DOI: 10.22092/vj.2019.123215.1491
شماره ۱۲۶ بهار ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

راه‌اندازی آزمون ممانعت از نورآمینیداز جهت تعیین تحت تیپ نورآمینیداز ویروس های آنفلوانزای پرندگان در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

• **نجمه معتمد (نویسنده مسئول)**
استادیار بخش تحقیق و تولید واکسن و فرآورده‌های بیولوژیک طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **عبدالحمید شوشتری**
استادیار بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **محمدحسین فلاح مهرآبادی**
استادیار بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **اصغر یوسفی امین**
کارشناس بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۶-۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۱۲-۱۴

Email: motamed62@yahoo.com

چکیده

هنگام شناسایی ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A علاوه بر تعیین تحت تیپ هماگلوتینین ویروس که به وسیله روش‌های سرولوژی و مولکولی روتین امکان‌پذیر است، نیاز به شناسایی تحت تیپ نورآمینیداز (NA) خصوصاً در رخدادهای ویروس‌های H5 و H7 (آنفلوانزای فوق حاد یا کم حدت) نیز هست. این امر غالبا به وسیله روش‌های مولکولی صورت می‌گیرد. از سال 1971 سازمان جهانی بهداشت (WHO) پیشنهاد کرد که آنتی‌ژن‌های نورآمینیداز ویروس‌های آنفلوانزای A بر اساس آزمون ممانعت از نورآمینیداز به تحت تیپ‌های مختلفی تقسیم شوند. در آزمایشگاه‌های مرجع تخصصی مانند آزمایشگاه‌های مورد تایید سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) تست ممانعت از نورآمینیداز برای شناسایی تحت تیپ نورآمینیداز ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان انجام می‌شود. با توجه به اهمیت و ارزش این تست و لزوم کاربرد آن، در این مطالعه سعی شد تا تست ممانعت از نورآمینیداز کلاسیک برای شناسایی تحت تیپ NA در نمونه‌های سرمی و هم در نمونه‌های ویروسی طبق پروتکل OIE راه‌اندازی گردد. برای تایید نتایج تست، از روش واکنش زنجیره پلی مراز معکوس با کمک پرایمرهای اختصاصی تحت تیپ به صورت همزمان استفاده شد. بر اساس نتایج حاصله پروتکل راه‌اندازی شده توانایی شناسایی و تفکیک تحت تیپ‌های مختلف آنتی‌ژن یا آنتی‌سرم نورآمینیداز را دارد. تست ممانعت از نورآمینیداز تستی کاربردی است که در امور تشخیصی و تحقیقاتی و از جمله هنگام تفکیک پرنده‌های بیمار از واکسینه (DIVA) خصوصا در مناطقی که ویروس اندمیک شده و سیاست واکسیناسیون اجرا می‌شود و نیز در آزمایشگاه‌های مرجع از جمله موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کاربرد دارد.

کلمات کلیدی: ممانعت از نورآمیینداز، ویروس‌های آنفلوانزا، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، آزمایشگاه مرجع

Veterinary Researches & Biological Products No 126 pp: 2-8

Development of Neuraminidase Inhibition test for subtyping avian influenza viruse Neuraminidase, in Razi Vaccine and Serum Research Institute

By: Motamed. N., (Corresponding Author) Assistant professor of Department of Poultry Diseases Vaccine and Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREO) Karaj-Iran. Shoushtari. A., Assistant professor of Department of Poultry Diseases Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREO) Karaj-Iran. Fallah Mehrabadi, M.H., Assistant professor of Department of Poultry Diseases Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREO) Karaj-Iran. and Yousefi Amin. A., Department of Poultry Diseases Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization(AREO) Karaj-Iran.

Email: motamed62@yahoo.com

Received: 2018-09-05 **Accepted: 2019-03-05**

Detection and identification of influenza A viruses hemagglutinin is done with serological or molecular techniques and the neuraminidase (NA) subtyping is also necessary in purpose of epidemiological studies specially in H5 or H7 (highly pathogenic/ low pathogenic) outbreaks and/or endemic areas. Subtype Identification of NA usually is performed by molecular tests such as RT-PCR. Since 1971, WHO has suggested that the surface glycoprotein neuraminidase of avian influenza viruses could be divided in different subtypes serologically by Neuraminidase Inhibition test (NI). In reference or specialized laboratories like OIE licensed labs, NI test is running routinely. Considering the importance of this valuable test, an experimental study was conducted to develop the classic NI test according to OIE protocol. RT-PCR test with subtype-specific primers was used as a control for evaluation of test accuracy. According to our results, NI test can detect and distinguish various NA subtypes in serum or viral samples. In conclusion, the NI test is a practical tool in diagnostic and research trials, especially in differentiation of vaccinated from unvaccinated birds (DIVA) in endemic areas with vaccination strategy or in validated reference laboratories such as Razi Vaccine and Serum Research Institute.

