

راه‌اندازی تست RT-PCR برای ردیابی نوکلئوپروتئین تیپ A و تحت تیپ‌های H_۵ H_۷ H_۹ ویروس آنفلوآنزای پرندگان و کاربرد آن در موارد مشکوک به آنفلوآنزای فوق حاد پرندگان ایران

• رضا طرقي

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 آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H_۵N_۱ 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 مرغ‌های جنین‌دار ۱۰-۹ روزه می‌باشد که گاهی بسیار وقت‌گیر می‌باشد. با توجه به وقوع آنفلوآنزای 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_۵، H_۷، H_۹ و ویروس آنفلوآنزای پرندگان در بافت‌نای صورت گیرد. چهار واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نوکلئوپروتئین تیپ A و تحت تیپ‌های H_۵، H_۷، H_۹ و ویروس آنفلوآنزای پرندگان بهینه شد. همچنین واکنش‌های RT-PCR نوکلئوپروتئین تیپ A و تحت تیپ H_۵ برای ردیابی ویروس بر روی بافت نای بهینه و به صورت مدل مشابه برای واکنش‌های RT-PCR تحت تیپ‌های H_۵ و H_۷ بر روی بافت استفاده گردید. سپس با استفاده از واکنش‌های فوق ۵۰ وقوع مشکوک به آنفلوآنزای 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_۵ یا H_۷ شناسایی نشد. واکنش‌های RT-PCR برای H_۹ 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_۹ مربوط به قابلیت سنجش میزان کمتر RNA ویروسی در واکنش نوکلئوپروتئین بود. اگرچه ویروس‌های H_۵N_۱ 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 آنفلوآنزای پرندگان در پرندگان مبتلا است که می‌توان از این روش در مراکز نظارتی که تشخیص سریع بیماری هدف عمده می‌باشد سود جست.

کلمات کلیدی: آنفلوآنزای پرندگان، H_۵N_۱، RT-PCR و تحت تیپ H_۵ و H_۷

Pajouhesh & Sazandegi No 78 pp: 139-146

Development of RT-PCR for detection of nucleoprotein type A and H₅, H₇, H₉ 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 Poubakhsh, 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 H₅, H₇ and H₉ 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 (H₅, H₇ and H₉) 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 H₅ or H₇ subtypes. The positive rates by RT-PCR of the H₉ 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 H₉N₂ 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, H₉N₂, H₅ and H₇ 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^۱ 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 منشأ کهنای) 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 جنس A بر اساس خصوصیت آنتی‌ژنیک گلیکوپروتئین‌های سطحی هم‌گلوپتینین^۲ (HA) و نورآمینیداز^۳ (NA) به تحت تیپ‌های متفاوتی تقسیم می‌شوند (۵).

ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان طیف وسیعی از حدت را از خود نشان می‌دهند. آنفلوانزای پرندگان با قدرت بیماری‌زایی بالا^۴ (HPAI)، 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 در ایران در سال ۱۳۷۷ با عامل تحت تیپ H₅N₁ صدمات و خسارات اقتصادی فراوانی را به بار آورد. اگرچه این 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 ویروس این 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 با تحت تیپ H₅ در بسیاری از کشورهای آسیای جنوب شرقی و همچنین وقوع آنفلوانزای بسیار حاد با تحت تیپ H₇ در کشور همسایه پاکستان در سالهای گذشته (۱)، نگرانی شدیدی را در میان پرورش دهندگان پرندگان کشور ما ایجاد نمود. شاید یکی از مهمترین علل این نگرانی عدم وجود امکانات سریع تشخیصی در سطح کشور بود. در واقع اقدامات ریشه کنی بیماری می‌بایستی پس از تشخیص و تأیید بیماری صورت گیرد. در حال حاضر، مناسب‌ترین روش جهت مبارزه با آنفلوانزای پرندگان، کنترل و ریشه کنی می‌باشد. برنامه کنترل و به تبع آن ریشه کنی، زمانی موفق است که با تشخیص زود هنگام 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 در این 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

