# مقایسه کیت تجاری الیزا با خنثی‌سازی سرم در تشخیص آلودگی به هرپس ویروس تیپ-۱ در گاومیش

ندا ارجمندی[۱]، محمد رحیم حاجی حاجیکلایی[۲*]، مسعود رضا صیفی آبادشاپوری[۳]، مریم داغری[۴]

۱- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲- استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۳- استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۴- کارشناس گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: mhajih@scu.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۴/۶/۱۳ پذیرش نهایی: ۹۴/۹/۳۰)

Archive of SID

## چکیده

**به‌منظور مقایسه کیت تجاری الیزا با آزمایش خنثی‌سازی سرم در تشخیص آلودگی به هرپس‌ویروس تیپ-۱ در گاومیش‌های کشتارشده در کشتارگاه اهواز، از ۱۵۰ رأس گاومیش (۱۰۰ رأس نر و ۵۰ رأس ماده) نمونه خون اخذ گردید. سرم‌ها پس از جداسازی، با استفاده از کیت‌های تجاری الیزا و آزمایش خنثی‌سازی ویروس جهت مشخص نمودن آلودگی به BHV-1 (هرپس ویروس تیپ-۱ گاوی) مورد آزمایش قرار گرفتند. از ۱۵۰ رأس گاومیش تحت مطالعه ٥٤ درصد (۸۱ نمونه) و ۵۸/۷ درصد (۸۸ نمونه) به ترتیب با استفاده از روش الیزا و خنثی‌سازی ویروس به BHV-1 آلوده بودند. تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین روش الیزا و خنثی‌سازی ویروس در شناسایی پادتن ضد BHV-1 در سرم خون گاومیش وجود ندارد.**

**کلید واژه‌ها: گاومیش، الیزا، خنثی‌سازی ویروس، هرپس ویروس تیپ-۱.**

## مقدمه

هرپس‌ویروس تیپ-۱ گاو (BHV-1) که ویروس IBR/IPV نیز نامیده می‌شود، یک DNA ویروس در جنس واریسلا ویروس از خانواده هرپس‌ویروس‌ها است. این ویروس در انواعی از کشت‌های سلولی تکثیر می‌یابد و تغییرات سلولی مشخصی را ایجاد می‌کند که تشخیص و مطالعه



www.SID.ir

بیماری‌زائی، همه‌گیری‌شناسی (اپیدمیولوژی) و فن‌آوری واکسن را تسریع می‌کند (Robert, 2001).

IBR باعث مرگ در اثر اشکال تنفسی بیماری در تمام سنین، سقط‌های همه‌گیر (اپیدمیک)، ناباروری، کاهش تولید، تورم پوستولی فرج و واژن، تورم عفونی غلاف قضیب و آنسفالیت می‌گردد. منبع اصلی عفونت ترشحات بینی، ترشحات اندام‌های تناسلی، منی و مایعات جنینی و بافت‌های آلوده می‌باشند. ویروس در اثر تماس مستقیم از طریق مجاری تنفسی و یا دستگاه تولید مثل وارد بدن می‌شود. آئروسل آلوده سبب انتشار شکل تنفسی و انتقال مقاربتی سبب انتشار شکل تناسلی بیماری می‌شوند (Smith, 2009). انتقال ویروس از طریق تنفسی بسیار سریع است. در اثر ورود یک رأس دام آلوده به یک دام‌داری، دام‌های آن دام‌داری سریعاً آلوده می‌شوند، اما انتقال از طریق مقاربتی بسیار آهسته است. گاوهای آلوده به‌صورت حامل باقی می‌مانند و تا مدت‌ها ویروس را دفع می‌کنند. طیف وسیعی از عوامل مانند جابجائی دام‌ها، سیستم چرای مشترک، مسافرت و عوامل استرس‌زا شرایط انتقال و آلودگی را بیشتر فراهم می‌کنند و باعث افزایش آلودگی سرمی به بیماری IBR می‌شوند (Robert, 2001).

در استرالیا توانسته‌اند آلفا هرپس‌ویروس گاومیش را با استفاده از روش محدودسازی DNA ویروس از BoHV-1 متمایز کنند و این نکته بر این دلالت دارد که ویروس گاومیش (BuHV-1 ) با ویروس گاوی (BoHV-1) تفاوت دارد، در صورتی که از نظر ژنتیکی و آنتی‌ژنی به‌هم مرتبط هستند. گاومیش‌ها مستعد ابتلا به BoHV-1 و BuHV-1 می‌باشند. نشان داده شده که واکسیناسیون علیه BoHV-1 سبب تحریک ایمنی و کمی محافظت علیه تکثیر ویروس BuHV-1 می‌گردد (Amoroso *et al*., 2013).