Key words: Neuraminidase Inhibition, influenza virus, RT-PCR, Reference Laboratories

مقدمه

ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان متعلق به خانواده ارتومیگزوویریده، غشادار و دارای ژنوم RNA تک‌رشته‌ای منفی هستند. در سطح این ویروس‌ها دو نوع پروتئین سطحی هماگلوتینین و نورآمینیداز وجود دارد. تاکنون۱۶ تحت تیپ هماگلوتینین و ۹ تحت تیپ برای نورآمینیداز در ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان شناسایی شده است (۱۴). نورآمینیداز یک آنزیم اگزوسیالیداز است که اتصال α-کتوسیدیک بین سیالیک اسید و زنجیره کربوهیدارتی را می‌شکند. توالی آمینواسیدی گلیکوپروتئین نورآمینیداز (NA) توسط ششمین قطعه RNA ویروس کد می‌شود. نورآمینیداز ویروس‌های آنفلوانزا عملکردهای مختلفی دارد ازجمله شکستن نورآمینیک اسیدهای مخاط دستگاه تنفس و تسهیل حرکت ویروس به سوی سلول هدف و نیز آزادسازی ویروس‌های تازه تولید شده از سلول‌های عفونی و جلوگیری از به هم چسبیدن آنها (Aggregation) نقش دارد (۱۴). حضور پادتن‌های مهارکننده فعالیت نورآمینیداز ویروس آنفلوانزا، سبب کاهش تیتر ویروس و علائم بیماری در مدل حیوانات (۱۳) و در انسان با مقاومت علیه آنفلوانزا (۱۰) همراه است. بنابراین افزایش تیتر مهار نورآمینیداز به دنبال واکسیناسیون می‌تواند بیانگر کارایی و تاثیر واکسن باشد. با این حال معمولا به علت سختی و پیچیدگی، این روش به عنوان روش ارزیابی پاسخ به واکسیناسیون نادیده گرفته می‌شود (۱۲). روش‌های متعددی مانند کشت در تخم‌مرغ جنین‌دار، کشت سلول، روش‌های مولکولی (واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در زمان واقعی) و سرولوژی برای تشخیص ویروس‌های آنفلوانزا

معرفی شده است. در حال حاضر استاندارد طلایی برای تایپینگ و ساب تایپینگ ویروس‌های آنفلوانزا A، جداسازی ویروس در تخم‌مرغ جنین‌دار و به دنبال آن انجام تست‌هایی برای تعیین تحت تیپ‌های هماگلوتینین و نورآمینیداز (HA و NA) است (۱۱). تست ممانعت از هماگلوتیناسیون جهت تعیین تحت تیپ هماگلوتینین در تمام آزمایشگاه‌ها به صورت روتین انجام می‌شود اما تست ممانعت از نورآمینیداز سال‌هاست که در دنیا معرفی شده و در آزمایشگاه‌های مرجع انجام می‌گیرد (۱۲) و می‌تواند علاوه بر شناسایی و تعیین تحت تیپ آنتی‌ژن NA در نمونه‌های ویروسی، تحت تیپ NA را در سرم نیز شناسایی نماید، برخلاف روش‌های مولکولی مانند RT-PCR که تنها قادرند در نمونه‌های ویروسی تحت تیپ ویروس را شناسایی کنند. علی رغم اهمیت منحصر به فرد به دلیل پیچیدگی و سختی، تست ممانعت از نورآمینیداز تنها در آزمایشگاه‌های مرجع بین‌المللی انجام می‌شود.

