مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۷، دوره ۶۳، شماره ۱، ۲۲-۱۷

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

حسن نوروزیان[۱] مهدی وصفی مرندی[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 ویروس‌شناسی بخش طیور دانشکده دامپزشکی طی سال‌های ۸۵-۱۳۸۳ گرفته شده و به منظور جداسازی ویروس آنفلوانزا ی طیور بر طبق روش استاندارد به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار ۱۱-۹ روزه تلقیح شدند. در آزمایش RT-PCR روی نمونه‌ها قسمتی از ژن هماگلوتینین H9 با قطعه‌ای به طول ۴۳۵bp با پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. نتایج نشان داد که آزمایش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی H9، قادر به شناسایی حداقل تیتر $10^{3.5}EID_{50}$ از ویروس رفرانس آنفلوآنزای طیور (ZMT-101) است و حسّاسیت، ویژگی و میزان همبستگی RT-PCR در مقایسه با جداسازی ویروسی برای 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 مستقیما 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: آنفلوانزای پرندگان، جداسازی ویروس، تحت تیپ H9N2، RT-PCR.

مقدمه

ویروس‌های آنفلوانزا متعلق به خانواده اورتومیکسوویریده‌اند. سه تیپ A، B و C در بین ویروس‌های آنفلوانزا شناسایی شده است که تیپ A در پرندگان، پستانداران و انسان ایجاد بیماری می‌کند. ویروس‌های تیپ A دارای ژنوم RNA، ۸ قطعه‌ای‌اند که هریک کد کننده پروتئین‌های پلی مراز، هماگلوتینین، نوکلئوپروتئین، نورآمینیداز، ماتریکس و پروتئین‌های غیر ساختمانی‌اند. گلیکوپروتئین‌های هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) در سطح ویروس قرار دارند و نقش مهمی در پاتوژنز ویروس آنفلوانزا دارند (۱۶،۲۴).

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

جدا سازی ویروس (VI) یکی از روش‌های تشخیص آنفلوانزا است که به‌عنوان روش استاندارد طلایی تشخیص ویروس به‌کار می‌رود. این روش به‌علت کار روی 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 باتوجه به هزینه اندک و سرعت عمل، در همه‌گیری‌ها و بررسی وضعیت گله‌های طیور از نظر آنفلوانزا جایگاه مهمی دارند. اما با توجه به اینکه به طور معمول پادتن‌ها یک هفته پس از ابتلا، به مقادیر قابل ردیابی می‌رسند، نمی‌توان از آنها برای تشخیص سریع اولیه بیماری آنفلوانزا بهره برد (۱).

درمورد بیماری‌های تنفسی طیور از جمله آنفلوانزا، 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 (۲،۱۱).

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

روش RT-PCR آزمایش نسبتاً جدیدی است که برای تشخیص عوامل بیماری‌زای طیور در دامپزشکی به‌کار 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 ضدعفونی کننده (در مورد نمونه‌های اخذ شده از محیط) روی زنده مانی 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

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۹۲۳۵۱۰-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email:mvmarand@ut.ac.ir

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، لارینگوتراکئیت عفونی، برونشیت عفونی، CRD و سایر تحت تیپ‌های آنفلوانزا مفید باشد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه وجداسازی 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، هموژن تهیه و طبق دستورالعمل (۲۰) Senne به تخم‌مرغ‌های جنین‌دار ۱۱-۹ روزه تهیه شده از یک فارم مرغ مادر گوشتی عاری از مایکو پلاسما تلقیح شد. تخم‌مرغ‌ها به مدت ۷-۶ روز در دمای ۳۷/۵ درجه سانتیگراد نگهداری و هر روز یک بار تحت نوربینی قرار می‌گرفتند. تخم‌مرغ‌هایی 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، مایع‌آلانتوئیک همه تخم‌مرغ‌ها استخراج تا آزمایش هماگلوتیناسیون روی آنها انجام شود.

آزمایش هماگلوتیناسیون و ممانعت از هماگلوتیناسیون: آزمایش هماگلوتیناسیون و ممانعت از هماگلوتیناسیون بر اساس دستور العمل 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 آلانتوئیک که از نظر آنفلوانزا منفی شدند، جهت اطمینان از منفی بودن آنها، مجددا در پاساژ دوم به تخم مرغ‌های جنین‌دار تلقیح شدند.

استخراج RNA ویروس: استخراج RNA ویروس از هموژن بافتی با استفاده از محلول استخراج RNA به نام RNX^{TM}-Plus (شرکت CinnaGen) انجام شد. به طور خلاصه، ۲۰۰µl از هموژن‌های بافتی را به ۱ml از RNX^{TM}-Plus افزوده و پس از تکان دادن، ۲۰۰µl از محلول کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) اضافه و سپس در ۱۰/۰۰۰×g 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 ۱۰/۰۰۰×g 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 buffer4µl + 10mM dNTPs 2µl + Uni- 12 primer 2µl(20 pmol)
+
M-MVLVRT (Fermentas) 1µl (200u) + RNase inhibitor (CinnaGen) 0.5µl (20 u) + template RNA 5 µl (1-5 µg) + DEPC water 5.5 µl , total vol.= 20µl.

