه مثبت شده در روش RT-PCR و منفی شده در روش جداسازی، در بررسی آماری، به عنوان مثبت کاذب تلقی شده است. در حالی که، اگر باروش‌های تکمیلی نظیر تعیین سکانس حضور ژن H9 و ویروس در محصول PCR اثبات شود ویژگی روش RT-PCR هم ۱۰۰ درصد خواهد بود. با توجه به ۳ بار تکرار انجام گرفته جهت جداسازی ویروس از نمونه هموژن بافتی اولیه و عدم موفقیت در آن، به نظر می‌آید قطعه ژن H9 تکرار یافته در آزمایش RT-PCR مربوط به ویروس غیر فعال شده باشد. با در نظر گرفتن توانایی آزمایش RT-PCR در تکثیر ژن‌های ویروس‌های کشته شده، نتایج بدست آمده دوروش انتظار نمی‌باشد.

البته عوامل دیگری نظیر کیفیت استخراج RNA (۲۱)، عدم استفاده از تمام RNA یا cDNA در مرحله بعدی RT-PCR (۲۱) و حضور مواد ممانعت کننده غیر اختصاصی PCR در نمونه‌های بالینی مثل نای، کلیه یا مدفوع (۶)، موجب کاهش حساسیت RT-PCR می‌شود. به علاوه، در مطالعات مقایسه‌ای، گاهی نمونه‌ها برای یکی از روش‌ها به طرز خاصی گرفته یا آماده می‌شود و این موضوع می‌تواند روی حساسیت دیگر روش‌ها اثر منفی بگذارد (۲).

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که آزمایش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی H9 روشی قابل اعتماد برای جایگزینی با جداسازی ویروس در تشخیص و تعیین تحت تیپ آنفلوآنزای طیور تحت تیپ H9 می‌باشد و می‌توان از آن به عنوان یک روش تشخیصی نسبتاً سریع در آزمایشگاه‌های تشخیص دامپزشکی و در مطالعات اپیدمیولوژی و غربالگری استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشکده جهت تأمین مالی پروژه مصوب شورای پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.



تصویر ۱- نتایج آزمایش RT-PCR نمونه‌ها در ژل آگارز ۰.۵ درصد - ستون ۴ تا ۹ شامل نمونه‌های مثبت که دارای باند DNA به اندازه ۴۳۵bp هستند. ستون ۱۰ و ۱۱ شامل دو نمونه منفی، ستون ۲ نمونه کنترل مثبت سویه رفرانس ایران (A/Ck/Iran/ZMT-101/98)، ستون ۳ نمونه کنترل منفی (آب دیونیزه)، ستون ۱۲ و ۱۱ مارکر DNA (100bp) می‌باشد.

ویروس در نمونه‌های بالینی گرفته شده از کودکان مبتلا به بیماری حاد تنفسی مقایسه شد. به طور متوسط، حساسیت روش RT-PCR، ۹۵ درصد و حساسیت کیت‌های تجاری مختلف بین ۷۵-۴۰ درصد بود. ویژگی PCR-RT و کیت‌های تجاری هم به ترتیب ۹۸ درصد و ۱۰۰-۸۸ درصد گزارش شد. نتایج این مطالعه نشان داد که RT-PCR کارایی بیشتری در مقایسه با بهترین کیت تجاری موجود (Becton Dickson Directigen Flu-A) دارد (۲).

در آزمایش Nested/multiplex RT-PCR تعیین همزمان تیپ و تحت تیپ ویروس آنفلوآنزا یا تشخیص همزمان چند نوع ویروس در یک نمونه با پرایمر اختصاصی ممکن است. Hermann و همکاران در سال ۲۰۰۱ یک آزمایش Nested/multiplex RT-PCR بر مبنای ژن هم‌گلو تینین آنفلوآنزا، برای بررسی نمونه‌های بالینی، طراحی کردند که قادر به تشخیص ۹۵/۴-۹۲/۹ درصد از ویروس‌های آنفلوآنزا جدا شده در کشت سلول بود (۱۱). مقایسه نتایج این مطالعه با RT-PCR Nested/multiplex طراحی شده دیگری (۱۳) که آن هم قسمتی از ژن هم‌گلو تینین را تکثیر می‌کرد، نشان داد که RT-PCR طراحی شده به وسیله Hermann حساس تر است ولی حساسیت یک آزمایش RT-PCR دیگر که بر مبنای ژن ماتریکس طراحی شده بود (۲۸)، بیشتر بود. این نتایج نشان می‌دهد که ژن هدف و طول قطعه تکثیر شده در حساسیت PCR نقش دارد.