یکی از مهم‌ترین کاربردهای این تست به عنوان تست تشخیص تفریقی (DIVA, Differentiating Infected from Vaccinated Animals) بین جمعیت واکسینه شده بر علیه آنفلوانزای فوق حاد و آلودگی طبیعی است. در مواردی که از واکسن آنفلوانزای کشته استفاده می‌شود، برای تفریق پرندگانی که واکسن غیرفعال دریافت کرده‌اند از پرندگانی که با ویروس در گردش آلوده شده‌اند، آزمون DIVA استفاده می‌شود. اگر تحت تیپ نورآمینیداز واکسن متفاوت از سویه‌ی در گردش باشد، استراتژی DIVA می‌تواند با مقایسه آنتی‌بادی موجود با آنتی‌بادی علیه N در گردش صورت گیرد (۳).

با توجه به استراتژی سازمان دامپزشکی کشور در واکسیناسیون آنفلوانزای فوق حاد، این مطالعه با هدف راه‌اندازی آزمون نورآمینیداز برای تفریق جمعیت واکسینه از آلوده و نیز توانایی شناسایی تحت تیپ نورآمینیداز انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر برای راه‌اندازی تست ممانعت از نورآمینیداز جهت شناسایی دو تحت تیپ شایع نورآمینیداز ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در کشور (N1 و N2)، که از نظر بهداشت عمومی هم دارای اهمیت‌اند، انجام شد.

تست هماگلوتیناسیون(HA) و ممانعت از هماگلوتیناسیون(HI)

آزمون هماگلوتیناسیون (HA) و تست ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) جهت تعیین تحت تیپ پروتئین هماگلوتینین ویروس‌های آنفلوانزا در نمونه مشکوک (سرم یا ویروس) و جلوگیری از تشابه تحت تیپ‌های هماگلوتینین آنتی‌سرم و آنتی‌ژن در تست نورآمینیداز انجام شد. هنگام انتخاب نوع آنتی‌ژن یا آنتی‌سرم استاندارد (جدول ۲) تلاش بر این بود که تحت تیپ هماگلوتینین آنها به خاطر پرهیز از وقوع اثر Steric hindrance متفاوت باشد. طبق پروتکل مورد تایید OIE (۱۵) در صورتی که تیتر HA ویروس > ۱:۶۴ شد ویروس را به نسبت ۱:۱۵ و اگر کمتر از ۱:۶۴ تیتر HA ویروس بود ویروس به نسبت ۱:۱۳با بافر فسفات سالین (pH =۵/۹) رقیق شد. در مورد آنتی سرم: سرم به نسبت ۱ : ۵ با بافرفسفات سالین (pH =۵/۹) رقیق شد.

مواد و معرف‌های مورد استفاده در تست ممانعت از نورآمینیداز

حداقل سه معرف شیمیایی در این تست کاربرد دارد که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آمده است.

آماده‌سازی معرف‌ها

برای آماده‌سازی معرف‌ها، ابتدا معرف پریودات (۰/۰۲۵ مول): ۲/۶۷ g در ۵۰۰ mL اسید سولفوریک ۰/۱۲۵ N (H_2SO_4) حل شد، سپس معرف آرسنیت ۲ درصد، ۲ g آرسنیت سدیم (Naso4) در ۱۰۰ mL اسیدکلریدریک ۰/۵N (HCL) حل شد. معرف تیوباربیتوریک اسید(۰/۱ مول): ۷/۲ g تیوباربیتوریک اسید در ۴۰۰ mL آب مقطر حل شده و با اضافه کردن سود (NaoH)، PH به عدد ۹ رسیده و آب مقطر تا رسیدن به ۵۰۰ mL اضافه شد.

مراحل آزمایش

از آنجا که تست ممانعت از نورآمینیداز برای تعیین تحت تیپ هم در سرم مشکوک و هم در نمونه ویروسی مشکوک قابلیت استفاده دارد، بنابراین پروتکل توصیه شده برای هر دو مورد با استفاده از ویروس استاندارد(جهت بررسی امکان شناسایی تحت تیپ در آنتی‌سرم) و یا آنتی سرم استاندارد (بررسی امکان شناسایی تحت تیپ نورآمینیداز در نمونه

جدول ۱- نام معرف و مشخصات کارخانه سازنده

ردیف	نام معرف
۱	متا پریودات سدیم Sodium meta periodate
۲	تیوباربیتوریک اسید Thiobarbitoric acid
۳	آرسنیت سدیم sodium meta arsenit

ویروسی) انجام گرفت (جدول ۲ و۳). طبق روش کلاسیک توصیف شده در کتاب کاپوآ که مورد تایید OIE است (۱۵) مراحل تست در لوله‌های شیشه‌ای(۱۲× ۷۵ mm) انجام شد(۹). در هر نوبت انجام آزمایش لوله کنترل یا شاهد ویروس (virus) و نیز لوله کنترل فتوئین (Blank) در نظر گرفته شد.