توالی پرایمر Uni- 12: (5'-AGCAAAAGCAGG-3')

مخلوط فوق به مدت یکساعت در ۴۳درجه سانتیگراد در گرمخانه نگهداری شد.

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

پرایمر Sense (5'-TTGCACCACACAGAGCACAAT-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 + 50mM MgCl2 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 ۹۵درجه سانتیگراد، سپس ۴۰ سیکل شامل دناتوراسیون (Denaturation) به مدت یک دقیقه در ۹۵درجه سانتیگراد، اتصال پرایمر (Annealing) به مدت یک دقیقه در ۵۰درجه 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} ویروس رفرانس انجام شد و حساسیت RT-PCR محاسبه گردید. برای تعیین ویژگی، آزمایش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی H9 روی مایعات آلانتوئیک حاوی ویروس نیوکاسل (سویه La Sota) و برونشیت عفونی (سویه H120) انجام شد.

نتایج

جداسازی ویروس: مایع آلانتوئیک 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

جدول۱- نتایج آزمایشات جداسازی و RT-PCR (فقط نمونه‌های مثبت آورده شده است).

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

(جدول۱).

RT-PCR: قسمتی از ژن هماگلوتینین به طول ۴۳۵bp با پرایمرهای اختصاصی در PCR دیگری تکثیر شد. از ۲۲ نمونه بررسی شده، ۶ نمونه مثبت با باندهای قوی مشاهده شد (تصویر۱).

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 تیتر $10^{3.5}EID_{50}$ از ویروس رفرانس آنفلوآنزای طیور (سویه ZMT-101) است. آزمایش RT-PCR با استفاده از مایعات آلانتوئیک حاوی ویروس نیوکاسل و برونشیت عفونی طیور منفی بود.

محاسبه حساسیت، ویژگی و میزان همبستگی روش RT-PCR در مقایسه با روش جداسازی ویروس (به‌عنوان 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 ($\chi 2$)، 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 روش‌های تشخیص ویروس‌های تنفسی طیور از جمله آنفلوانزا انجام شده است. Gohm و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مطالعه خود تشخیص حضور ویروس نیوکاسل را در بافت‌های مختلف با روش‌های RT-PCR و کشت در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار 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

جدول۲- حساسیت و ویژگی روش RT-PCR در مقایسه با روش جداسازی (به عنوان روش استاندارد).

	روش جداسازی مثبت	روش جداسازی منفی	کل نمونه‌های RT-PCR
روش RT-PCR- مثبت	۵	۱	۶
روش RT-PCR- منفی	-	۱۶	۱۶
کل نمونه‌های جداسازی	۵	۱۷	۲۲

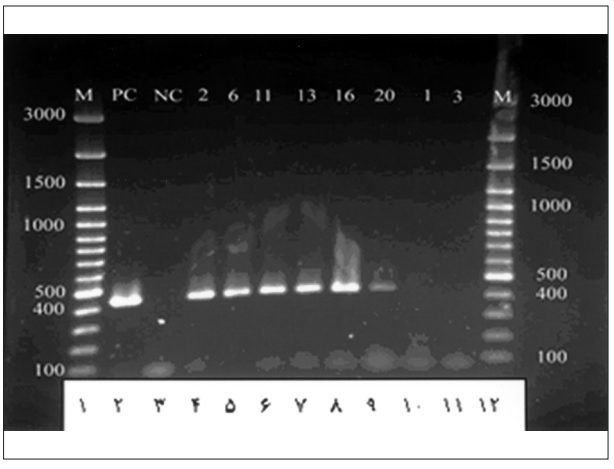
مثبت و با جداسازی ویروس منفی شد. البته پرندگانی که این ۹ نمونه از آنها گرفته شده بود، از نظر سرولوژی مثبت بودند. بر پایه محاسبات آماری، حساسیت و ویژگی روش RT-PCR و میزان همبستگی دو روش به ترتیب ۸۵ درصد، ۶۱ درصد و ۶۹ درصد بوده است که چندان مطلوب نمی‌باشد. در این مطالعه و برخی مطالعات دیگر روش‌های HA و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

Gohm و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که روش RT-PCR قادر به تشخیص NDV در پرنده‌های مبتلا از یک روزگی تا ۲۸ روزگی در نمونه‌های بافتی اندام‌های مختلف می‌باشد(۹). مطالعه Bell و Moloudi در سال ۱۹۸۸ نشان داد که افزایش سطح آنتی‌بادی در خون، هر چه که از آغاز عفونت بگذرد، حساسیت روش جداسازی را برای تشخیص ویروس نیوکاسل کم می‌کند، ولی بر حساسیت RT-PCR کمتر اثر منفی می‌گذارد(۳).