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

روش RT-PCR

در این مطالعه ابتدا واکنش RT-PCR برای تیپ‌های H_4 ، H_5 و H_7 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_4 بر روی بافت نای انجام گردید. مراحل انجام RT-PCR بر روی بافت برای H_4 و H_5 کاملاً شبیه تحت تیپ H_4 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 (Roche, Germany) M-MuLV 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 آنفلوآنزا پرندگان تکثیر شد. این جفت پرایمر به صورت حفاظت شده در تمامی تحت تیپ‌های ویروس‌های آنفلوآنزای پرندگان وجود دارد به عبارتی این PCR وجود ویروس آنفلوآنزا پرندگان را بدون در نظر گرفتن تحت تیپ آن نشان می‌دهد. سپس با استفاده از سه جفت پرایمر اختصاصی تحت تیپ‌های H_4 ، H_5 ، H_7 ، تست PCR برای تولید قطعات به ترتیب ۵۴۵، ۶۳۴ و ۴۸۸ جفت بازی انجام گرفت. تکثیر این قطعات در ۵۰ میکرو لیتر محلول واکنش PCR که حاوی ۶ میکرو لیتر cDNA ۱۵ پیکومول از هر یک از پرایمرهای گزارش شده، ۲۰۰ میکرومول ۱/۵ dNTPs میلی مول منیزیم و یک واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq (Roche) بود انجام گرفت. واکنش‌های فوق با استفاده از ماشین PCR (ependorf, Mastercycler, gradient) و با برنامه ۹۴، ۵۰ و ۷۲ درجه سانتیگراد هر یک به مدت یک دقیقه با ۳۵ بار تکرار و در انتها ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. تأیید اندازه محصولات PCR به دست آمده با استفاده از جداسازی الکتروفورزی بر روی 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 تیپ H_4

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

بسیار با اهمیت می‌باشد (۱۰، ۱۲، ۱۵). از این رو، 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 بر این، به دلیل اینکه 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 غیرایده‌آل و یا در طی ذخیره‌سازیهای نامناسب از دست می‌رود. در این 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 بر این، 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 آنفلوآنزا معرفی می‌نماید، به طوری که می‌تواند جایگزین روش‌های مرسوم گردد. با توجه به اینکه روش جداسازی ویروس آنفلوآنزا 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_4N_2 اتفاق افتاد جلوگیری کننند این مطالعه انجام شد تا واکنش RT-PCR جهت تشخیص سریع تحت تیپ‌های H_4 ، H_5 ، H_7 از نمونه‌های بافتی بهینه شده و از آن در موارد مشکوک به بیماری استفاده شود.

مواد و روش‌ها

ویروس‌ها

ویروس آنفلوآنزا (H_4N_2 /A/Chicken/Iran/YY2/۲۰۰۰) که قبلاً روی تخم‌مرغ توسط روش Limiting dilution کلون شده بود برای بهینه سازی واکنش RT-PCR برای H_4 ، نوکلئوپروتئین (NP) و تست حساسیت استفاده شد. از ویروس‌های غیرفعال آنفلوآنزای H_4 و H_5 که از سوی سازمان دامپزشکی کشور یا موسسه رازی تأمین شده بود جهت بهینه سازی RT-PCR تحت تیپ‌های H_4 و H_5 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 آنفلوآنزای فوق حاد در کشورهای آسیایی جنوب شرقی و پاکستان شد. انجام واکنش‌های RT-PCR برای تیپ‌های H_4 ، H_5 ، H_7 و NP در ۵۰ مورد مشکوک به آنفلوآنزای 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

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

ردیف	نام نمونه	محل	نوع مرغداری	RT-PCR برای H _۳ و H _۷	RT-PCR برای H _۴	RT-PCR NP برای
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	فلورجان	گوشتی	-	+	+
۱۲	۳۲۲ C	فلورجان	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 و بلوچستان	بومی	-	-	-

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

۱). سپس واکنش‌های فوق بر روی بافت نای در ۵۰ وقوع مشکوک به آنفلوآنزای 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_4 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

