مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره سوم (پیاپی ۲۴) پاییز ۱۳۹۴
صفحات ۱۸۹-۱۸۳

Original Article

تشخیص سریع ویروس *لارینگو تراکئیت* عفونی (ILTV) با استفاده از روش Real-time PCR مبتنی بر ژن اختصاصی *UL27*

سمانه ظهیری یگانه[۱]، محمد صادق هاشم زاده[۲]، احسان ظفری[۲]، مهدی تات[۱]، محمد نجاراصل[۲]، بنت الهدی زهرایی[۱]، روح الله درستکار[۳*]

[۱] کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم(عج)، تهران، [۲] دانشجوی دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم(عج)، تهران، [۳] استادیار، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم(عج)، تهران

چکیده

سابقه و هدف: ویروس *لارینگو تراکئیت* عفونی (ILTV)، از مهمترین عوامل بیماری زا از نظر اقتصادی در صنعت طیور است. ماکیان تنها مخزن اصلی این ویروس به شمار می آیند. در حال حاضر برای تشخیص این ویروس روش سریع، حساس و دقیقی وجود ندارد. این مطالعه با هدف ارزیابی و معرفی یک روش دقیق مولکولی با استفاده از تکنیک Real-time PCR و مبتنی بر ژن اختصاصی *UL27* ویروس ILT، به منظور تشخیص سریع این ویروس انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، پس از تهیه نمونه ویروسی، DNA مربوطه با استفاده از کیت استخراج اسیدهای نوکلئیک از ویروس استخراج گردید. سپس حضور ژن اختصاصی *UL27* ویروس، ابتدا با روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و در نهایت با تکنیک Real-time PCR با استفاده از پرایمرها و پروب اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: مشاهده قطعه مورد انتظار ۹۶ جفت بازی در آنالیز ژل الکتروفورز، حضور ژن اختصاصی *UL27* را در نمونه های ویروسی تأیید نمود. همچنین نتایج ارزیابی سنجش Real-time PCR نیز بر روی نمونه های یاد شده مثبت بود.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که روش مولکولی Real-time PCR روش مناسبی برای تشخیص سریع و دقیق ویروس *لارینگو تراکئیت* عفونی، به واسطه ردیابی ژن اختصاصی *UL27* می باشد.

واژگان کلیدی: ویروس *لارینگو تراکئیت* عفونی (ILTV)، Real-time PCR، ژن *UL27*.

دریافت مقاله: خرداد ماه ۹٤ پذیرش برای چاپ: مرداد ماه ۹٤

مقدمه

ویروس *لارینگو تراکئیت* عفونی (Infectious *Laryngo tracheitis*)، عامل بیماری تورم حنجره و نای در ماکیان و از مهمترین عوامل بیماری زا از نظر اقتصادی در صنعت طیور می باشد. این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۲۵ در ایالات متحده آمریکا گزارش گردید. همچنین اولین بیماری مهم ویروسی در طیور است که برعلیه آن نیز واکسن مؤثری ساخته شده که انتشار جهانی دارد (٦-۱). عامل یاد شده، ویروسی غشادار معروف به گالید هرپس ویروس (Gallid herpesvirus) از خانواده هرپس ویریده می باشد و ژنوم ویروس دارای ثبات آنتی ژنیکی می باشد. تاکنون سویه های مختلف از این ویروس دارای عوامل حدت متفاوت شناسایی شده است (۱، ۲ و ۷-۵).

نشانه های این سندرم، به تدریج و به ترتیب در طیور مادرگوشتی و طیور تخم گذار به صورت خواب آلودگی و بی حرکتی، بی اشتهایی مطلق و بروز علایم تنفسی، تورم شدید پلک ها و چشم های چینی شکل، جراحات بر روی زبان و حلق و سوراخ های بینی و دهان و خونریزی در سقف

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه و پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم(عج)، مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی. تلفن: (۱٦)۰۲۱۸۸٦۱۷۷۱۱ پست الکترونیک: R.dorost@yahoo.com

دهان، نقصان تخم مرغ به مقدار ۵ تا ۳۰ درصد و کوچک شدن اندازه تخم مرغ ها، جراحات و عوارض چشمی به ویژه در هنگام همراه بودن با عامل *کریزای عفونی* و سایر میکروب ها، کم شدن جوجه گیری وضایعات و اختلالات عصبی شبیه بیماری *نیوکاسل* در گله در زمان بیماری پیشرفته و سرانجام مرگ و میر به میزان ۰/۵ تا ۱۰ درصد مشاهده می گردد (۱، ۲، ٤، ۵ و ۷).