مراحل تست برای شناسایی تحت تیپ در نمونه سرمی

در تمام لوله‌ها به جز شاهد ویروس و شاهد سوبسترا (بلانک)، ۱۰۰ µl سرم مشکوک ریخته شد. سپس ۱۰۰ µl ویروس استاندارد در همه لوله‌ها به جز شاهد سوبسترا ریخته و در لوله شاهد ویروس، علاوه بر ۱۰۰ µl ویروس، ۱۰۰ µl بافر فسفات و در شاهد سوبسترا، ۲۰۰ µl بافر فسفات ریخته شد و لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند.

شاهد ویروس (دارای همه معرف‌ها و فاقد آنتی‌سرم): برای تایید حضور فعالیت نورآمینیداز ؛ معادل حجم آنتی‌سرم بافر ریخته شد.

شاهد سوبسترا (بلانک) (دارای همه معرف‌ها و فاقد آنتی‌سرم و ویروس): برای تایید حضور سوبسترای فتوئین، عدم حضور واکنش رنگ خودبه خودی، به جای مواردی که ندارد هم حجمشان بافر فسفات ریخته شد.

پس از انکوباسیون به تمام لوله‌ها، ۳۰۰ µl سوبسترای فتوئین اضافه و به مدت ۱۸-۲۰ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از آن ۲۰۰ µl معرف پریودات سدیم به لوله‌ها اضافه و باز ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوباسیون صورت گرفت. ۲۰۰ µl آرسنیت سدیم به مخلوط واکنش اضافه شده تا رنگ قهوه‌ای ایجاد شد. سپس لوله‌ها را به آرامی تکان داده تا رنگ قهوه‌ای محو شد بعد ۲ mL محلول تیوباربیتوریک اسید را اضافه و ۷/۵ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شد تا واکنش رنگی در لوله شاهد ویروس مشاهده شود. نمونه‌ها هنگام استفاده از آزمون ممانعت از نورآمینیداز در تشخیص تحت تیپ N در نمونه سرمی یا به عبارتی هنگام استفاده از ویروس استاندارد به صورت پنج تایی کارشد.(جدول ۲).

بررسی صحت نتایج

در صورتی که شاهد ویروس رنگ صورتی تشکیل دهد و کنترل سوبسترا هم بی رنگ باشد پس مراحل تست به درستی انجام شده و سوبسترا هم ایرادی نداشته است. در بین لوله‌های تست لوله‌ای که بی‌رنگ شده از لحاظ حضور پادتن علیه ویروس مورد استفاده مثبت است.

شناسایی تحت تیپ نورآمینیداز در نمونه ویروسی

برای تعیین تحت تیپ نورآمینیداز ویروس در نمونه‌های ویروسی از آنتی سرم استاندارد استفاده و تمام مراحل مطابق روش استاندارد بیان شده در بالا انجام گرفت.(جدول ۳). یکی از ویروس‌های مورد استفاده ویروس استاندارد با مشخصاتی که در جدول ۲ آمده بود و دیگری از ویروس‌های جداشده از فیلد در ایران که به بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور موسسه رازی ارجاع شده، بودند (۱۶).

تست واکنش زنجیره‌ای پلی مراز معکوس

ویروس‌های مورد استفاده تحت آزمایش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی و شرایط واکنش طبق منبع (۱۶) قرار گرفتند. در این مطالعه دو تحت تیپ شایع و مهم نورآمینیداز (N1 و N2) مورد ارزیابی با دو روش ذکر شده قرار گرفتند. ابتدا نورآمینیداز پنج سویه فیلدی H9N2 جدا شده در ایران (۱۷) هرکدام حداقل با سه بار تکرار با استفاده از آنتی‌سرم استاندارد H1N2 و مقایسه آن با تست نتایج RT-PCR برای بررسی کاربرد تست در شناسایی تحت تیپ ویروس‌های فیلدی استفاده شد سپس ردیابی تحت تیپ نورآمینیداز در سرم مشکوک (استاندارد-جدول۲) با استفاده از این تست برای دو تحت تیپ نورآمینیداز (ویروس استاندارد و یک ویروس فیلد-جدول۲) N1 و N2 هرکدام با حداقل پنج تکرار و مقایسه آن با نتایج RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اطمینان از صحت تست روش تشخیص تحت تیپ در نمونه سرمی آنتی سرم استاندارد استفاده شده است.

