DOI: 10.22092/vj.2019.123233.1493
شماره ۱۲۵ زمستان ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

# بررسی هم‌خوانی دو نوع پرایمر RT-PCR جهت تشخیص ویروس آنفلوانزای پرندگان (H9N2)

• **کامران محمدباقرپور**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، شهرقدس، ایران
• **هادی پورتقی (نویسنده مسئول)**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
• **حسین حسینی**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۶-۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۱۲-۰۷

Emali: hadi.pourtaghi1@gmail.com

**چکیده**

**هدف از انجام این تحقیق استفاده از دو نوع پرایمر RT-PCR برای تشخیص ویروس آنفلوانزای H9N2 پرندگان و مقایسه هم‌خوانی این دو روش نسبت به همدیگر بود تا مشخص شود کدام روش در رقت‌های متوالی تهیه شده دارای آستانه تشخیص بیشتری است. برای این منظور میزان EID50 ویروس آنفلوانزایی که با استفاده از کشت و کیت‌های تجاری مورد تایید قرار گرفته بود، با استفاده از روش Reed and Muench مشخص شد. تیتر ویروس $10^6$ EID50 در میلی‌لیتر بود. از ویروس آنفلوانزای مذکور اقدام به تهیه رقت بر اساس لگاریتم دو شد و با استفاده از کیت RNA Pure ساخت شرکت سیناژن اقدام به خالص‌سازی ژنوم موجود در نمونه‌های رقیق شد. پس از تهیه cDNA برای تشخیص ویروس آنفلوانزا از پرایمرهای منتشر شده در مقالات Wu et al. 2008 و Spackman et al. 2002 استفاده شد. واکنش‌های RT-PCR برای تشخیص ژن ماتریکس (*M*) ویروس آنفلوانزای پرندگان بود که هر کدام به ترتیب قطعاتی به اندازه ۱۳۱ و ۱۰۰ جفت باز را تشخیص می‌دهند. همچنین برای اطمینان از اختصاصی بودن دو جفت پرایمر مذکور از نمونه ویروس‌های واکسن برونشیت H۱۲۰ و ویروس واکسن نیوکاسل B۱ به عنوان کنترل منفی استفاده شد. هر دو روش نسبت به تشخیص ویروس آنفلوانزا اختصاصی بودند و هیچ کدام از روش‌های مذکور در مورد ویروس برونشیت و نیوکاسل باند تشکیل ندادند. روش Wu et al. 2008 تا رقت ۱:۴۰۹۶ و ۱۶۸ کپی از ژنوم در میلی‌لیتر و روش Spackman et al. 2002 تا رقت ۱:۲۰۴۸ و ۳۳۶ کپی از ژنوم در میلی‌لیتر توانستند مشخص کنند. لذا پرایمرهای مربوط به روش Wu et al. 2008 حساس‌تر از روش دیگر می‌باشد.**

**کلمات کلیدی: آنفلوانزای پرندگان، H۹N۲، RT-PCR، هم‌خوانی**

Veterinary Researches & Biological Products No 125 pp: 38-43

**Correlation between Two RT-PCR Primers in Detection of Avian Influenza Viruses (H۹N۲)**

*By: Pourtaghi, H., (Corresponding Author) Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. Mohammad Bagher Pour, K., Department of Microbiology, College of basic sciences, Shahre Qods branch of Islamic Azad University, Shahre Qods, Iran. and Hosseini, H., Department of Clinical Science, College of veterinary medicine, Karaj branch of Islamic Azad University, Karaj, Iran.*

**Received: 2018-09-04** **Accepted: 2019-02-26**

Emali: hadi.pourtaghi1@gmail.com

The goal of current study was comparison of two RT-PCR primers in detection of H9N2 influenza viruses. We compare correlation between two methods to determine which method in serial dilution can detect more samples. First, EID50 of an avian influenza virus was calculated by Reed-Muench method. The titer of virus was $10^6$ EID50/ml. Then, we prepare two fold serial dilution of virus. Then, genome was extracted by RNA Pure kit (Cinna-Gene, Iran). Two separate one step RT-PCR methods were used to detection of avian influenza virus (Wu et al. 2008 and Spackman et al. 2002). Target gene of both methods was matrix (*M*) gene. Product size that produced by both methods were 131 bp and 100 bp respectively. To ensure about specifity of two RT-PCR primers, we used H120 vaccine and B1 vaccine as negative control. Both methods were specific to avian influenza virus and none of them did not produce any amplicons when used other respiratory disease viruses as template. The Wu et al, 2008 primers was able to detect avian influenza virus to 1:4096 and 168 copy number/ml but, Spackman et al, 2000 primers was only able to detect 1:2048 and 336 copy number/ml. So, the Wu et al, 2008 primers was more sensitive method in detection of avian influenza viruses.