علایم سندرم یاد شده، به ویژه در زمان همراه بودن با آلودگی های ثانوی میکروبی و ویروسی مانند *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli*)، *پاستورلا مولتوسیدا* (*Pasteurella multocida*)، *کوریزای* عفونی (Infectious *Corzyza*) و ویروس *برونشیت* عفونی (Infectious *Bronchitis*) تشدید می شود. در چنین شرایطی مصرف آنتی بیوتیک های وسیع الطیف می تواند در کاهش این عوارض نقش اساسی داشته باشد. به طوری که باید به موقع در گله های مادر مصرف شوند تا حدت و شدت سندرم و ضایعات بیماری کم شود. در این بیماری انتقال آنتی بادی مادر به جوجه ها وجود دارد، اما هنوز انتقال ویروس اثبات نشده است (۱ و ۷-٤).

با توجه به شیوع سریع روند بیماری و درگیر کردن رأس ماکیان هم مکان، راه اندازی و استفاده از یک تکنیک دقیق که بتواند به تشخیص هر چه سریع تر بیماری بیانجامد، ضروری به نظر می رسد. این عمل موجب پیشگیری از انتقال سریع بیماری و خسارات زیاد اقتصادی می گردد. در حال حاضر هنوز یک روش سریع، حساس و دقیق برای تشخیص این ویروس وجود ندارد. بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی و معرفی یک روش دقیق مولکولی، با بهره گیری از تکنیک Realtime-PCR و مبتنی بر ژن اختصاصی *UL27* ویروس *لارینگو تراکئیت* عفونی (ILTV)، به منظور تشخیص سریع این ویروس بود.

مواد و روش ها

الف) تهیه نمونه و استخراج ژنوم ویروسی: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی، پس از تهیه نمونه از انستیتو رازی ایران (که در حقیقت واکسن *لارینگو* می باشد)، ابتدا مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه ی حاوی ویروس، با سرسمپلر فیلتردار به درون میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل و سپس استخراج DNA ویروسی، با استفاده از کیت تجاری استخراج اسیدهای نوکلئیک (Interon, Korea)، بر اساس دستور العمل شرکت سازنده انجام شد.

ب) طراحی و ساخت پرایمرها و پروب اختصاصی و بهینه سازی شرایط انجام واکنش PCR: پس از طراحی یک جفت پرایمر و نیز پروب اختصاصی با نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مربوطه (Oligo و ...)، این توالی ها توسط شرکت Bioneer (کشور کره) سنتز شدند. این جفت پرایمر قطعه ای ۹٦ جفت بازی از ژن *UL27* را شناسایی و تکثیر می نمایند (جدول ۱).

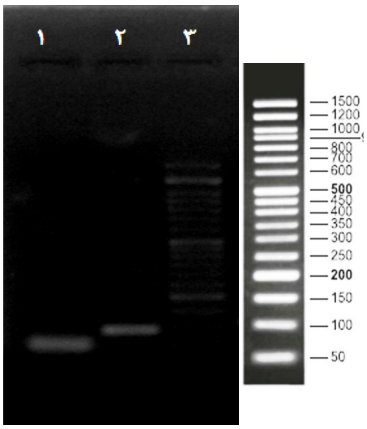
در مرحله بعد، به منظور انجام فرآیند PCR معمولی با پرایمرهای اختصاصی سنتز شده، پس از بهینه سازی واکنش PCR مخلوط واکنش (با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر) حاوی یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی (با غلظت اولیه ۱۰ میکرومولار به ازای هر کدام)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (با غلظت اولیه ۱۰ میلی مولار به ازای هر باز)، ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (با غلظت اولیه ۲۵ mM) و ۰/۵میکرولیتر از آنزیم *Taq* DNA Polymerase (Fermentase) (۰/۷۵ U) آماده سازی شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad C1000, Life Science Group)، با شرایط واسرشت

جدول ۱: توالی پرایمرها و پروب اختصاصی مورد استفاده در تکثیر و شناسایی ژن *UL27* ویروس *لارینگو تراکئیت* عفونی.