توالی پرایمرهای مورد استفاده: طول محصول RT-PCR به ترتیب برای N1 و N2 bp ۲۴۵ و ۲۷۸ bp و به ترتیب زیر بود.

جدول ۲- مشخصات ویروس جهت ردیابی تحت تیپ نورآمینیداز در نمونه سرمی استاندارد

ردیف	تحت تیپ	ویروس ا	آنتی سرم استاندارد / مشخصات کارخانه سازنده	
۱	N1	VLDIA222SWHAG(H1N1)Animal-Health Service, Switzerland	A/CK/scot/59 (H5N1)	VeterinaryLaboratoryService,NewHaw, Addlesto-ne, Surrey, KT15 3NB,UK
۲	N2	H9N2(Razi vaccine and serum re-search institute)	A/Duck/HongKong/196/77(H1N2)	VeterinaryLaboratoryService,NewHaw, Addlesto-ne, Surrey, KT15 3NB,UK

N1-F: TCARTCTGYATGRYAAYTGG
N1-R: GGRCARAGAGAKGAATTGCC
N2-F: TYTCTMTAACYATTGCRWCARTATG
N2-R: GARTT GTCYT TRGAR AAVGG

نتایج

در مجموع تعداد ۲۵ تست برای تست ممانعت از نورآمینیداز و همین مقدار برای مقایسه آن با روش استاندارد (در این مطالعه از تست واکنش زنجیره پلی‌مراز معکوس به عنوان کنترل استفاده شد) انجام گرفت که با موفقیت تست راه‌اندازی شد. نتایج تست‌ها با در نظر گرفتن تازگی محلول‌های معرف و ویروس‌ها، مثبت بود. نمونه محصول واکنش (ردیابی تحت تیپ نورآمینیداز در نمونه سرمی) در روش کلاسیک در لوله شیشه‌ای در شکل ۱ نشان داده شده است.