**Keywords:** Avian Influenza Virus, H9N2, Correlation

## مقدمه

تمام ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان (AI) به جنس آنفلوانزا A از خانواده ارتومیکسوویریده مربوط هستند که شامل ویروس‌هایی با ژنوم RNA تک رشته قطعه قطعه می‌باشد. بر اساس داشتن یکی از ۱۶ نوع پروتئین از نظر آنتی‌ژنیک متفاوت هماگلوتینین (HA) و همچنین یکی از ۹ نوع پروتئین نورآمینیداز (NA)، ویروس‌های آنفلوانزا A را در پرندگان می‌توان به تحت گونه‌های مختلف تقسیم‌بندی کرد (۳).

بر اساس توانایی ویروس‌های آنفلوانزای A در ایجاد بیماری، آلودگی به آن‌ها را می‌توان به دو گروه متفاوت تقسیم بندی کرد. ویروس‌های آنفلوانزای بسیار بیماری‌زای پرندگان (HPAI) که می‌توانند باعث تلفات بالا در پرندگان شوند. این گروه به دو تحت تیپ H۵ و H۷ محدودند. با این وجود تمامی ویروس‌های مربوط به این تحت تیپ‌ها نمی‌توانند باعث HPAI شوند. تمامی بقیه ویروس‌های آنفلوانزا باعث بیماری به مراتب ملایم‌تری می‌شوند که به صورت بیماری اولیه دستگاه تنفسی و کاهش تولید تخم مرغ بروز پیدا می‌کند. به این دسته از ویروس‌های آنفلوانزا، ویروس‌های آنفلوانزای با بیماری‌زایی کم پرندگان (LPAI) گفته می‌شود. بعضی وقت‌ها عفونت‌های هم زمان یا تاثیر شرایط نامناسب محیطی می‌تواند باعث تشدید آلودگی با LPAI شده و باعث بیماری به مراتب شدیدتری شود. هر دو HPAI و LPAI بیماری به شدت مسری را ایجاد می‌کنند که در گله‌های حساس در یک بازه زمانی کوتاه توانایی سرایت دارند. این موضوع می‌تواند اثر ویرانگر بر صنعت طیور به خصوص در مراکز پر تراکم پرورش طیور داشته باشد (۲).

طی رخداد بیماری آنفلوانزا تشخیص سریع جهت کنترل بیماری از نظر برنامه زمانی بسیار حیاتی است. هرگونه تاخیر در تشخیص یا پاسخ به رخداد بیماری امکان گسترش ویروس را فراهم کرده و در نتیجه امکان ریشه‌کنی به مراتب سخت‌تر خواهد شد (۱۲).

شناسایی گله‌های آلوده گامی اساسی در اهداف ریشه‌کنی آنفلوانزا است زیرا امکان اجرای تدابیر محدود کننده و کنترل کننده را فراهم می‌سازد. برای اهداف تشخیصی انتخاب نمونه مناسب و روش آزمایش مناسب دارای اهمیت بسیار زیادی است تا جایی که می‌تواند تشخیص را سریع و قابل اعتماد سازد. مطالعات پایشی بر روی ویروس آنفلوانزای پرندگان در پرنده فروشی‌ها حاکی از آن است که نمونه‌های اخذ شده از نای به مراتب بهتر از نمونه‌های اخذ شده از کلواک و یا نمونه‌های جمع آوری شده از محیط می‌باشد. کشت ویروس (VI) از سواب یا نمونه‌های پاتولوژیکی در تخم‌مرغ‌های عاری از پاتوژن اختصاصی (SPF) و سپس تعیین نوع پروتئین هماگلوتینین و نورامینیداز با استفاده از روش‌های سرولوژیک به عنوان روشی معمول و استاندارد جهت بررسی آلودگی یا عدم آلودگی گله به ویروس آنفلوانزا می‌باشد (۱۵). با این وجود،