پرایمر	توالی
Sense Primer	5'-TATCACCCTGAGGTCCAGACTG-3'
Anti-sense Primer	5'-AGGCACAAAGACAAAATCATCTCC-3'
Probe	DYXL-5'-AAGCCGCAGGTCGCCGCACG-3'-BBQ

ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشت اصلی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. محصول این فرآیند بر روی ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۳۵ دقیقه و با ولتاژ ۸۰، الکتروفورز شد و سپس مورد ارزیابی قرار گرفت.

ج) راه اندازی تست تشخیصی Real-time PCR با استفاده از پرایمرها و پروب اختصاصی: این روش با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و مخلوط واکنش Real-time PCR شبیه به اجزای واکنش یاد شده در مرحله ۲ و مطابق با دستورالعمل شرکت عرضه کننده کیت (یکتا تجهیز آزما_ایران) به همراه ۲۰۰ نانوگرم از پروب اختصاصی (از نوع TaqMan)، در دستگاه Real-time PCR 6000 (Qiagen, Germany) Corbet (Rotor-Gene) راه اندازی شد. در نهایت نتایج حاصله مورد ارزیابی قرار گرفت. برنامه دمایی با ۲ دقیقه در ۹۵ درجه سلیسیوس آغاز و سپس با ٤۵ سیکل در دو مرحله شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلیسیوس و ٦۰ ثانیه در ٦۰ درجه سلیسیوس ادامه یافت. شایان یادآوری است که خوانش رنگ فلورسنت در دمای ٦۰ درجه سلیسیوس و در انتهای مرحله دوم هر سیکل انجام شد.

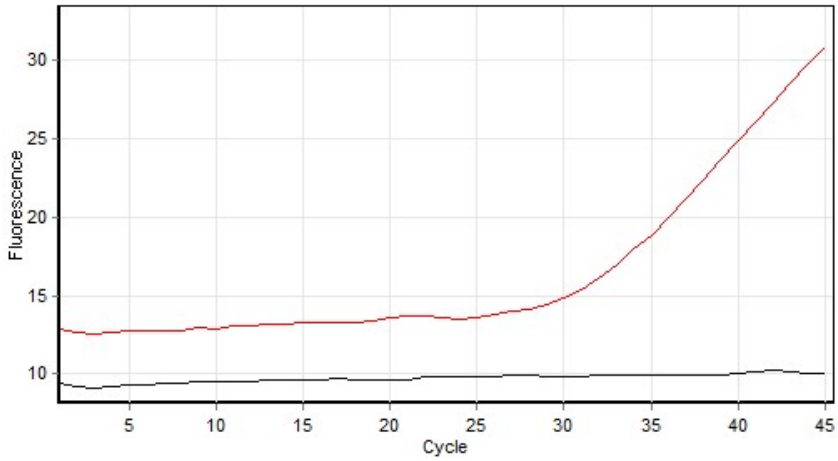


شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *UL27*. ستون ۱) کنترل منفی حاوی پرایمر دایمر، ستون ۲) نمونه مثبت حاوی ژن *UL27* (۹٦ جفت باز)، ستون ۳) مارکر ۵۰ جفت بازی (سیناژن، ایران).

یافته ها

الف) ارزیابی قطعه تکثیر یافته با پرایمرهای اختصاصی: پس از انجام واکنش PCR معمولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناساگر ژن *UL27*، قطعه فراوان سازی شده، با سایز ۹٦ جفت باز مورد انتظار، بر روی ژل آگاروز ۲ درصد مشاهده گردید (شکل ۱).

