شناسایی RNAی ویروس سرخک در نمونه‌های غرغره گلوی بیماران مبتلا به سرخک با روش RT-PCR

شبنم رحیمی خامنه[1] ، طلعت مختاری آزاد[2]، رسول همکار[3]، محمود محمودی[4]، سید رضا سیدی رشتی[5] و رخشنده ناطق[6]

چکیده : نمونه های غرغره گلوی ۱۵ بیمار مبتلا به سرخک با روش سریع Reverse Transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفتند. در ۶ مورد (۴۰٪) RNAی ویروس سرخک شناسایی گردید. در بررسی کشت سلولهای B95 8 تلقیح شده با نمونه‌های فوق ، با روش ایمونوفلئورسانس غیر مستقیم ، ۱۱ مورد (۸۳/۳٪) مثبت تشخیص داده شد. دو مورد از موارد مثبت با روش RT-PCR منفی بودند بر عکس ۷ مورد مثبت با ایمونوفلئورسانس غیر مستقیم با RT- PCR منفی بودند ، که اولی بدلیل غیر فعال بودن ویروس در نمونه گلو و دومی به علت کم بودن میزان RNAی ویروس در نمونه گلو است. اهمیت روش RT-PCR در این است، که با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی ، قطعات خاصی از ژنوم ویروس سرخک تکثیر می‌گردد و با تعیین ترادف بازی و مقایسه آن در بین ویروسهای مختلف جدا شده ، منشا اپیدمی، سیر انتقال بیماری و سوش ویروس مشخص می شود. **واژه‌های کلیدی :** ویروس سرخک ، *RT-PCR* ، ایمونوفلئورسانس غیر مستقیم ، سلولهای *B95*و *VERO* و استخراج *RNA*

مقدمه

سرخک بیماری بسیار واگیری است ، که علیرغم وجود واکسن موثر بر علیه آن، همچنان موجب بروز موارد پراکنده و یا اپیدمی می‌شود. طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت (*WHO*) در سال ۱۹۹۸ تقریباً ۳۰ میلیون مورد سرخک و ۸۸۸۰۰۰ مرگ ناشی از سرخک در جهان روی داده است. اکثر مرگهای ناشی از سرخک در آفریقا و جنوب شرقی آسیا (۸۵٪) به وقوع پیوسته‌اند. (۲) در سال ۱۳۷۷ میزان بروز موارد تایید شده سرخک در ایران براساس آخرین گزارش چاپ شده وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی ۲/۴ درصد هزار نفر جمعیت بوده است. توزیع سنی موارد تایید شده نشان میدهد که ۷/۷٪ از موارد سرخک در گروه سنی ۴-۰ سال، ۱۴/۵٪ در گروه سنی ۹-۵ سال، ۲۰/۵٪ در گروه سنی ۱۴-۱۰ سال ۳۵/۷٪ در گروه سنی ۱۹-۱۵ سال و ۲۱/۶٪ در گروه سنی ۲۰< سال بوده است. (۱)

با توجه به اهمیت موارد تک گیر و اپیدمیهای سرخک ، گسترش برنامه‌های ایمن سازی و کنترل این بیماری در جهان و با در نظر گرفتن اهمیت ریشه‌کنی آن ، تشخیص سوشهای این ویروس در

[1] - دانشجوي دوره PhD ويروس شناسي ، دانشكده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشكي تهران
[2] - دانشيار بخش ويروس‌شناسي، دانشكده بهداشت، دانشگاه علوم پزشكي تهران
[3] - دانشجوي دوره PhD ويروس‌شناسي، دانشكده بهداشت، دانشگاه علوم پزشكي تهران
[4] - دانشيار بخش ويروس‌شناسي، دانشكده بهداشت، دانشگاه علوم پزشكي تهران
[5] - استاديار بخش ويروس‌شناسي، دانشكده بهداشت، دانشگاه علوم پزشكي تهران
[6] - استاد بخش ويروس‌شناسي، دانشكده بهداشت، دانشگاه علوم پزشكي تهران