کشت ویروس روشی مشکل و زمان‌بر می‌باشد و زمان انجام آزمایش اغلب منطبق با نیازهای سازمان‌های مرتبط با پرورش طیور مثل سازمان دامپزشکی و وزارت جهادکشاورزی نمی‌باشد. با توجه به اینکه نقل و انتقال گله‌ها به منظور کشتار و یا فروش نیاز به منفی بودن نتایج کشت دارد، با توجه به کند بودن و زمان‌بر بودن کشت، تاخیر در جابه‌جایی طیور تا مشخص شدن نتیجه کشت قضیه‌ای مهم است که باعث بروز مشکلات فراوان در صنعت طیور می‌شود. لذا زمانی که اپیدمی آنفلوانزا اتفاق می‌افتد، تست سریع و قابل اعتماد آزمایشگاهی باید در دسترس باشد که آلودگی گله‌ها را در مناطق آلوده مشخص نماید. همچنین زمانی که بیماری آنفلوانزا در بین جمعیت‌های طیور یک منطقه پر تراکم از نظر پرورش طیور رخ می‌دهد، تعداد زیادی از نمونه‌ها جهت آزمایش جمع‌آوری می‌شود که این تعداد زیاد نمونه به تعداد زیادی تخم‌مرغ SPF برای انجام کشت نیاز دارند که معمولاً این تعداد در یک بازه زمانی کوتاه در دسترس نیست (۹). لذا وجود آزمایشی جایگزین که سریع و قابل اعتماد باشد لازم به نظر می‌رسد.

لذا هدف از انجام این تحقیق استفاده از دو نوع پرایمر RT-PCR برای تشخیص ویروس آنفلوانزای پرندگان و مقایسه میزان هم‌خوانی این دو روش نسبت به همدیگر می‌باشد تا مشخص شود کدام روش در رقت‌های متوالی تهیه شده قدرت تشخیص بیشتری دارد. همچنین این دو نوع پرایمر RT-PCR در نمونه‌های بالینی نیز مقایسه خواهند شد تا مشخص شود کدام مورد نمونه‌های بیشتری را از نظر آلوده بودن به ویروس آنفلوانزای پرندگان می‌تواند مشخص کند.

## مواد و روش‌ها

ابتدا جهت تعیین حساسیت روش‌های RT-PCR نیاز به ویروس آنفلوانزای جداسازی شده و تایید شده بود که در این مورد از ویروس آنفلوانزای پرندگان (H9N2) که از مزارع پرورشی در طی ابتلا به بیماری آنفلوانزای پرندگان در سال ۱۳۹۶ با استفاده از کشت تخم‌مرغ جنین‌دار جداسازی شده و در بخش ویروس شناسی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران مورد تایید قرار گرفته بود، استفاده شد. لذا در گام اول اقدام به تعیین مقدار EID۵۰ ویروس شد. برای این منظور رقت‌های متوالی بر اساس لگاریتم ۱۰ از ویروس جداسازی شده، تهیه شده و از هر رقت در ۵ تخم‌مرغ جنین‌دار SPF به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر تزریق شد و میزان EID۵۰ بر اساس فرمول Reed and Muench تعیین شد (۷). بعد از مشخص شدن EID۵۰ ویروس آنفلوانزای مذکور اقدام به تهیه رقت از ویروس بر اساس لگاریتم دو به ترتیب زیر تهیه شد ۱/۲ ، ۱/۴ ، ۱/۸ ، ۱/۱۶ ، ۱/۳۲ ، ۱/۶۴ ، ۱/۱۲۸ ، ۱/۲۵۶ ، ۱/۵۱۲ ، ۱/۱۰۲۴ ، ۱/۲۰۴۸ ، ۱/۴۰۹۶ ، ۱/۸۱۹۲ ، ۱/۱۶۳۸۴. سپس از هر رقت تهیه شده با استفاده از کیت RNA Pure ساخت شرکت سیناژن اقدام به خالص سازی ژنوم ویروس‌های احتمالی موجود در رقت‌های سریال شد. سپس با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) از تمامی رقت‌ها cDNA تهیه شد. ویژگی این کیت این است که دارای پرایمرهای ۸ نوکلئوتیدی موسوم به Random Hexamer هست که توانایی چسبیدن به هر نوع RNA را در نمونه داشته و لذا شانس تولید DNA از هر نوع RNA مربوط به هر عامل عفونی به وجود می‌آید. برای تشخیص ویروس آنفلوانزا از پرایمرهای منتشر شده در مقالات Wu et al. 2008 و Spackman et al. 2002 استفاده شد (۱۶ و ۱۰). این واکنش‌های RT-PCR برای تشخیص ژن ماتریکس (*M*) ویروس آنفلوانزای پرندگان بود (جدول ۱). بدین وسیله بررسی شد که هر دو واکنش RT-PCR امکان تشخیص ویروس آنفلوانزا را تا چه رقتی از EID۵۰ ویروس آنفلوانزای مذکور دارند و حساسیت نسبی این دو نوع پرایمر در تشخیص ویروس آنفلوانزا با یکدیگر مقایسه شد.