ب) ارزیابی تست تشخیصی Real-time PCR با استفاده از پرایمرها و پروب اختصاصی: نتیجه حاصله از سنجش مربوطه، بر روی نمونه ویروسی مثبت بود، که در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲: نتیجه حاصله از تست تشخیصی *Real-time PCR* با استفاده از پرایمرها و پروب اختصاصی. منحنی مشکی نمایانگر نتیجه منفی حاصل از نمونه کنترل منفی *(NTC)* و منحنی قرمز نمایانگر نتیجه مثبت حاصل از نمونه ویروسی می باشد.

بحث

بیماری ناشی از ویروس *لارینگو تراکئیت* ماکیان انتشار جهانی دارد (۲). این بیماری در کشور ما نیز وجود دارد و در برخی از نقاط مانند استان آذربایجان شرقی شایع است (۱ و ۸). اما به نظر می رسد که در این استان بومی نباشد (۸). در مناطقی از دنیا که دارای صنعت مرغداری گسترده با پرورش متراکم طیور هستند، این بیماری اغلب به شکل بومی درآمده و اشکال آنزئوتیک خفیف بیشتر از همه گیری های شدید مشاهده می گردد. در این حالت میزان ابتلای کمتر از ۵ درصد و میزان مرگ و میر بسیار پائین است (۲، ٤، ۵ و ۷). در مناطق غیربومی، غالباً به صورت همه گیری های شدید با علایم بارز تنفسی، دفع ترشحات موکوسی خون آلود و میزان مرگ و میر ۷۰-۵ درصد بروز می نماید (۱، ۲، ٤، ۵ و ۷).

برخی از محققین براین باورند که از زیان های به کارگیری واکسن های زنده، احتمال پخش ویروس به ویژه در روزهای ۱۰-۷ بعد از واکسیناسیون و نیز ایجاد پرندگان حامل می باشد که می تواند باعث بومی شدن این بیماری در یک منطقه گردد (٤ و ٦). برای تشخیص قطعی بیماری *تورم حنجره و نای* در ماکیان راه های متعددی وجود دارد. از آن جمله می توان به مشاهده گنجیدگی های ویروسی در درون هسته سلول های سنسی شیال در مقاطع هیستوپاتولوژیک، تشخیص DNA ویروسی (هیبرید کردن، PCR) و جداسازی آنتی بادی های ویروسی و ... اشاره نمود که برخی بسیار وقت گیر و یا دارای حساسیت پائین هستند (۱، ۲، ۵ و ٦). جداسازی ویروس در مقایسه با مشاهدهٔ گنجیدگی های داخل هسته ای در سلول های سنسی شیال، حساسیت بیشتری دارد. به طوری که در تحقیق کلر (Keller) و همکاران در سال ۱۹٦۲ که بر روی ٦۰ نمونه انجام گرفت، در ۷۲ درصد موارد ویروس جداسازی گردید. در حالی که تنها ۵۷ درصد آنها گنجیدگی های درون هسته ای را نشان دادند (۲).

بر اساس مطالعه گای (Guy) هرچند حساسیت جداسازی ویروس از مشاهده گنجیدگی های داخل هسته ای بیشتر است، اما برای تأیید این بیماری، تشخیص گنجیدگی های ویروسی در داخل هسته سلول های سنسی شیال در مقاطع هیستوپاتولوژیک، دارای ویژگی بسیار بالایی است. به طوری که ویژگی آن ۹۸ درصد ذکر شده است (۲، ۹ و ۱۰). در مطالعه فرهت (Ferhat) و همکاران روش های مختلف تشخیص ویروس *لارینگو تراکئیت* در نای ماکیان مقایسه شد. بر اساس نتایج این تحقیق، تشخیص هیستوپاتولوژیک بیماری *لارینگو تراکئیت* دارای ویژگی ۱۰۰ درصد بوده است. به طوری که ویژگی این روش تا حدودی مشابه PCR و هیبرید کردن DNA و بالاتر از روش ایمونوپراکسیداز و ایمونوفلورسنت آنتی بادی غیرمستقیم به دست آمد (۱۱). عقاید مشابهی توسط سایر محققین نیز ابراز شده است (۳، ٦، ۷ و ۱٤-۱۲).