نمونه‌های بالینی ضرورت دارد. برای تشخیص سرخک روشهای متعددی وجود دارد ؛ یکی از جدیدترین روشها ، تکنیک *Reverse Transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR)* میباشد که از آن برای شناسایی *RNA*ی ویروس سرخک استفاده میشود. (۳،۴) در این روش با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ، ژنهای خاصی مانند ژن نوکلئوپروتئین (*N*) و یا ژن پروتئین ماتریکس (*M*) که از مناطق بسیار تغییر پذیر در ژنوم ویروس سرخک بشمار می‌آیند- تکثیر داده میشود و با مطالعه ردیف بازی آنها تفاوتهای ژنتیکی ویروس سرخک تعیین میگردد (۵،۴) . ویروس از نظر سرولوژیک دارای یک تیپ است، ولی تیپهای وحشی جدا شده از این ویروس از نظر ژنتیکی هتروژن هستند. تاکنون بر مبنای مقایسه ردیف نوکلئوتیدی ژن نوکلئوپروتئین (*N*) حداقل ۱۵ ژنوتیپ از این ویروس شناسایی شده است(۱۶).

این تفاوتهای ژنتیکی ، اساس بررسی‌های اپیدمیولوژیک مولکولی را برای ویروس سرخک فراهم می‌سازد(۷،۶).

مواد و روشها

نمونه‌گیری:

از بیماران دارای علائم سرخک ؛ تب بالای ۳۸ درجه ، دانه‌های ماکولوپاپولار منتشر و حداقل یکی از علائم: سرفه، آب ریزش و یا ورم ملتحمه چشم، نمونه سرم و غرغره گلو گرفته شد.

نمونه‌های گلو سرم تا زمان آزمایش به ترتیب در دمای ۷۰- و ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.ابتدا برای تشخیص عفونت اولیه سرخک ، تعداد ۵۰ نمونه سرم با روش *Capture IgM EIA* از نظر وجود *IgM* اختصاصی سرخک مورد بررسی قرار گرفتند. ۱۵ نمونه غرغره گلو از بین موارد مثبت ، با توجه به اینکه ، فاصله زمانی بین نمونه‌گیری و بروز راش در آنها کمتر از ۷ روز باشد ، انتخاب گردید.

استخراج RNA :

RNA ویروس سرخک با روش شرح داده شده توسط *Sacchi , Chomczynski* (۱۹۸۷) استخراج گردید. ۲۵۰ میکرولیتر از غرغره گلو با ۷۵۰ میکرولیتر (*GTC*) *Guandinium thiocyanate* (گوانیدین تیوسیانات ۴ مولار ، سدیم سیترات ۲۵ میلی لیتر مولار *pH=7* ، *N* لوریل سارکوزین ۰/۵٪ ،

۲- مرکاپتواتانول ۰/۲ مولار) مخلوط گردید. سپس بمنظور حذف پروتئینها ، فاز آبی حاصل ۴-۳ بار به اندازه حجم خود با مخلوط فنل کلر فرم ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) تیمار گردید در انتها باید اطمینان حاصل شود که در محصول، پروتئینی باقی نمانده است. در ادامه برای حذف فنل، محلول حاصل به نسبت هم حجم با کلرفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) مخلوط گردید. برای رسوب دادن *RNA* موجود در فاز آبی ، محلول رویی به نسبت هم حجم با ایزوپروپانول مخلوط شد و سپس ۱۰٪ محلول استات سدیم ۳ مولار *PH=5.2* به آن اضافه گردید. پس از سه ساعت (یا شب تا صبح) نگهداری در دمای ۲۰ درجه ، *RNA* با سانتریفوژ کردن (۱۰ دقیقه در *g* ۱۴۰۰۰- ۱۰۰۰۰) رسوب داده شد. رسوب حاصل دوبار با اتانول ۷۵٪ شستشو داده شد تا *GTC* و ترکیبات فنلی کاملاً از محیط حذف شوند. رسوب خشک شده در دمای اتاق در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل که با دی اتیل پیروکربنات (*DEPC*) تیمار شده است- حل گردید. محلول حاصل باید تا هنگام آزمایش در فریز ۷۰- نگهداری شود(۱۰).

پرایمرها :

برای انجام *RT-PCR* از پرایمرهای زیر (اهدایی از سوی دکتر *PAUL ROTA* از *CDC* از آمریکا) استفاده شد.

Primer MV 61: CTT GTT TCA GAG ATT ATG CAT (24) N-seq 1178.