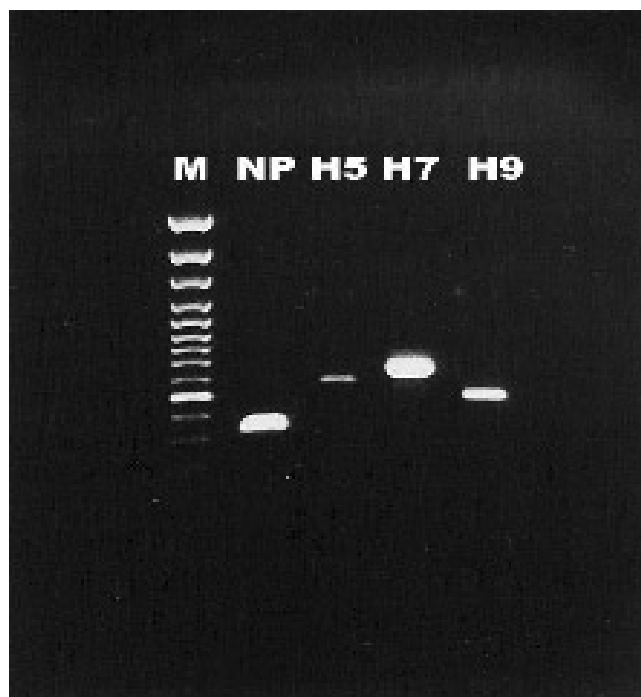
از cDNA ساخته شده انجام شد. در ژل آگاروز، محصولات PCR به دست آمده الکتروفورز شد و عکس برداری از ژل انجام گردید.

نتایج نتایج واکنش‌های RT-PCR

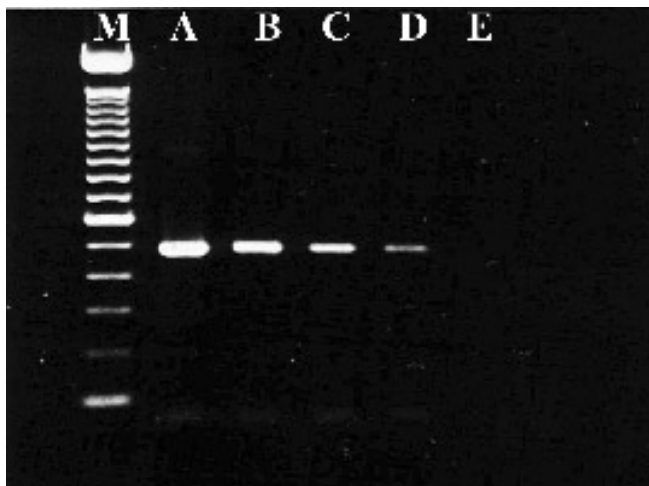
واکنش RT-PCR برای نوکلئو پروتئین (NP) و H_4 با استفاده از ویروس آنفلوآنزای پرندگان YY2 و واکنش RT-PCR برای H_4 ، H_5 با استفاده از پادگن‌های کشته H_4 و H_5 توانست به ترتیب قطعات DNA با اندازه‌های ۵۴۵، ۴۸۸، ۳۳۰ و ۶۳۴ جفت باز را تولید نماید (شکل



شکل ۳: نتایج واکنشهای RT-PCR برای NP در سه نمونه فیلد که در واکنش RT-PCR برای H₉ منفی بودند. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی A,B,C: سه نمونه فیلد

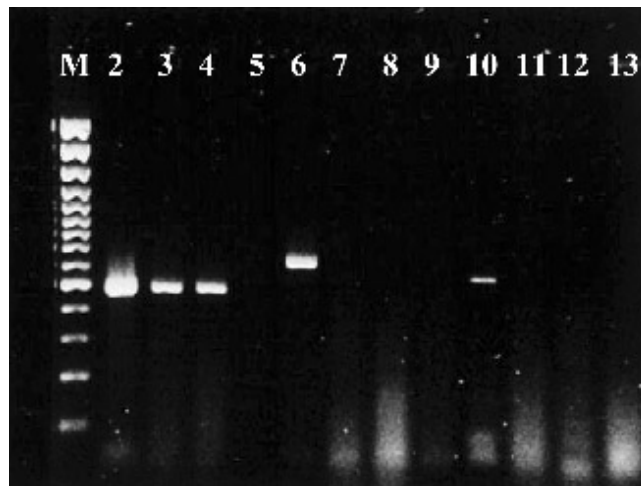


شکل ۱: نتایج واکنشهای RT-PCR برای نوکلئوپروتئین و بیروسهای آنفلوانزای تیپ A و تحت تیپ های H₅, H₇, H₉. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی



شکل ۴: نتایج تست حساسیت واکنش RT-PCR برای تحت تیپ H₄. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی
A: ۱۰ میکروگرم B: ۱ میکروگرم
C: ۱۰۰ پیکوگرم D: ۱۰ پیکوگرم
E: ۱ پیکوگرم

H₄ و NP به ترتیب ۵۲ (۲۲/۴۲) و ۶۰ (۲۵/۴۲) درصد بود. در سه مورد واکنش RT-PCR برای NP توانست و بیروس آنفلونزا را ردیابی کند در صورتیکه این نمونه‌ها در واکنش RT-PCR برای H₄ منفی بودند (شکل ۳). تمامی مواردی که در روش RT-PCR برای H₄ مثبت گزارش شده بودند با روش RT-PCR برای NP نیز مثبت ارزیابی شدند.



شکل ۲: نتایج واکنشهای RT-PCR انجام شده برای دو نمونه فیلد، ستون یک مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون دو کنترل مثبت H₄، ستون ۳، ۴ واکنشهای H₄ برای دو نمونه، ستون ۵ کنترل منفی H₄، ستون ۶ کنترل مثبت H₅، ستون ۷ و ۸ واکنشهای H₅ برای دو نمونه، ستون ۹ کنترل منفی H₅، ستون ۱۰ کنترل مثبت H₅، ستون ۱۱ و ۱۲ واکنشهای H₅ برای دو نمونه، ستون ۱۳ کنترل منفی H₅.

برای H₄ و NP به ترتیب ۲۲ نمونه (۴۴٪) و ۲۵ نمونه (۵۰٪) مثبت ارزیابی شدند (جدول ۱). هیچ یک از نمونه‌های آزمایش شده در واکنش RT-PCR برای H₄، H₅ مثبت نبودند. آزمایش‌های RT-PCR برای تمامی موارد مرغ بومی، کبوتر و پرندگان مهاجر آبی منفی بود. به عبارتی دیگر درصد نمونه‌های مثبت برای مرغ‌های صنعتی در واکنش‌های RT-PCR برای

آزمایش حساسیت RT-PCR

پس از انجام تست حساسیت مشخص گردید که واکنش RT-PCR برای H_9N_2 قادر به تشخیص RNA ویروس آنفلوآنزای 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 آنفلوآنزای پرندگان فوق حد مطرح می‌باشد. روش‌های متفاوتی برای تشخیص آنفلوآنزای پرندگان مطرح می‌باشد ولی از نقطه نظر سرعت در تشخیص شاید RT-PCR یکی از مهمترین روش‌های جاری می‌باشد. با توجه به شیوع آنفلوآنزای پرندگان فوق حد در سال گذشته در بیشتر کشورهای آسیای جنوب شرقی و کشور همسایه پاکستان (۱) و از طرفی مشکلات تشخیص این بیماری صرفاً براساس علائم بالینی و کالبدگشائی، در این مطالعه روش RT-PCR جهت تشخیص سریع تحت تیپ‌های H_9 ، H_7 ، H_5 و نوکلئوپروتئین (NP) ویروس‌های آنفلوآنزای بهینه گشت. اخیراً گزارشات متعددی در خصوص تشخیص آنفلوآنزای پرندگان با استفاده از روش‌های سریع تشخیصی مطرح شده است که بیانگر اهمیت استفاده از این روش‌هاست (۲، ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۴، ۳، ۲). ولی استفاده از این 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_9 ، H_7 ، H_5 ویروس آنفلوآنزا در گله‌های مشکوک را نشان دهد. در ابتدا واکنش‌های RT-PCR برای تحت تیپ‌های H_9 ، H_7 ، H_5 ، NP و ویروس‌های آنفلوآنزای 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_9 ، H_7 ، H_5 و NP بر روی بافتهای نای آلوده انجام گردید. نمونه برداری از ۵۰ مورد مشکوک به آنفلوآنزای فوق حد ارسال شده از نقاط مختلف کشور در طی سالهای ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳ صورت گرفت. این دوره مصادف با وقوع آنفلوآنزای فوق حد در کشورهای آسیای جنوب شرقی و پاکستان بود. برای تمامی نمونه‌های ارسال شده انجام واکنش RT-PCR برای NP و تحت تیپ‌های H_9 ، H_7 ، H_5 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 آنفلوآنزای حاد باشد. استان‌های فارس، اردبیل و تهران با ارسال ۴ تا ۶ نمونه در شرایط آماري 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 طور کلی نمی‌توان 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_9 و H_5 آنفلوآنزا 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