در نواحی که این بیماری در آنها بومی است گله های حساس با استفاده از واکسن های زندهٔ تخفیف حدت یافته محافظت می گردند. به دلیل ایجاد پرندگان حامل با عفونت نهفته و همچنین گسترش ویروس واکسن ازپرندگان واکسینه شده به پرندگان غیرواکسینه و نیز افزایش حدت ویروس در اثر عبور ازیک پرنده به پرنده دیگر (پاساژ در سطح گله)، استفاده از واکسن های زنده در نواحی غیربومی بیماری توصیه نشده است. در چنین مناطقی اساس مبارزه با بیماری، اقدامات ریشه کنی و پیشگیری از انتشار بیشتر با تشخیص به موقع و با یک تکنیک سریع و دقیق خواهد بود (۱، ۲، ۵ و ۱۵).

نهایتاً اینکه پیشنهاد می گردد برای تعیین میزان شیوع آلودگی به ویروس *لارینگو تراکئیت* ماکیان در یک منطقه، ارزیابی جامعی با استفاده از تکنیک های دقیق مولکولی در بین گله های تخمگذار صورت پذیرد. روش های مولکولی مختلفی تاکنون برای شناسایی ژنوم ویروسی با هدف تشخیص سریع بیماری مورد ارزیابی قرار گرفته است. در این بین، روش های مولکولی مبتنی بر Real-time PCR به دلیل سادگی، حساسیت و اختصاصیت فوق العاده بالا بر دیگر روش های تشخیصی مولکولی ارجحیت دارند. در بین روش های مختلف Real-time PCR روش های مبتنی بر پروب دارای بیشترین اختصاصیت هستند (۱٦ و ۱۷). روش های سنتی PCR نیز

نیازمند فراوان سازی در یک دستگاه ترموسایکلر و سپس آنالیز محصول بر روی ژل الکتروفورز هستند.

اما این فرآیند بسیار زمان بر است و از حساسیت روش می کاهد و از طرفی احتمال آلودگی نیز به شدت بالا می رود (١٤ و ١٨). با توجه به اینکه در حال حاضر هنوز یک روش سریع، حساس و دقیق برای تشخیص این ویروس وجود ندارد، به همین دلیل در این پژوهش، ارزیابی و معرفی یک روش دقیق مولکولی با استفاده از تکنیک Real-time PCR (از نوع پروبی) و مبتنی بر ژن اختصاصی *UL27* ویروس ILT، به منظور تشخیص سریع این ویروس صورت پذیرفت.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که روش مولکولی Real-time PCR روش مناسبی برای تشخیص سریع و دقیق ویروس *لارینگو تراکئیت* عفونی، به واسطه ردیابی ژن اختصاصی *UL27*، در نمونه های آلوده به این ویروس می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از ریاست محترم مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Saif YM. Diseases of poultry. 12th ed. Ames, Iowa. Blackwell Publications; 2015: 137-153.

2. David ES. Diseases of poultry. 13th ed. Wiley-Blackwell Publications; 2013: 161-181.

3. Coles BH. Avian medicine and surgery. 2nd ed. Blackwell Science; 1997: 265- 296.

4. Menendez KR, García M, Spatz S, Tablante NL. Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: a review. Avian Pathol. 2014; 43(2): 108-117.

5. Coppo MJC, Noormohammadi AH, Browning GF, Devlin JM. Challenges and recent advances in infectious *laryngotracheitis* virus vaccines. Avian Pathol. 2013; 42: 195-205.

6. Godoy A, Icard A, Martinez M, Mashchenko A, García M, El-Attrache J. Detection of infectious *Laryngotracheitis* virus antibodies by glycoprotein-specific ELISAs in chickens vaccinated with viral vector vaccines. Avian Dis. 2013; 57(2): 432-436.

7. Bozorgmehrifard MH, Shojadust B, Akbari A, Kolidori Gh, Sheikhi N. Poultry disease guide. Publications of Education and Research unit of Deputy Agriculture; 1996: 35-47.

8. Ashrafi Helan J, Vasfi Marandi M, Sasani F, Mostofi S, Ghazizadeh H, Masoodi Gavgani MH. Clinical and pathological report of *Laryngo tracheitis (LT)* disease outbreak in a laying flock from East Azarbayejan. Pajouhesh-va-Sazandegi. 2003; 60: 17-21 [In Persian].