Primer MV 63 : GGC CTC TCG CAC CTA GTC TAG (21) N-rev 1597 .

Primer MV63N : T CTG TCA TTG TAC ACT ATA GG (210 63 NESTED

MV61 پرایمر جلو برنده (*FORWARD*) و *MV63* پرایمر برگردان (*REVERSE*) میباشد. از این دو پرایمر برای انجام *RT-PCR* قطعه ۴۲۰ بازی انتهای *C* ژن نوکلئوپروتئین (*N*) استفاده گردید. از این پرایمر در تعیین سکانس نیز میتوان استفاده نمود. پرایمر *MV63N* همراه با پرایمر جلوبرنده *MV61* ، در روش *Nested PCR* (اختصاصی ژن *N*) بکار برده شد.

تهیه C-DNA :

برای تهیه *C-DNA* قطعه ۴۲۰ بازی از ژن نوکلئوپروتئین (*N*) ، مخلوط واکنشی حاوی : حداکثر ۷-۵ میکروگرم *RNA*ی استخراج شده ، ۲ میکرولیتر بافر *10 X PCR* (کلرید پتاسیم ۵۰۰ میلی مولار ، *"PH=8/3" Tris – HCl* ۱۰۰ میلی مولار ، کلرید منیزیم ، ژلاتین ۰/۱٪ - از شرکت (*perkin Elmer*) ، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار ، ۲ میکرولیتر از مخلوط دی اکسی نوکلئوتیدها (*dNTP mix*) ۱۰ میلی مولار (برای هر کدام از دی اکسی نوکلئوتیدها) ، ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمر های جلوبرنده و برگردان (*MV63 , MV61*) ۲۰ میکرو مولار تهیه گردید. حجم نهایی مخلوط واکنش با آب مقطر دوبار تقطیر استریل تیمار شده با *DEPC* به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط فوق در دمای 95^{O} به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد و سپس به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق سرد گردید. و بعد به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت . پس از افزودن ۱۰ واحد آنزیم ترانس کریپتاز معکوس *Avian myeloblastosis Virus – Reserve transcriptase*) ساخت شرکت *Roch*) و ۲۰ واحد ممانعت کننده آنزیم ریبونوکلئاز (*Man Placental Rnase Inhibitor* ساخت شرکت *Roch*) مخلوط حاصل در حرارت 42^{O} به مدت ۴۵ دقیقه آنکوبه گردید. و سپس به منظور غیر فعال سازی آنزیم *RT-AMV* به مدت ۵ دقیقع در دمای 95^{O} قرار داده شد. (۸،۹).

مرحله PCR :

برای تکثیر قطعه ۴۲۰ بازی (سکانس ۱۱۷۸ تا ۱۵۹۷) ژن نوکلئوپروتئین (*N*) مخلوط واکنش *PCR* حاوی : ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای *MV63 , MV61* با غلظت ۲۰ میکرومولار ، ۴ میکرولیتر بافر *10 X PCR* فوق ، ۱۰ میکرولیتر محصول *C-DNA* و ۲/۵ واحد آنزیم *Taq DNA* پلی مراز (ساخت شرکت *ROCHE*) در میکروتیپ ۰/۵ میکرولیتری تهیه گردید. حجم نهایی مخلوط واکنش با آب مقطر دوبار تقطیر استریل تیمار شده با *DEPC* به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد پس از ۷ دقیقه دناتوره شدن در دمای 95^{O} *C* ، ۳۵ چرخه *PCR* شامل یک دقیقه ۹۵ درجه، یک دقیقه ۵۵ درجه ، یک دقیقه ۷۲ درجه انجام گرفت و در نهایت *PCR* با یک چرخه شامل ۵ دقیقه در ۷۲ درجه برای طویل شدن قطعات ناکامل خاتمه پذیرفت. در این روش آب مقطر به عنوان کنترل منفی، و *RNA*ی ویروس سرخک سوش ادمونستون (اهدایی جناب آقای دکتر عباس شفیعی از موسسه تحقیقات سرم و واکسن رازی) به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. محصولات بدست آمده بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید ، قطعه تکثیر یافته مشاهده شد.(۱۱)

کشت سلولی :