همچنین برای اطمینان از اختصاصی بودن دو جفت پرایمر به جای ژنوم ویروس آنفلوانزا از سایر ویروس‌های تنفسی پرندگان شامل برونشیت عفونی و نیوکاسل به عنوان الگو برای مقایسه ویژگی (Specifity) دو روش RT-PCR استفاده شد. بدین منظور از نمونه ویروس‌های واکسن برونشیت H۱۲۰ و ویروس واکسن نیوکاسل B۱ به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول۱- پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص ویروس آنفلوانزا نوع A

| ژن | توالی پرایمر ۵′ -۳′ | برنامه RT- PCR[a] | اندازه محصول (bp) | منبع |
|---|---|---|---|---|
| *M* | F: AGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTAT<br>R: GGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCAT | ۱ | ۱۳۰ | Wu, et al. ۲۰۰۸ |
| *M* | F: AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG<br>R: TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG | ۲ | ۱۰۰ | Spackman et al. ۲۰۰۲ |

**a: 1 = 35 × (94°C 10-s, 56 °C 15-s, 72°C 15-s); 2 = 35 × (94°C 10 -s, 58°C 15-s, 72°C 15-s)**

بعد از Set Up واکنش‌های RT-PCR و تعیین حساسیت این دو نوع پرایمر در تشخیص ویروس آنفلوانزای پرندگان، اقدام به تعیین حساسیت این دو نوع پرایمر در تشخیص ویروس آنفلوانزای پرندگان در نمونه‌های بالینی اخذ شده از گله‌هایی که از نظر بالینی مشکوک به ابتلا به بیماری آنفلوانزا هستند، شد و مجدداً حساسیت نسبی این دو روش RT-PCR با یکدیگر مقایسه شد. برای این منظور نمونه‌های ارجاعی به آزمایشگاه مشکوک به آنفلوانزای پرندگان (H9N2) مورد ارزیابی قرار گرفت. از هر گله سه سواب از نای پرندگان تهیه شده و از این سه سواب اخذ شده، به صورت Pooled اقدام به استخراج ژنوم با استفاده از کیت RNA Pure ساخت شرکت سیناژن شد. سپس نمونه از نظر حضور ویروس با دو روش RT-PCR تنظیم شده، بررسی شد. در مجموع حساسیت نسبی این دو نوع پرایمر در تشخیص نمونه‌های بالینی در نه گله مورد ارزیابی قرار گرفت.