با این 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 آنفلوآنزای H_9N_2 ردیابی شد. بدون احتساب ۸ مورد مرغهای بومی، کبوتر و پرندگان مهاجر از مجموع نمونه‌های بررسی شده می‌توان گفت ویروس آنفلوآنزای 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 همچنین این واکنش در سه مورد توانست ردیابی ویروس آنفلوآنزا را مشخص سازد در حالیکه واکنش‌های RT-PCR برای تحت تیپ‌های H_9 ، H_7 ، H_5 در این موارد منفی بود. از این مطالعه نمی‌توان استنتاج نمود که کدام تحت تیپ ویروس آنفلوآنزا در این سه مورد حضور داشته است. به خصوص اینکه تلاش برای جداسازی ویروس بر روی تخم‌مرغهای SPF در این 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 در این روش است. حساسیت واکنش RT-PCR برای H_9 در این مطالعه تا ۱۰ پیکوگرم RNA ویروسی ارزیابی شد در حالیکه Lee و همکاران حساسیت واکنش RT-PCR برای NP را بین ۱ تا ۰/۱ پیکوگرم RNA ویروسی اعلام کردند (۸) به عبارتی دیگر حساسیت واکنش NP ۱۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر از واکنش H_9 می‌باشد. چنانچه احتمال فوق‌الذکر را صحیح بپذیریم 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 طور کلی از روش RT-PCR برای NP می‌توان برای نشان دادن حضور تحت تیپ‌های غیر معمول آنفلوآنزا در منطقه و نشان دادن ویروس آنفلوآنزا در منطقه‌ای که قبلاً آنفلوآنزا گزارش نشده استفاده کرد چون در مورد اخیر این تست مانند تست AGPT برای آنفلوآنزا عمل می‌کند ولی با این تفاوت که این 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 آنفلوآنزا 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. در این 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 در این روش توانایی ردیابی ویروس در نمونه‌های حاوی ویروس غیر فعال شده یا دز پائین واحد عفونی وجود ندارد.

- 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 Eckeoad, 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 Clinical 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

در صورتیکه در روش RT-PCR نیازی به وجود جرم عفونت زان 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 برخوردار 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_۵ در پرندگان را نشان داده اند. همچنین در روش جداسازی گاهی تا سه بار پاساژ ضرورت می‌یابد به طوری که این روش را به روشی زمان برو وقت گیر تبدیل کرده است. در حالی که روش RT-PCR می‌تواند شناسایی 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 گله‌هایی 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 به این 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 بودن این 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 کشور این 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. در این حالت با انجام تست غربالگری مولکولی اولیه در این 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. البته این امر در صورتی محقق خواهد شد که آزمایشات مولکولی در این 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.,

virus H₉N₂ 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., Garber, 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 H₅ and H₇ 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 diagnostic tool for avian influenza. Avian Diseases 47, 1087-1090.

18- Starick, E., Romer, A., Oberdorfer, A. and Werner, O., 2000; Type and subtype 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 H₇ avian influenza virus directly from poultry specimens. Avian Diseases, 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 diagnostic 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 Pourbakhsh, 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.