مناسبترین کشت سلولی برای جداسازی ویروس سرخک از نمونه‌های بالینی ، دو دمان سلولی *B95/8* است. منشا این دودمان سلولی دیپلوئیدی ، لنفوسیتهای ماروست است که توسط ویروس *Epstein –Bar* ترانسفورمه شده‌اند(۱۳،۴) . نمونه‌های گلوی بیماران در پلیت‌های ۲۴ خانه حاوی کشت سلول مذکور تلقیح گردید. بعد از گذشت ۷۲ ساعت (*cytopathic Effects*) *CPE* سرخک ، به صورت سلولهای غول آسا (*Giant cell*) همراه با کمرنگ شدن و از بین رفتن حاشیه سلولها ظاهر می‌شود. در بیشتر موارد *CPE* پس از پاساژ دوم و یا سوم مشاهده می‌شود. پس از گذشت یک هفته از تلقیح نمونه گلو حضور یا عدم حضور ویروس در کشت سلول با روش ایمونوفلئورسانس غیر مستقیم *IIF* (*Indirect Immunofluorescence*) و با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال سرخک مورد بررسی قرار گرفت (۱۸) .

نتایج

۱۵ نمونه غرغره گلو با روش *RT-PCR* مورد بررسی قرار گرفت، بررسی ژل الکتروفورز محصولات *RT-PCR* نشان داد که تنها در ۶ مورد قطعه مورد نظر از ژن *N* تکثیر یافته است . در شکل شماره ۱- دو مورد مثبت مشاهده میگردد.

بر روی محصولات *RT-PCR* ازمایش *Nested-PCR* انجام گرفت و باند دیگری که قدری کوچکتر از باند اولیه بود تشکیل گردید. این بررسی برای تایید روش *RT-PCR* انجام پذیرفت(شکل شماره ۲-). با استفاده از نشانگر وزن مولکولی (*Molecular weight marker*) و آزمایش *Nested –PCR* مشخص گردید که قطعه تکثیر یافته مربوط به ژن نوکلئوپروتئین (*N*) ویروس سرخک است و تقریباً ۴۲۰ باز طول دارد.

با روش تلقیح نمونه‌های گلو به کشت سلولی *B95* و انجام آزمایش ایمونوفلئورنسانس غیر مستقیم ۱۱ نمونه مثبت به دست آمد . نمونه‌های شماره ۴ و ۱۲ با روش *IIF*منفی بودند. ولی ازمایش *RT-PCR* روی نمونه مستقیم گلو مثبت میباشد . ۷ مورد مثبت با

روش تلقیح بـه کـشت سـلول و *IIF* در آزمـایش *RT-PCR* روی نمونه مستقیم گلو منفی بودند (جدول شماره ۱) .

بحث

در ایـن بررسـی ، نـسبت مـوارد مثبـت بـا روش *RT-PCR* ۴۰٪ میباشد. در بررسی مـشابهی کـه توسـط دکتـر *Hirko shimizu* و همکـارانش در سـال ۱۹۹۳ در ژاپـن انجـام گردیـد از ۳۸ نمونـه ترشحات بینی مورد بررسی، ۱۸ نمونه باروش *RT-PCR* بـرای ژن *M* (ماتریکس) مثبت شدند که بدین ترتیـب در صـد پاسـخ مثبـت ۴۷/۳۶٪ میباشد (۹) . در تحقیقی کـه توسـط دکتـر *Paul Rota* و همکاران در سال ۱۹۹۵ در آمریکا انجام گرفت ، درصد پاسخ مثبـت با روش *RT-PCR* بر روی نمونه‌های ادرار ، ۳۹٪ بوده است(۸).

از ۱۵ نمونه گلوی تلقیح شده به کشت سلولی *B95/8* ، در ۱۱ مورد آنتی ژنهای ویروسی با روش ایمونوفلئورسانس غیر مستقیم شناسایی شدند. در دو مورد (۱۲،۴) علیرغم مثبت بودن نتیجـه *RT-PCR* در مورد آنها ، تکثیر ویروس در کشت سلول و نتیجه *IIF* آن منفـی است. مشابه همین نتیجه در بررسی دکتـر *Hiroko Shimizu* نیـز دیده می‌شود که از ۳۸ نمونه مـورد بررسـی ، ۴ نمونـه از ترشـحات بینی بیماران با روش *RT-PCR* مستقیم مثبت بودند در حـالی کـه کشت ویروس و *IIF* آنها منفی است. و علت آن وجود ویروس غیـر فعال در نمونه مورد بررسی می‌باشد که قدرت تکثیر در کشت سلول ندارد. در مورد نمونه‌هایی که *RT-PCR* آنها منفی است ولی نتیجه *IIF* آنها مثبت است ، میتوان به میزان کم *RNA* ویروس در نمونـه گلو اشاره نمود ، کـه احتمـالاً مقـادیری از آن نیـز در طـی مراحـل استخراج از بین میرود و درنهایت منجر به پاسخ منفی میگردد.