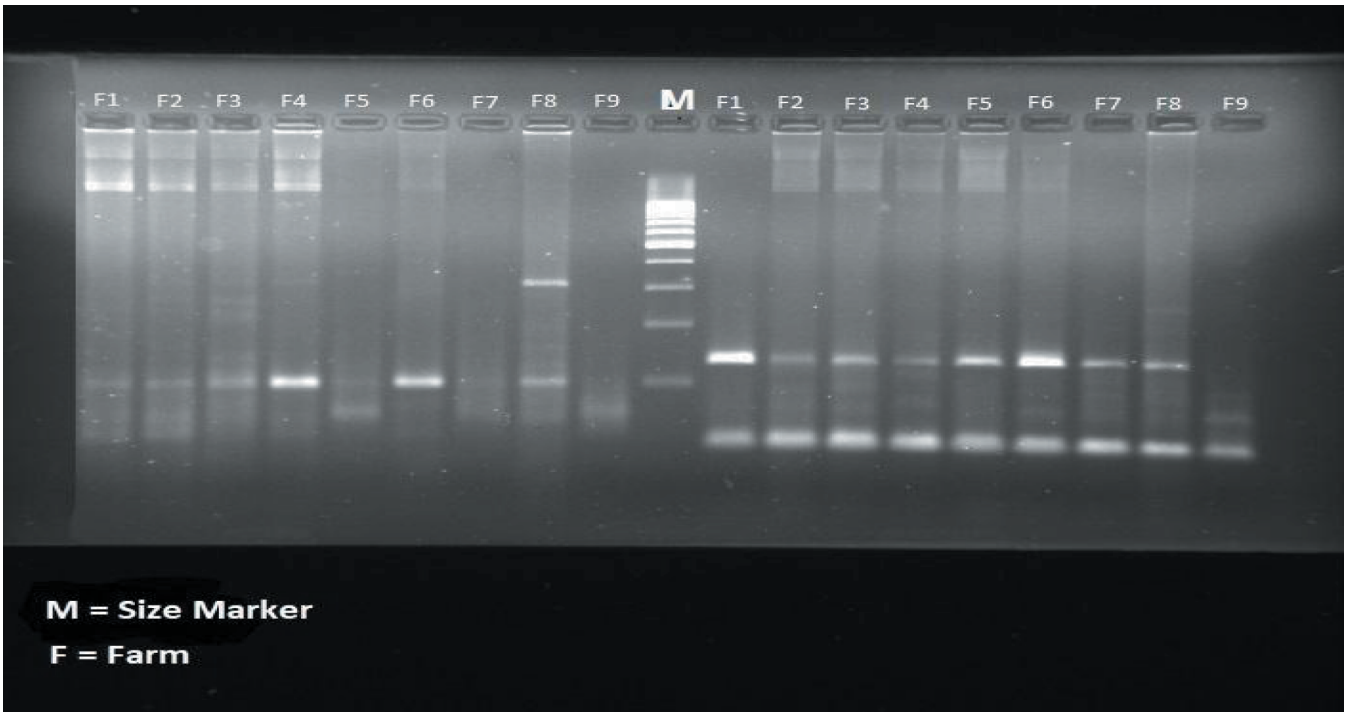
## نتایج

میزان EID۵۰ ویروس آنفلوانزای مورد تایید بر اساس فرمول Reed and Muench $۱۰^{۶}$ EID۵۰ بر میلی لیتر بود. در ادامه میزان PFU بر میلی‌لیتر بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (۵).

PFU/ml = ۰/۶۹ × EID۵۰

که بر اساس فرمول فوق تعداد ویروس آنفلوانزای موجود در یک میلی لیتر $۶/۹ \times ۱۰^{۵}$ محاسبه شد.

برای بررسی حساسیت دو روش مورد بررسی RT-PCR بعد از تهیه رقت سریال بر اساس لگاریتم دو و استخراج ژنوم توسط ویروس از هر رقت توسط کیت و انجام RT-PCR بر اساس پرایمرهای منتشر شده در مقالات Wu et al. 2008 و Spackman et al. 2002 مشخص شد که پرایمرهای منتشر شده در مقاله Wu et al. 2008 توانایی شناسایی ویروس آنفلوانزا را تا رقت ۱/۴۰۹۶ EID۵۰ بر میلی لیتر معادل با ۱۶۸ کپی از ژنوم در میلی لیتر را داشتند و پرایمرهای منتشر شده در مقاله Spackman et al. 2002 توانایی شناسایی ویروس آنفلوانزا را تا رقت ۱/۲۰۴۸ EID۵۰ بر میلی‌لیتر معادل با ۳۳۶ کپی از ژنوم در میلی لیتر را دارا بودند. مشاهده باندی به اندازه ۱۳۱ و ۱۰۰ جفت باز را در الکتروفورز به ترتیب در روش‌های Wu et al. 2008 و Spackman et al. 2002 نشانگر توانایی تشخیص ویروس آنفلوانزا در رقت مربوطه بود. در بررسی ویژگی دو روش RT-PCR از نمونه ویروس‌های واکسن برونشیت




شکل ۱- ژل آگارز ۱/۵ درصد مربوط به RT-PCR در نمونه‌های مربوط به ۹ فارم مشکوک به آنفلوانزا با روش‌های Wu و Spackman. سمت چپ تصویر مربوط به نتایج Spackman. حفره‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۶ و ۸ موارد مثبت با محصولی به اندازه ۱۰۰ جفت باز و حفره‌های ۵، ۷ و ۹ نمونه‌های منفی. سمت راست تصویر مربوط به روش Wu. حفره‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ موارد مثبت با محصولی به اندازه ۱۳۰ جفت باز و حفره ۹ نمونه منفی. M: مارکر ۱۰۰۰-۱۰۰ جفت باز.

H۱۲۰ و ویروس واکسن نیوکاسل B۱ به عنوان کنترل منفی استفاده شد. هر دو روش RT-PCR منحصراً ویروس آنفلوانزا را تشخیص داده و باند اختصاصی مربوط به خود را در الکتروفورز تشکیل دادند ولی در مورد ویروس‌های برونشیت و ویروس نیوکاسل هیچ باند اختصاصی مشاهده نشد.