مطالعات دیگری هم انجام شده است که نشان می‌دهد روش RT-PCR از جداسازی ویروس حساس تر است. در مطالعه Layne و Taubenberger در سال ۲۰۰۱، ۴۲/۲ درصد از نمونه‌های تنفسی مورد بررسی در روش RT-PCR و ۳۰/۹ درصد در روش کشت سلول مثبت شدند (۲۵). در یک مطالعه دیگر، آزمایش RT-PCR، ۹۳ درصد، کشت سلول، ۸۰ درصد و ELISA، ۶۲ درصد موارد را از نظر آنفلوآنزا مثبت تشخیص داد (۲۲). مهم‌ترین چالش RT-PCR در مورد آنفلوآنزا، تغییرات مکرر ژنتیکی بخصوص در ژن‌های گلیکوپروتئین‌های سطحی HA و NA است که اگر در محل چسبیدن پرایمر



References

- Allwinn, R., Preiser, W., Rabenau, H., Burbaum, S., Sturmer, M. and Doerr, H.W. (2002) Laboratory diagnosis of Influenza - virology or serology? *Med. Microbiol. Immunol.* 191: 157-160.
- Atmar, R.L., Baxter, B.D., Dominguez, E.A., Taber, L.H. (1996) Comparison of reverse transcription-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A Influenza virus. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2604-2606.
- Bell, J.G., Mouloudi, S. (1988) A reservoir of virulent Newcastle disease virus in village chicken flocks. *Prev. Vet. Med.* 6: 37-42.
- Cattoli, G., Drago, A., Maniero, S., Toffan, A., Bertoli, E., Fassina, S., Terregino, C., Robbi, C., Vicenzoni, G., Cappua, I. (2004) Comparison of three rapid detection systems for type A Influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathol.* 33: 432-437.
- Davison, S., Ziegler, A.F., Eckroade, R.J. (1998) Comparison of an antigen-capture enzyme immunoassay with virus isolation for avian Influenza from field samples. *Avian Dis.* 47: 791-795.
- De witt, J.J. (2000) Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 29:71-93.
- Fan, J., Hendrickson, K.J., Savatski, L.L. (1998) Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and B, Influenza viruses A and B and human parainfluenza virus types 1,2 and 3 by multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridization assay (Hexaplex). *Clin. Infect. Dis.* 26:1398-1402.
- Gavin, P.J., Thomson, R.B. (2003) Review of rapid Diagnostic tests for Influenza. *Clin. Appl. Immunol. Rev.* 4: 151-172.
- Gohm, D.S., Thur, B., Hofmann, M.A. (2000) Detection of Newcastle disease virus in organs and feces of experimentally infected chickens using RT-PCR. *Avian Pathol.* 29:143-152.
- Handberg, K.J., Nielsen, O.L., Pedersen, M.W. and Jorgensen P.H. (1999) Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. *Avian Pathol.* 28:327-335.
- Hermann, B., Larsson, C., Zwegberg, B.W. (2001) Simultaneous detection and typing of Influenza A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J. Clin. Microbiol.* 39: 134-138.
- Liu, J., Okazaki, K., Shi, W., Wu, Q., Mween, A.S. and Kida, H. (2003) Phylogenetic analysis of neuraminidase gene of H9N2 Influenza viruses prevalent in chickens in China during 1995-2002. *Virus Genes.* 27:197-202.
- Magnard, C., valette, M., Aymard, M., Lina, B. (1999) Comparison of two nested PCR, cell culture and antigen detection for the diagnosis of upper respiratory tract infections due to influenza viruses. *J. Med. Virol.* 59:215-220.
- Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, part 2, section 2.7, chapter 2.7.12, avian Influenza, www.oie.net.
- Munch, M., Nielsen, L.P., Handberg, K.J., Jorgensen, P.H. (2001) Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch. Virol.* 146:87-97.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. and Studdert M.J. (1999) *Veterinary virology*, 3rd Ed., Academic Press, California, USA.
- Nili, H., Asasi, K. (2003) Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. *Avian Diseases* 47: 828-31.
- Peiris, M., Yam, W.C., Chan, K.H., Ghose, P., Shortridge K.F. (1999) Influenza A H9N2: aspects of laboratory diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 37:3426-3427.
- Ryan-Poirier, K., Katz, J.M., Webster, R.G., Kawaoka, Y. (1992) Application of directigen FLU-A for the detection of influenza A virus in human and nonhuman specimens. *J. Clin. Microbiol.* 30:1072-1075.
- Senne, D.A. (1998) Virus propagation in embryonating eggs. In isolation and identification of avian pathogens. Edited by DE Swayne, JR Glisson, MW Jackwood, JE Pearson and WM Reed. 4th Ed. American Association of Avian Pathologists,