در این بررسی طولانی‌ترین فاصله نمونه گیری از زمان بروز بثـورات ۵ روز بود و این موضوع شانس شناسـایی ویـروس در نمونـه گلـو و تکثیر آن در کشت سلول را افزایش می‌دهد. بنابراین برای شناسـایی سوشهای ویروس سرخک در نمونه‌های بالینی بـا روش *RT-PCR* بهتر است، ابتدا نمونه‌های بیماران در کشت سلولهای حساسی ماننـد *B95* و یا *VERO* تکثیر داده شود و پس از مشاهده *CPE* و تایید آن با روش ایمونوفلئورسانس *RNA*ی ویروس سرخک از سـلولهای آلوده استخراج گردد و سـپس بـر روی آنهـا آزمـایش *RT-PCR* انجام شود. بدین ترتیب احتمـال پاسـخ مثبـت بـا روش *RT-PCR* افزایش خواهد یافت.

با بررسی نتایج حاصل (جدول شماره ۱) و با در نظر گرفتن هزینه‌ها و زمان لازم برای انجام آزمایش مشخص می‌شود که روشـهای *IIF* روی کشت سلول تلقیح شده با نمونه گلو و *RT-PCR* ، در مقایسه با روش *Capture IgM EIA* ، روشهای مناسبی برای تـشخیص عفونت سرخک نیـستند ، امـا در بررسـیهای جدیـد بـرای شناسـایی ژنوتیپهای مختلف ویروس سرخک ، اپیدمیولوژی مولکولی و بررسی منشا سوشهای در حال گردش ویروس ، ترکیبی از این روشها مـورد استفاده قرار می‌گیرد؛ پس از کشت ویـروس در سـلولهای حـساسی مانند *B95* و یا *Vero* با روش *RT-PCR* قطعه‌ای از ژنوم ویروس تکثیر می‌گردد و با روشهای تعیین ترادف بـازی، تفاوتهـای ژنتیکـی آنها مورد بررسـی قـرار مـی‌گیـرد (۱۲، ۱۳ ، ۱۴، ۱۵) . تـاکنون بـا مقایسه ردیف توالی ژن نوکلئـوپروتئین (*N*) در ویروسـهای مختلـف جدا شده ، حداقل ۱۵ ژنوتیپ متفاوت از ویروس سـرخک شناسـایی شده است(۱۶).

با اجرای برنامه‌های واکسیناسیون پیش بینی شده است که سـرخک تا سال ۲۰۰۹ در جهان ریشه‌کن خواهد شد . و این امر در ایران نیـز همانند سایر کشورها خواهد بود. بنابراین به کمک روش *RT-PCR* و شناسایی ترادف ژنی ویروس سرخک (مثل *C* ترمینـال ژن *N*) می‌توان ژنوتیپ ویروسهای بومی سرخک کـشور را ، قبـل از برنامـه واکسیناسیون همگانی تعیین نمود. مقایـسه ژنـوم ایـن ویروسـها بـا ویروسهای سرخک جدا شـده بعـد از اجـرای برنامـه‌هـای همگـانی واکسیناسیون ، در شناسایی منشا اپیدمی و سـیر انتقـال بیمـاری در کشور کمک خواهد نمود. در نهایت ایـن امـر گـامی مهـم در رونـد ریشه‌کنی سرخک خواهد بود. این مطالعه اولین قدم برای اجرای این مهم بوده است.

منابع :

۱- گزارش کوتاه از وضعیت سرخک در جمهوری اسلامی ایران سال ۱۳۷۷ اداره کل مبارزه با بیماریهای واگیر- وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

.