9. El-Zanaty K, Ahmed YF. Natural outbreak of infectious *Laryngotracheitis* in broiler chickens in Saudi Arabia. Assiut Vet Med J. 1995; 33(66): 191-198.

10. Guy JS, Barnes HJ, Smith LG. Rapid diagnosis of ILT using a monoclonal antibody- based mmuno-peroxidase procedure. Avian Pathol. 1992; 21(1): 77-86.

11. Ferhat A, Andreasen JR, Abbas F. Comparison of diagnostic tests for infectious *laryngo tracheitis*. Avian Dis. 1996; 40(2): 290-295.

12. Zhao W, Spatz S, Zhang Z, Wen G, Garcia M, Zsak L, Yu Q. Newcastle disease virus (NDV) recombinants expressing infectious *laryngotracheitis* virus (ILTV) glycoproteins gB and gD protect chickens against ILTV and NDV challenges. J Virol. 2014; 88(15): 8397-8406.

13. Hoop RK, Keller-Berger B, Lobsiger-Molliet C, Morgenstern R, Hauser R. What's your diagnosis? Schweizer-Archiv-Fur-Tierheikunete. 1993; 135(3): 103-105.

14. Yassein S, El-Begawey MB. Pathological and haematological studies of ILT in chicken. Egyptian J Comper Clinical Path. 1992; 5(1): 65-74.

15. Parra SHS, Nuñez LFN, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira JP. Occurrence of infectious *Laryngotracheitis* Virus (Iltv) in 2009-2013 in the State of São Paulo-Brazil. Braz J Poult Sci. 201; 17(1): 117-120.

16. Maltezou HC, Andonova L, Andraghetti R, Bouloy M, Ergonul O, Jongejan F. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Europe: current situation calls for preparedness. Euro Surveill. 2010; 15(10): 19504.

17. Mahmoudian A, Kirkpatrick NC, Coppo M, Lee SW, Devlin JM, Markham PF, Browning GF, Noormohammadi AH. Development of a SYBR green quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection and quantification of infectious *laryngotracheitis* virus .Avian Pathol. 2011; 3: 237-242.

18. Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. Antiviral Res. 2004; 64(3): 145-160.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 3, September 2015

Original Article

Rapid diagnosis of infectious *Laryngo tracheitis* virus (ILTV) by real-time PCR on *UL27* proprietary gene

Samaneh Zahiriyeganeh[1], Mohammad Sadegh Hashemzadeh[2], Ehsan Zafari[2], Mahdi Tat[1], Mohammad Najarasl[5], Bentolhoda Zahraei[1], Ruhollah Dorostkar[3]

[1]M.Sc., Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[2]Ph.D student, Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3]Assistant Professor, Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Infectious *Laryngo tracheitis* virus (ILTV) is one of the major pathogens causing economic losses in poultry industry. Poultries are the only reservoir of the virus. By now there is no rapid, sensitive and accurate method for detection of this virus. This study was aimed to evaluate and introduce an accurate molecular method by using real-time PCR technique on *UL27* proprietary gene of ILTV in order to fast diagnosis of the virus.

Materials & Methods: In this experimental study, after preparation of viral sample, the DNA was extracted from virus by using viral nucleic acids extraction kit. Thereafter, the existence of *UL27* proprietary gene of the virus was evaluated at first by traditional PCR technique using specific primers and afterwards by real-time PCR technique using specific probe and primers.

Results: Observation of expected 96 bp fragment in electrophoresis gel analysis confirmed the presence of *UL27* proprietary gene in this viral samples and the results of real-time PCR assay evaluation were also positive in this samples.

Conclusion: This study showed that the molecular method of real-time PCR is a suitable method for rapid and accurate diagnosis of ILTV by detection of *UL27* proprietary gene.

Keywords: Infectious *Laryngo tracheitis* virus (ILTV), Real-time PCR, *UL27* gene.

Correspondence to: Ruhollah Dorostkar

Tel: +98 21 88617711(16).

E-mail: R.dorost@yahoo.com

Journal of Microbial World 2015, 8(3): 183-189.