در ادامه حساسیت روش‌های RT-PCR در نمونه‌های بالینی بررسی شد. از نه فارم که مشکوک به ابتلا به بیماری آنفلوانزا بودند اقدام به انجام RT-PCR شد که پرایمرهای منتشر شده در مقاله Wu et al. 2008 از نه فارم هشت فارم را آلوده به ویروس آنفلوانزا تشخیص داد و فارم نه غیر آلوده تشخیص داده شد. پرایمرهای منتشر شده در مقاله Spackman et al. 2002 از نه فارم شش فارم را آلوده به ویروس آنفلوانزا تشخیص داد و فارم‌های پنج و هفت و نه را غیر آلوده تشخیص داده شد (شکل ۱).

## بحث

در سال‌های اخیر اپیدمیولوژی بیماری آنفلوانزا دچار تغییراتی شده و به نظر می‌رسد هم میزان اپیدمی‌های ناشی از آنفلوانزای فوق حاد و هم طیف پرندگانی که به این بیماری مبتلا می‌شوند رو به افزایش است (۱ و ۳). لذا تشخیص ویروس آنفلوانزا در برنامه‌های مرتبط با اپیدمیولوژی و کنترل بیماری آنفلوانزا بسیار مهم و حیاتی می‌باشد (۹).

WHO و OIE چندین تکنیک را برای تشخیص بیماری آنفلوانزا پیشنهاد کرده‌اند. این روش‌ها شامل الیزا، ممانعت از هماگلوتیناسیون و ممانعت از نورامینیداز، کشت در تخم‌مرغ جنین‌دار و کشت در سلول، انتشار در ژل (AGID) و هر دو روش‌های Real Time RT-PCR و RT-PCR معمول می‌باشد. تعیین نوع پروتئین هماگلوتینین و نورامینیداز با روش الیزا به عنوان استاندارد طلایی برای تعیین تحت گونه‌های ویروس آنفلوانزای پرندگان به کار می‌رود (۱۳). با این حال روش‌های الیزا، ممانعت از هماگلوتیناسیون و ممانعت از نورامینیداز به آنتی‌بادی اختصاصی نیاز دارند و ممکن است برای تشخیص ویروس آنفلوانزایی که به تازگی پیدا شده است مناسب نباشد. تکثیر ویروس در تخم مرغ جنین‌دار و یا کشت سلولی می‌تواند مقدار زیادی ویروس را برای شناسایی و تعیین گونه در اختیار قرار دهد، با این وجود این روش حداقل به ۳ تا ۷ روز نیاز دارد و شرایط کشت برای هر سویه باید بهینه شود. AGID به مقدار زیادی ویروس نیاز دارد که به این معنی است که ابتدا ویروس باید کشت شود. در مقابل این محدودیت‌های روش‌های کلاسیک، روش‌های جدید مثل RT-PCR هم برای تشخیص و هم برای تعیین نوع ویروس‌های آنفلوانزا می‌توانند به کار روند. روش‌های جدید محاسنی هم چون سریع بودن، تکرار پذیر بودن و تا حدی ارزان بودن را دارند (۹).

نتایج برخی از تحقیقات حاکی از آن است که حساسیت روش RT-PCR می‌تواند تا ۱۰۰ برابر بیشتر از روش کشت و جداسازی ویروس در تخم مرغ جنین‌دار یا کشت سلول باشد. روش RT-PCR امکان تشخیص مورد مثبت را حداکثر طی یک روز کاری دارد در حالی که روش‌های مبتنی بر کشت برای اعلام موارد مثبت و منفی، زمان بسیار طولانی‌تری را لازم دارند (۴).