2. Weekly Epidemiological Record, 1999, 74,429-440. World health organization, Geneve
3. Rima, Temporal B,K" Earle, J.A.P., Herliny, Y.L., Baczko, K. ter Meulen, V. (1995). and geographical distribution of measles virus genotypes. Journal of General Virology 76, 173-1180.
4. Rota, P.A., Bloom. A.E Van chiere J.A & Bellini W.J. (1994) Evolution of nucleoprotein and matrix genes of wild type strain of measles virus isolated from recent epidemics. Virology 198, 724-730.
5. Jin, L Brown, D.W.G Ramsay, M.E.B., Rota, P.A and bellini, W.J.(1997). The diversity of measles virus in the United Kingdom, 1992-1995. Journal of General Virology 78, 1287-1294.
6. Jin, L., Richards, A. & Brown, D.W.G. (1996). Development of a dual target-PCR for detection and characterization of measles virus. Journal of General Virology. 64, 700-705
7 . Nakayama, T., Mori, T., Yama guchi, 5., sonoda,S., Asamura ,5., Yama shita, R., Takeuchir,y. (1995) Detection of measles virus genome directly from clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and genetic variability. Virus Research 35,1-16
8. Rota P.A. Khan, A.S., Durigon, E., Yuran, T., Villamarzo, V.S., and Bellini, W.J (1995).Detection of measles virus RNA in Urine specimens from vaccine recipients. Journal of Clinical Microbiology. 33: 2485-2488.
9. Shimizu, H. Mc Carthy, C.A., Smaron, M.F. and Burns, J.C. (1993) Polymerase Chain Reaction for Detection of measles Virus in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology 31, 1034-1039.
10.Chomeznski,P.,and Sacchi,N.,1987. Singel Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction .Anal. Biochemical. 162: 156- 159
11 . Jones,P.,Qiu,J.,Rickwood,D., 1994. RNA Isolation and Analysis. Bios Scientific . publishers, UK.
12 . Saito, H., Nakagomi, O. and Morita, M,,(1995)Molecular Identification of two distinct hemagglutinin types of measles Virus by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Molecular and cellular probes. 9, 1-8.
13. Rota, J.S., Heath, J.L., Rota, P.A., King, G.E., Bellini, W.J., (1996) Molecular epidemiology of measles virus: Identification of path ways of transmission and Implications for measles elimination. The Journal of Infections Diseases 173: 32-7.
14. Xu, W., Tamin, A.,Rota, J.S., Zhang, L., Bellini, W.J. and Rota, P.A (1998). New genetic group of measles virus isolated in the people's Republic of China. Virus Research 54: 147-156.
15. Yamaguchi, S (1997) Identification of three Lineages of wild measles virus by Nucleotide sequence analysis of N,P, M, F and L Genes in japan. Journal of Medical Virology 52: 113-120.
16 . Takeda, M., Sakaguchi, T., Li ,Y., Kobune, F., Kato, A. and Nagai, Y., (1999). The Genome Nucleotide sequence of contemporary wild strain of measles virus and its comparison with the classical Edmonston strain genome. Virology ,256, 340-350.
17 . Lennette, E.H., Lennette, D.A., and Lennette, E.T. Diagnostic procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections. 7th Edition. 1995. American public health Association. Washington. U.S.A.

جدول شماره ۱) مقایسه نتایج روشهای *capture IgM EIA* روی سرم بیمار ، *IIF* روی کشت سلول تلقیح شده با نمونه گلو و *RT-PCR* بر روی نمونه مستقیم گلو در تشخیص بیماری سرخک .

شماره	فاصله نمونه گیری از روز بروز بثورات	*Capture IgM EIA*	*RT-PCR*	*IIF*روی سلولهای *B95* تلقیح شده
.۱	۴	+	+	+
.۲	۴	+	+	+
.۳	۲	+	–	+
.۴	۴	+	+	–
.۵	۴	+	–	+
.۶	۲	+	–	–
.۷	۵	+	–	–
.۸	۱	+	–	+
.۹	۵	+	–	+
.۱۰	۴	+	–	+
.۱۱	۲	+	–	+
.۱۲	۱	+	+	–
.۱۳	۲	+	–	+
.۱۴	۴	+	+	+
.۱۵	۴	+	+	+