- University of Pennsylvania, USA, pp. 235-240.
21. Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, k., Daum, L.T. and Suarez D.L. (2002) Development of a real time reverse transcription PCR assay for type A Influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 40:3256-3260.
 22. Steininger, C., Kundi, M., Aberle, S.W., Aberle, J.H. and Popw-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. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2051-2056.
 23. Stockton, J., Ellis, J.S., Saville, M., Clewely, J.P. and Zambon, M.C. (1998) Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J. Clin. Microbiol.* 36:2990-2995.
 24. Swayne, D.E., Halvorson, D.A. (2003) Influenza, In *Diseases of poultry*. Edited by YM Saif, HJ Barnes, JR Glisson AM Fadly, LR McDougald and DE Swayne, 11th Ed. American Association of Avian Pathologists, Iowa State University Press, Iowa, USA, pp. 135-160.
 25. Taubenberger, J.K., Layne, S.P. (2001) Diagnosis of Influenza Virus: coming to grips with the molecular era. *Mol. Diagn.* 6: 201-205.
 26. Vasfi Marandi, M., Bozorgmehri Fard, M.H. (2002) Isolation of H9N2 subtype of avian influenza viruses during an outbreak in chickens in Iran. *Iranian Biom. J.* 6: 13-17.
 27. Villegas, P. (1998) Titration of biological suspensions, In *Isolation and identification of avian pathogens* Edited by DE Swayne, JR Glisson, MW Jackwood, JE Pearson and WM Reed. 4th Ed. American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, USA, pp. 235-240.
 28. Wallace, L.A., McAulay, K.A., Douglas, J.D., Elder, A.G., Stott, D.J. and Carman, W.F. (1999) Influenza diagnosis: from dark isolation into the molecular light. *West of Scotland Respiratory Virus Study Group J. Infect.* 39: 221-226.
 29. Woolcock, P.R., Cardona, C.J. (2005) Commercial immunoassay kits for the detection of Influenza virus type A: evaluation of their use with poultry. *Avian Dis.* 49: 477-481.



COMPARISON BETWEEN RT-PCR AND VIRAL ISOLATION FOR DETECTION OF H9 SUBTYPE OF AVIAN INFLUENZA VIRUSES

Noroozian, H.¹, Vasfi Marandi, M.^{1*}, Razazian, M.²

¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

²Private Practitioner, Tehran-Iran.

(Received 21 May 2006 , Accepted 21 November 2007)

Abstract:

During 2004-2006, a total number of 22 tissue samples obtained from poultry flocks suspected to respiratory diseases submitted to avian virology laboratory of faculty of veterinary medicine, were prepared for avian influenza virus (AIV) isolation in embryonated chicken eggs, according to the standard method. RT-PCR was established on tissue samples using specific primers for H9 gene. Amplified PCR products were 435 bp in length. Analytical sensitivity of the RT-PCR was $10^{3.5}$ EID₅₀ and sensitivity, specificity and correlation rate compared with virus isolation, were 100%, 94% and 95%, respectively. The results showed that the RT-PCR assay using H9 gene specific primers, directly on tissue samples, could be used in rapid detection and subtyping of H9 AIVs as a useful alternative to virus isolation assay.

Key words: Avian Influenza virus, H9N2 subtype, RT-PCR, virus culture.

*Corresponding author's email: mvmarand@ut.ac.ir, Tel: 021-66923510, Fax: 021-66933222