حساسیت و ویژگی روش RT-PCR تا حدود زیادی تحت تاثیر توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای انتخاب شده است. در بسیاری از مطالعات انجام شده، توالی‌های نوکلئوتیدی انتخاب شده برای تشخیص ویروس‌های آنفلوانزا بر اساس پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های مربوط به هماگلوتینین و نورامینیداز می‌باشد (۶ و ۱۱). با توجه به اینکه ۱۶ نوع هماگلوتینین و ۹ نوع نورامینیداز متفاوت در ویروس‌های آنفلوانزا شناسایی شده، به دلیل همین تنوع فراوان در این ژن‌ها، امکان تشخیص توسط RT-PCR محدود به همان ژن خاص خواهد بود که پرایمر برای آن طرحی شده است. و به دلیل تنوع ژنتیکی حتی نوع میزبانی که ویروس آنفلوانزا باعث بیماری در آن شده نیز در موفقیت تشخیص RT-PCR تاثیرگذار خواهد بود. به طوری که حتی ویروس آنفلوانزا با ژن خاص که در میزبان‌های متفاوت باعث بیماری می‌شود، به دلیل تنوع ژنتیکی ممکن است با پرایمرهای اختصاصی مربوط به همان ژن هماگلوتینین و یا نورامینیداز در گونه‌های متفاوت شناسایی نشود (۴). به عبارت دیگر روش‌های مبتنی بر شناسایی ژن هماگلوتینین و نورامینیداز بیشتر برای تعیین گونه ویروس‌های آنفلوانزا مناسب هستند تا اینکه برای تشخیص مناسب باشند (۹). در این بین ژن‌های مربوط به ماتریکس و نوکلئوپروتئین و همچنین ژن‌های مربوط به پروتئین‌های غیر ساختاری تا حدود زیادی محافظت شده بوده و برای تعیین جنس ویروس‌های آنفلوانزا مناسب می‌باشند (۱۴). در مطالعه حاضر از پرایمرهای مربوط به ژن ماتریکس استفاده شده است. ژن ماتریکس حتی از ژن نوکلئوپروتین محافظت شده‌تر بوده و برای تشخیص ویروس‌های آنفلوانزای نوع A مناسب‌تر می‌باشد (۱۲).

در مقاله Spackman و همکاران بیان شده که در تعدادی از نمونه‌ها در روش کشت ویروس، مثبت شده‌اند در حالی که روش RT-PCR نتوانسته این موارد را به عنوان مورد آلوده به ویروس آنفلوانزا تشخیص دهد. در توضیح این امر بیان شده که احتمالاً این امر به دلیل تنوع در ژن ماتریکس است که باعث شده پرایمرهای طراحی شده مربوط به ژن ماتریکس نتوانند به خوبی توالی مربوطه را تکثیر کنند. در توضیح احتمال دیگر بیان شده که حجم نمونه به کار رفته جهت کشت نه برابر بیشتر از حجم به کار رفته در روش استخراج ژنوم می‌باشد واین امر شانس مثبت شدن برخی از نمونه را در روش کشت نسبت به RT-PCR فراهم کرده است. همچنین بیان شده که به دلیل حساسیت ژنوم به صورت RNA احتمالاً ژنوم ویروس طی مراحل نمونه‌گیری و انتقال از بین رفته باشد (۱۰). در حالی که در مطالعه حاضر پرایمرهای طراحی شده در روش Wu و همکاران حساسیت نسبی بیشتری را در تشخیص موارد مثبت نسبت به روش Spackman و همکاران داشتند و این امر نشانگر این مهم است که پرایمرهای طراحی شده در روش Wu و همکاران برای منطقه محافظت شده‌تری از ژن ماتریکس می‌باشند.

در مقاله Spackman بیان شده که RT-PCR به کار رفته دارای حد تشخیص معادل حدود ۱۰۰۰ کپی از RNA ویروس می‌باشد با این وجود در مطالعه حاضر حساسیت نسبی این روش معادل ۳۳۶ کپی از ژنوم بود که نشانگر حساسیت بیشتر نسبت به مقاله اصلی می‌باشد. در توضیح این امر باید گفت که روش RT-PCR به صورت تک مرحله‌ای دارای حساسیت به مراتب کمتری از RT-PCR به صورت دو مرحله‌ای است (۸) و در مطالعه حاضر از RT-PCR دو مرحله‌ای استفاده شده در حالی

که روش RT-PCR به کار رفته در مقاله اصلی به صورت تک مرحله‌ای بوده است (۱۰).

حساسیت روش به کار رفته در مقاله Wu و همکاران در حد ۱۰ تا ۱۰۰ کپی از ژنوم در میکرولیتر بوده در حالی که در مطالعه حاضر حساسیت روش به کار رفته در حدود ۱۶۸ کپی از ژنوم در میلی لیتر بوده که حساسیت بیشتری از مقاله اصلی مشاهده شده در توضیح این امر باید به این مورد اشاره کرد که در تحقیق انجام شده روش به کار رفته به صورت Multiplex Real time RT-PCR است که انجام آزمایش به صورت Multiplex باعث کاهش حساسیت می‌شود که این امر می‌تواند ناشی از تشکیل پرایمر دایمر و یا پروب پرایمر دایمر باشد که در نتیجه عملکرد بازدارنده بر روی واکنش می‌تواند داشته باشد (۱۷). این در حالی است که در مطالعه حاضر از روش Single RT-PCR استفاده شده، که این امر باعث افزایش حساسیت واکنش شده است و یا انجام واکنش به صورت دو مرحله‌ای می‌تواند دلیل این امر باشد (۸).