عفونت‌های ناشی از BoHV-1 از اکثر کشورهای دنیا گزارش شده و عمدتاً گزارش‌های اولیه در هر کشوری مبتنی بر آزمایشات سرولوژیک می‌باشد. بر همین اساس، مطالعات سرولوژی که در گاوها و گاومیش‌های اهواز صورت گرفته حکایت از آلودگی به این ویروس در بین این دام‌ها می‌کنند. برای تعیین آلودگی در گاوها از روش الیزا و برای تعیین آلودگی در گاومیش‌ها از روش خنثی‌سازی سرم (VN) استفاده شده است (حاجی حاجیکلایی و صیفی آبادشاپوری، ۱۳۸۵ و ۱۳۸٦). با توجه به این‌که روش الیزا روشی آسان و سریع می‌باشد و روش خنثی‌سازی ویروس زمان‌بر و نیاز به کشت سلول و امکانات و تجهیزات متناسب با کشت سلول می‌باشد، از طرف دیگر، در مطالعه مامی و همکاران در سال ۱۳۹٤ نشان داده شد که آزمایش الیزا در مقایسه با آزمایش خنثی‌سازی ویروس قادر به مشخص نمودن حضور پادتن ضد ویروس اسهال ویروسی گاو در سرم خون گاومیش نمی‌باشد (مامی و همکاران، ۱۳۹٤). بنابراین، هدف از انجام این مطالعه مقایسه این دو روش (انجام آزمایش الیزا و خنثی‌سازی سرم) در تعیین آلودگی به BHV-1 در گاومیش بوده است.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌گیری

جهت انجام مطالعه حاضر، در حد فاصل ماه‌های دی تا اسفند سال ۱۳۹۳ با مراجعه به کشتارگاه شهرستان اهواز، از تعداد ۱۵۰ رأس گاومیش (۱۰۰ رأس نر و ۵۰


www.SID.ir
Archive of SID

رأس ماده) بعد از ذبح خون‌گیری به‌عمل آمد. در این بررسی سن دام بر اساس فرمول دندانی تعیین گردید (FAO, 1977). با توجه به فرمول دندانی ثنایایی فک پایین، گاومیش‌ها در ۵ گروه، زیر ۲/۵ سال (تمام دندان‌ها شیری)، ۳/۵-۲/۵ سال (یک جفت دندان دائم)، ٤/۵-۳/۵ سال (دو جفت دندان دائم) و ٤/۵-۵/۵ سال (سه جفت دندان دائم) و بالای ۵/۵ سال (تمام دندان‌ها دائم) تقسیم شدند.

**جداسازی سرم**

سرم‌ها بعد از جمع‌آوری شده به میکروتیوب های ۱/۵ میلی‌لیتری (شماره‌گذاری شده) انتقال و تا زمان انجام آزمایش الیزا و خنثی‌سازی سرم در فریزر۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

**آزمایش الیزا**

در این مطالعه از کیت تجاری الیزا ساخت شرکت ID.vet فرانسه، به منظور شناسایی آنتی‌بادی‌های ویژه BHV-1 استفاده شده است. در این کیت تمامی حفرات پلیت الیزا با ویروس BHV-1 خالص پوشیده شده‌اند. پس از افزودن نمونه‌های آزمایش (سرم‌های اخذ شده از گاومیش‌ها) و کنترل (مثبت و منفی) به حفرات میکروپلیت، در صورت وجود آنتی‌بادی علیه ویروس BoHV-1، کمپلکس آنتی‌ژن- آنتی‌بادی تشکیل می-گردد. پس از شستشو، کنژوگه علیه IgG نشخوارکنندگان به حفرات اضافه شد تا به آنتی‌بادی‌های سرمی متصل شده به ویروس اتصال یافته و سبب تشکیل کمپلکس آنتی‌ژن- آنتی‌بادی- کنژوگه گردد. پس از حذف کنژوگه اضافی به‌کمک شستشوی میکروپلیت، محلول سوبسترا- کروموژن (TMB-H2O2) اضافه شد. نتیجه رنگ‌پذیری (ظهور رنگ آبی) بستگی به مقدار آنتی‌بادی اختصاصی موجود در نمونه آزمایش دارد. در حضور آنتی‌بادی محلول آبی پس از اضافه کردن محلول متوقف کننده، به زرد تغییر رنگ می‌یابد و در صورت عدم حضور آنتی‌بادی تغییر رنگی مشاهده نخواهد شد. میکروپلیت‌ها در طول موج ٤۵۰ نانومتر قرائت و نتایج تفسیر گردید.

طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، اگر مقدار متوسط جذب نوری کنترل مثبت (ODpc) بیشتر از ۰/۳۵۰ و نیز نسبت بین مقادیر جذب نوری نمونه شاهد مثبت به شاهد منفی بیشتر از ۳ باشد، آزمایش انجام گرفته معتبر تلقی می‌گردد.