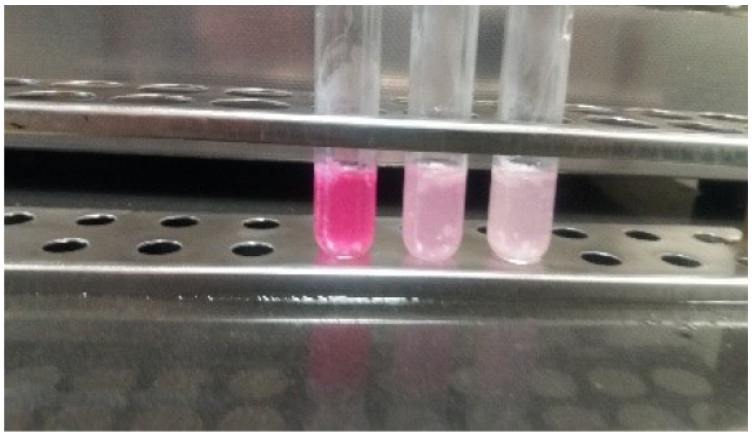
بحث

اولین بار وارن در سال ۱۹۵۹ روش شناسایی سیالیک اسید را توضیح داد. سپس آمینوف (۱۹۶۱) تغییراتی در این روش ایجاد کرد (۱). اساس این روش آزاد شدن ان استیل نورامینیک اسید یا همان سیالیک اسید(۵-dideoxy-N-acetyl-D-glycero-D-galacto-nonulosonic-acetamido۳,۵ acid) از سوبسترای فتوئین به وسیله فعالیت نورآمینیداز است (۲). سیالیک اسید آزاد شده به وسیله اکسیداسیون پریودات به β فورمیل پیرویک اسید تبدیل شده و تحت تاثیر معرف تیوباربیتوریک اسید ماده‌ای کروموفور به رنگ صورتی شکل می‌گیرد. این محصول رنگی زمانی ایجاد می‌شود که فعالیت آنزیمی نورآمینیداز ویروس فعال باشد. در مجاورت پادتن اختصاصی تحت تیپ فعالیت آنزیمی نورآمینیداز خنثی شده و نورآمینیک اسیدی آزاد نمی‌شود تا در ترکیب با معرف ماده رنگی را بوجود آورد. بنابراین عدم تشکیل رنگ صورتی یا تشکیل رنگ سفید بیانگر هومولوگ بودن تحت تیپ نورآمینیداز ویروس با آنتی‌سرم و در نتیجه شناسایی آنتی‌ژن نورآمینیداز در تحت تیپ ویروسی مورد بررسی توسط آنتی‌سرم است.در مطالعه حاضر سعی شد تا تست مذکور برای شناسایی دو تحت تیپ مهم و شایع نورآمینیداز در طیور منطقه یعنی N1 و N2 که از لحاظ انسانی و بهداشت عمومی هم اهمیت دارند راه‌اندازی شود.

از آنجا که این تست یک روش کیفی بر اساس مشاهده یا عدم مشاهده واکنش رنگی است نتایج به صورت مثبت و یا منفی گزارش می‌شود. در مجموع نتایج تست‌های انجام شده با استفاده از آنتی‌ژن یا آنتی‌سرم استاندارد مثبت بود و تست ممانعت از نورآمینیداز با موفقیت راه‌اندازی شد. در چند مورد به دلیل کهنه بودن محلول معرف و آنتی‌ژن رقیق شده پاسخ مناسبی ایجاد نشد اما با تکرار تست و استفاده از معرف‌های تازه تهیه شده پاسخ مناسب به دست آمد. بر اساس نتایج این مطالعه برای کاهش درصد خطا یا اشتباه، تازه بودن محلول‌های معرف و وجود تفاوت بین تحت تیپ هماگلوتینین آنتی‌ژن با آنتی‌سرم (پرهیز از اثر استریک) تحت آزمایش توصیه می‌شود. در مطالعه حاضر وجود فعالیت نورآمینیدازی تحت تیپ‌های N1، N2 نورآمینیداز در نمونه سرم مشکوک و یا ویروس با تست ممانعت از نورآمینیداز (NI) تایید شد. بر اساس دانسته‌های ما این مطالعه اولین تجربه راه‌اندازی موفق تست ممانعت از نورآمینیداز در ایران می‌باشد. در آزمایشگاه‌های مرجع و معتبر دنیا این تست به صورت روتین با هدف تشخیصی یا در راستای استراتژی DIVA انجام می‌گیرد. کاپوآ و همکاران (۲۰۰۳) برای اولین بار روش DIVA را برای تفکیک پرنده‌های واکسینه از بیمار بعد از اپی دمی‌های H7N1 کم بیماریزا (LPAI) و سپس فوق حاد(HPAI) در سال‌های ۱۹۹۹-۲۰۰۰ ایتالیا بر پایه تفاوت تحت تیپ نورآمینیداز سویه واکسن از سویه حاد توسعه داد و استفاده از تست ممانعت از نورآمینیداز برای نمونه‌های سرمی فیلدی را توصیف کرد (۳). روش‌های مولکولی متعددی RT-PCR و Real-Time RT-PCR جهت شناسایی تحت تیپ آنتی‌ژن نورآمینیداز (۱۷،۱۶،۶)، که سرعت در رسیدن به جواب را افزایش داده‌اند(حدودا ۴ ساعت)، تاکنون معرفی و به کار رفته است. با این حال روش ممانعت از نورآمینیداز که شاید قدمت بیشتری نسبت به آن‌ها داشته و زمانبر باشد (حداقل۲۰ ساعت)، ارزش و جایگاه مطالعاتی خود را حفظ کرده و در آزمایشگاه‌های مرجع معتبر به کار می‌رود. روش‌های مولکولی

جدول ۳- سویه های نمونه های ویروسی (H9N2) جدا شده از فیلد و آنتی سرم استاندارد استفاده شده

مشخصات آنتی سرم استاندارد استفاده شده برای ردیابی تحت تیپ N2	Accession No	H9N2 ویروس
(A/Duck/HongKong/196/77(H1N2	HM165469	A/Ck/Ir/466/02
	HM165470	A/Ck/Ir/92/03
	HM165471	A/Ck/Ir/133/04
	HM165472	A/Ck/Ir/68/06
	HM165473	A/Ck/Ir/sh-2/07