در کل باید بیان کرد که روش Wu و همکاران روشی حساس‌تر از روش Spackman و همکاران می‌باشد که در صورت استفاده به صورت واکنش دو مرحله‌ای حتی بر میزان حساسیت آن نسبت به مقاله اصلی افزوده شده و روش مذکور حساسیت بیشتری در شناسایی گله‌های مبتلا به ویروس آنفلوانزای پرندگان خواهد یافت.

## منابع مورد استفاده


1- Capua, I., Alexander, D, J. (2007). Avian influenza infections in birds - a moving target. Influenza. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 1:11-18.

2- Cattoli, G., Drago, A., Maniero, S., Toffan, A., Bertoli, E., Fassina, S., Terregino, C., Robbi, C., Vicenzoni, G., 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- Chatziprodromidou, I, P., Arvanitidou, M., Guitian, J., Apostolou, T., Vantarakis, G., Vantarakis, A. (2018). Global avian influenza outbreaks 2010-2016: a systematic review of their distribution, avian species and virus subtype. *BioMed Central* 7(17):1-12.

4- Fouchier, R, A., Bestebroer, T, M., Herfst, S., Kemp, L, V, D., Rimmelzwaan, G, F., 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(11):4096-4101.

5- Graentzdoerffer, A., Nemetz, C. (2003). Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *BioTechniques* 34:260-264.

6- Kyoung, C, H., Park, J, H., Song, M., Oh, T., Kim, S., Kim C., Kim, H., Sung, M., Han H., Hahn, Y., Choi, Y. (2008). Development of multiplex RT-PCR assays for rapid detection and subtyping of influenza type A viruses from clinical specimens. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(6):1164-1169.

7- Maclachlan, N, J., Dubovi, E, J. (2011). Virus replication. In: Fenner veterinary virology, Chapter 2, Academic Press.

8- Nakamura, S., Katamine, S., Yamamoto, T., Foung, S., Kurata, T., Hirabayashi, Y., Shimada, K., Hino, S., Miyamoto, T. (1993). Amplification and detection of a single molecule of human immunodeficiency virus RNA. *Virus Genes* 4:325-338.

9- Sakurai, A., Shibasaki, F. (2012). Updated values for molecular diagnosis for highly pathogenic avian influenza virus. *Viruses* 4:1235-1257.

10- Spackman, E., Senne, D, A., Myers, T, J., Bulaga, L, L., Garber, L, P., Perdue, M, L., Lohman, K., Daum, L, T., 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(9):3256-3260.

11- Spackman, E., Senne, D, A., Bulaga, L, L., Trock, S., Suarez, D, L. (2003). Development of multiplex real-time RT-PCR as a Diagnostic Tool for Avian Influenza. Avian Diseases 47:1087-1090.

12- Suarez, D, L., Das, A., Ellis, E. (2007). Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Diseases* 51:201-208.

13- Takimoto, S., Grandien, M., Ishida, M, A., Pereira, M, S., Paiva, T, M., Ishimaru, T., Makita, E, M., Martinez, C, H. (1991). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence assay, and virus isolation for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions. *Journal of Clinical Microbiology* 29:470-474.

14- Widjaja, L., Krauss, S, L., Webby, R, J., Xie, T., Robert G. Webster, R, G. (2004). Matrix gene of influenza A viruses isolated from wild aquatic birds: ecology and emergence of influenza A viruses. *Journal of Virology* 78(16):8771-8779.

15- World Health Organization. (2007). Guidelines on laboratory diagnosis of avian influenza. http://www.searo.who.int/LinkFiles/CDS_CDS-Guidelines-Laboratory.pdf.

16- Wu, C., Cheng, X., He, J., Lv, X., Wang, J., Deng, R., Long, Q., Wang, X. (2008). A multiplex real-time RT-PCR for detection and identification of influenza virus types A and B and subtypes H5 and N1. *Journal of Virological Methods* 148:81-88.

17- Zangenberg, G., Saiki, R, K., Reynolds, R. (1999). Multiplex PCR: optimization guidelines. In: PCR applications: protocols for functional genomics. Innis, M, A., Gelfand, D, H., Sninsky, J, J. Academic Press, San Diego, CA 73-94.