Handberg و همکاران در سال ۱۹۹۹ روش‌های RT-PCR و ایمنوهیستوشیمی (IHC) را روی نای جوجه‌های تلقیح شده با ویروس برونشیت عفونی تا ۳ روز بعد از آلودگی، مقایسه کردند. نتایج نشان داد که ۸۲ درصد نمونه‌ها در آزمایش RT-PCR و ۶۰ درصد نمونه‌ها در آزمایش IHC مثبت بودند و همبستگی خوبی بین داده‌های این دو روش وجود داشت. البته حساسیت RT-PCR در مورد سویه‌های مختلف IBV، از ۶۷ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود که احتمالا ناشی از تفاوت سویه‌ها در تمایل به بافت نای و توانایی تکثیر آنها در بافت نای بوده است(۱۰).

نتایج مطالعه مقایسه‌ای روش‌های RT-PCR و جداسازی ویروس آنفلوانزای پرندگان روی نمونه‌های فیلد، به‌وسیله 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 نمونه‌ها تشخیص دهد(۴).

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



تصویر۱- نتایج آزمایش RT-PCR نمونه‌ها در ژل آگارز ۱.۵درصد- ستون ۴ تا ۹ شامل نمونه‌های مثبت که دارای باند DNA به‌اندازه 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 ۱ و ۱۲ مارکر (100bp) DNA می‌باشد.

ویروس در نمونه‌های بالینی گرفته شده از کودکان مبتلا به بیماری حاد تنفسی مقایسه شد. به‌طور متوسط، حساسیت روش RT-PCR، ۹۵درصد و حساسیت کیت‌های تجاری مختلف بین ۷۵-۴۰درصد بود. و ویژگی RT-PCR و کیت های تجاری هم به ترتیب ۹۸درصد و ۱۰۰- ۸۸درصد گزارش شد. نتایج این مطالعه نشان داد که RT-PCR کارآیی 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 آنفلوانزا 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 هماگلوتینین آنفلوانزا، برای بررسی نمونه‌های بالینی، طراحی کردند که قادر به تشخیص ۹۵/۴-۹۲/۹درصد از ویروس‌های آنفلوانزا جدا شده در کشت سلول بود(۱۱). مقایسه نتایج این مطالعه با Nested/multiplex RT-PCR طراحی شده دیگری(۱۳) که آن هم قسمتی از ژن هماگلوتینین را تکثیر می‌کرد، نشان داد که RT-PCR طراحی شده به‌وسیله Hermann حساس‌تر 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 حساس‌تر است. در مطالعه Taubenberger و Layne در سال ۲۰۰۱، ۴۲/۲درصد از نمونه‌های تنفسی مورد بررسی در روش RT-PCR و ۳۰/۹درصد در روش کشت سلول مثبت شدند(۲۵). در یک مطالعه دیگر، آزمایش RT-PCR، ۹۳درصد، کشت سلول، ۸۰درصد و ELISA، ۶۲درصد موارد را از نظر آنفلوانزا مثبت تشخیص داد(۲۲). مهمترین چالش RT-PCR در مورد آنفلوانزا، تغییرات مکرر ژنتیکی بخصوص در ژن‌های گلیکوپروتئین‌های سطحی HA و NA است که اگر در محل چسبیدن پرایمر 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 کارآیی 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 مطالعهٔ حاضر، روش جداسازی، ۲۳درصد و RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن HA، ۲۷درصد از نمونه‌ها را مثبت نشان داد. با محاسبات آماری، حساسیت نسبی RT-PCR در مقایسه با روش جداسازی، ۱۰۰درصد و ویژگی آن ۹۴درصد بدست آمد که نتایج بسیار مطلوب و درخور توجه است. به‌علاوه میزان همبستگی نتایج دو روش ۹۵درصد 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، به‌عنوان مثبت کاذب تلقی شده است. در حالی‌که، اگر با روش‌های تکمیلی نظیر تعیین سکانس حضور ژن H9 ویروس در محصول PCR اثبات شود ویژگی روش RT-PCR هم ۱۰۰درصد 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 تکثر 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 آماده دور از 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. به‌علاوه، 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 به‌عنوان یک روش تشخیصی نسبتا 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.

References

1. 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.
2. 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.
3. Bell, J.G., Mouloudi, S. (1988) A reservoir of virulent Newcastle disease virus in village chicken flocks. Prev. Vet. Med. 6: 37-42.
4. 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.
5. 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.
6. De witt, J.J. (2000) Detection of infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 29:71-93.
7. 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.
8. Gavin, P.J., Thomson, R.B. (2003) Review of rapid Diagnostic tests for Influenza. Clin. Appl. Immunol. Rev. 4 : 151-172.
9. 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.
10. 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.
11. Hermann, B., larsson, C., Zweygberg, 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.
12. 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.
13. 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.
14. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, part 2, section 2.7, chapter 2.7.12, avian Influenza, www.oie.net.
15. 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.
16. Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. and Studdert M.J. (1999) Veterinary virology, 3rd Ed., Academic Press, California, USA.
17. Nili, H., Asasi, K. (2003) Avian influenza (H9N2) outbreak in Iran. Avian Diseases 47: 828-31.
18. 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.
19. 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.
20. 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 pensylvania, 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 isolaton 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: form 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.

J.Vet.Res. 63,1:17-22,2008

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]

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

[2] *Private 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 $10^{3.5}$ EID_{50} 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**