شکل ۱- نتیجه تست ممانعت از نورآمینیداز تحت تیپ N1 در لوله شیشه ای با استفاده از ویروس استاندارد. به ترتیب از چپ به راست شاهد ویروس، بلانک(شاهد سوبسترا)، نمونه سرمی مشکوک

از جمله RT-PCR Real-time نیاز به تجهیزات، مواد خاص، کارشناس خبره دارد ضمنا با توجه به طبیعت متغیر ویروس‌های آنفلوانزا و اینکه پرایمرها برای شناسایی قطعاتی محدود از ویروس طراحی می‌شوند، امکان خطا در روشهای مولکولی و کاهش حساسیت تست و در نتیجه نیاز به تغییر پرایمرها یا راه‌اندازی مجدد آن با گذشت زمان وجود دارد. اما تست ممانعت از نورآمینیداز روشی سرولوژیک است که بدون نیاز به تجهیزات یا امکانات خاص قابل راه‌اندازی بوده و نیازی به تغییر روش یا مواد با گذشت زمان ندارد. با در نظر گرفتن اینکه تست ممانعت از نورآمینیداز امکان بررسی تحت تیپ N ویروس آنفلوانزا در نمونه‌های سرمی را می‌دهد اما روش‌های مولکولی تنها زمانی کاربرد دارند که نمونه ویروسی مثلا سواب یا بافت در دسترس باشد بنابراین در برنامه‌های سرواپیدمیولوژی و در نبود روش‌های مولکولی روشی کاربردی خواهد بود. از لحاظ نوع تحت تیپ نمونه‌های به کار رفته در این تحقیق همزمان با تست واکنش زنجیره پلی‌مراز تایید شدند. بعلاوه در این تحقیق حضور یا به عبارتی حفظ فعالیت آنزیمی نورآمینیداز در آنتی‌ژن‌هایی که با روش‌های استاندارد غیرفعال شده‌اند نیز ارزیابی شد. در مطالعات آنتی ژنیکی روی ویروس‌های فوق حاد آنفلوانزا یا ویروس‌هایی که خطر پاندمی برای انسان دارند برای مقابله با خطرات بهداشت عمومی یا باید از هودهای BSL3 که هزینه بر و وقت‌گیر است استفاده کرد یا با روش‌های استاندارد ویروس‌ها را غیرفعال کرد. تا کنون مطالعات متعددی جهت بررسی روش‌های غیر فعالسازی ویروس‌های آنفلوانزا صورت گرفته و حفظ و بقای عملکرد گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس‌های آنفلوانزا و خصوصیات آنتی‌ژنی شان پس از غیرفعال‌سازی را گزارش کرده‌اند (۹،۷،۵،۴). هر چند در این میان مطالعات کمی روی خواص نورآمینیداز پس از غیرفعالسازی تمرکز کرده‌اند. جونز و همکاران (۲۰۱۰) حفظ فعالیت نورآمینیداز در ویروس‌های غیرفعال شده آنفلوانزا در سه روش غیرفعالسازی را گزارش و بهترین فعالیت نورآمینیدازی و هماگلوتیناسیون را در نمونه‌های غیرفعال شده با فرمالین گزارش کردند (۸). مشابه نتایج جونز و همکاران بقای فعالیت پروتئین‌های هماگلوتینین و نورآمینیداز ویروس‌های آنفلوانزا در روش‌های ممانعت از هماگلوتیناسیون و ممانعت از نورآمینیداز در مطالعه حاضر مشاهده شد. این نتایج امکان بررسی خصوصیات HA و NA ویروس‌های آنفلوانزای فوق حاد بدون استفاده از هودهای BSL3 و تجهیزات محافظت کننده و با استفاده از ویروس‌های غیرفعال شده را مهیا می‌سازد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به موفقیت در راه‌اندازی این تست در آزمایشگاه بیماری‌های طیور موسسه رازی، و محدود بودن تعداد نمونه‌های مورد آزمایش، ضروری است تا موسسه نسبت به تهیه آنتی‌سرم و آنتی‌ژن‌های استاندارد برای انواع تحت تیپ‌های نورآمینیداز اقدام نماید و تست را حداقل برای مهم‌ترین تحت تیپ‌های در گردش یا گزارش شده در کشور، با توجه به واکسن‌های مورد استفاده در برنامه واکسیناسیون آنفلوانزای فوق حاد راه‌اندازی نموده و از آن به عنوان آزمون تکمیلی در کنار تست‌های مولکولی جهت تایید تشخیص استفاده کند.

سپاسگزاری

هزینه‌های این مطالعه در قالب پروژه تحقیقاتی مصوب به شماره ۲-۱۸-۱۸-۰۵۵-۹۶-۶۸۲ تامین شده است.

منابع مورد استفاده

1. Aminoff, D .1961. Methods for the Quantitative Estimation of N-Acetylneuraminic Acid and their Application to Hydrolysates of Sialomucoids. *Biochemistry Journal* 81: 384-392

2. Aymard-Henry, M., M. T. Coleman, W. R. Dowdle, W. G. Laver, G. C. Schild, and R. G. Webster.1973.Influenzavirus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures. *Bulltein*

of world Health organization 48: 199-202

3. Capua, I., C. Terregino, G. Cattoli, F. Mutinelli and J. F. Rodriguez. 2003. Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathology* 32: 47-55

4. De Benedictis, P., M. S. Beato and I. Capua. 2007. Inactivation of avian influenza viruses by chemical agents and physical conditions: a review. *Zoonoses Public Health* 54:51–68.

5. De Flora, S. and G. Badolati. 1973. Thermal inactivation of untreated and gamma-irradiated A2-Aichi-2-68 influenza virus. *Journal of Genetic Virology* 20:261–26

6. Fereidouni, S. R., E. Starick, C. Grund, A. Globig, T.C. Mettenleiter, M. Beer and T. Harder.2009. Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses. *Veterinary Microbiology* 135:253-260

7. Goldstein, M. A. and N. M. Tauraso. 1970. Effect of formalin, _-propiolactone, merthiolate, and ultraviolet light upon influenza virus infectivity, chicken cell agglutination, hemagglutination, and antigenicity. *Applied Microbiology* 19:290–294

8. Jonges M, W. M. Liu , E. vander Vries , R. Jacobi, Pronk I, C. Boog , M. Koopmans , A. Meijer and E. Soethout .2010.Influenza Virus Inactivation for Studies of Antigenicity and Phenotypic Neuraminidase Inhibitor Resistance Profiling. *Journal of Clinical Microbiology* 48:928-40.

9. King, D. J. 1991. Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum. *Avian Disease* 35:505–514.

10. Murphy, B. R., J. A. Kasel and R.M. Chanock.1972. Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man. *The New England Journal of Medicine* 286: 1329-1332.

11. OIE.2016. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.Chapter 2.3. 4.Avian influenza. Available on line : https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf accessed at: 2018/08/31

12. Sandbulte, M. R., J. Gao, T. M. Straight and M. C. Eichelberger.2009. A miniaturized assay for influenza neuraminidase inhibiting antibodies utilizing reverse genetics-derived antigens. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 3: 233–240

13. Schulman, J. L., M. Khakpour and E. D. Kilbourne.1968. Protective effects of specific immunity to viral neuraminidase on influenza virus infection of mice. *Journal of Virology* 2: 778-786.

14. Shtyrya, Y. A., L. V. Mochalova and N. V. Bovin.2009.Influenza Virus Neuraminidase: Structure and Function. *Acta Nature* 2:26-32

15. Terregino, C. and I. Capua.2009. Conventional diagnosis of avian influenza.pp.73-86, In: Capua, I., and D. Alexander(ed), Avian Influenza and Newcastle Disease, Afield and Laboratory manual. Springer-verlag, Milan.

16. Tsukamoto, K., T., Ashizawa, K., Nakanishi, N., Kaji, K., Suzuki, Shishido, M., Okamatsu, M. and Masaji Mas. 2009. Use of Reverse Transcriptase PCR to Subtype N1 to N9 Neuraminidase Genes of Avian Influenza Viruse. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 2301-2303

17. Vatandour, S., M. Bozorgmehrifard, H. Shoushtari, S. Charkhkar and S. Bakhtiari. 2011. Molecular characterization and phylogenetic analysis of neuraminidase gene of avian Influenza H9N2 viruses isolated from commercial broiler chicken in Iran during a period of 1998-2007. *African Journal of Microbiology Research* 5: 4182-4189.