جهت بررسی و بیان این‌که کدام‌یک از نمونه‌های گرفته شده حاوی آنتی‌بادی ضد ویروس BHV-1 هستند، درصد S/P نمونه‌ها به روش زیر محاسبه گردید:

تفاضل میزان جذب نوری هر نمونه و میزان جذب نوری نمونه شاهد منفی تقسیم بر تفاضل میزان جذب نوری نمونه شاهد مثبت و منفی، ضربدر ۱۰۰.

$$\%S/P=\frac{ODsample-OD\,nc}{ODpc-ODnc}\times 100$$

نمونه‌هایی که S/P آنها کمتر از ۵۰٪ بود منفی تلقی شدند. نمونه‌هایی که S/P آنها بیشتر یا مساوی ۵۰٪ و کمتر از ٦۰٪ بود مشکوک تلقی شدند. نمونه‌هایی که S/P آنها بیشتر یا مساوی ٦۰٪ بود مثبت تلقی شدند.

**آزمایش خنثی‌سازی ویروس**

برای انجام آزمایش خنثی‌سازی ویروس نیاز به تکثیر و تیتراسیون ویروس BHV-1 است که برای این منظور از تیره سلولی RBK به عنوان محیط کشت استفاده گردید. بدین منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر از رقت ۱/۱۰۰ ویروس BHV-1 (رقیق شده در محیط کشت RPMI حاوی ۲ درصد سرم گوساله) در یک فلاسک کشت



Archive of SID
www.SID.ir

سلولی حاوی تک لایه سلولی RBK که در روز قبل با انجام تجدید کشت تهیه شده بود، منتقل گردید. بعد از کشت و تکثیر ویروس، تیتراسیون (عیارسنجی) ویروس به‌منظور آگاهی از عیار ویروس‌های تهیه شده، جهت انجام آزمایش خنثی‌سازی ویروس انجام گرفت. بدین منظور، سرم‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد (به منظور غیرفعال کردن کمپلمان) قرار داده شدند. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از هر سرم همراه با ۵۰ میکرولیتر ویروس BoHV-1 حاوی ۱۵۰ $TCID_{50}$ در هر حفره افزوده شد و پلیت به مدت ۲۴–۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجهسلسیوس قرار داده شد. پس از این مرحله در هر حفره ۱۰ هزار عدد سلول RBK در ۱۰۰ میکرولیتر (در محیط کشت RPMI حاوی ۲ درصد سرم گوساله) افزوده شد و در پایان پلیت به‌مدت ۵ روز در انکوباتور حاوی ۲ درصد CO2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. در طی این مدت پلیت‌ها روزانه از نظر آثار تخریب سلولی (CPE) و در مقایسه با حفره‌های شاهد سلول (فاقد ویروس) و شاهد ویروس مورد ارزیابی قرار گرفتند. سرم‌هایی که قادر به خنثی کردن ویروس نبودند، منفی محسوب می‌شدند و سرم‌هایی که از تکثیر ویروس جلوگیری کرده بودند، مثبت در نظر گرفته شدند.

**تحلیل آماری داده‌ها**

داده‌های جمع‌آوری شده، با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ به‌طور توصیفی و تحلیلی با فاصله اطمینان ۹۵٪ بررسی شدند. به‌منظور تحلیل داده‌ها از آزمایش مربع کای، آزمایش مک‌نمار و آماره کاپا استفاده گردید.

## یافته‌ها

در جدول ۱ توزیع فراوانی موارد مثبت و منفی به روش الیزا و خنثی‌سازی ویروس ارائه گردیده است. بررسی این جدول نشان می‌دهد که آلودگی به هرپس ویروس تیپ ۱ در گاومیش‌های تحت بررسی به طورکلی در روش الیزا و خنثی‌سازی ویروس به ترتیب ۵۴ و ۵۸/۷ درصد بوده است. در آزمون مک‌نمار این تفاوت معنی‌دار نبود. آماره کاپا نیز برابر با ۰/۸۸ بود. حساسیت و ویژگی آزمایش الیزا نسبت به خنثی‌سازی ویروس به‌ترتیب ۹۰/۹ درصد و ۹۸/۴ درصد بیان شده است.

جدول ۱- توزیع فراوانی موارد مثبت و منفی از نظر آلودگی به هرپس ویروس تیپ۱ در گاومیش‌های تحت بررسی به روش الیزا و خنثی‌سازی ویروس

| الیزا | خنثی‌سازی ویروس: مثبت | منفی | جمع |
|---|---|---|---|
| مثبت | ۸۰ | ۱ | ۸۱ |
| منفی | ۸ | ۶۱ | ۶۹ |
| جمع کل | ۸۸ | ۶۲ | ۱۵۰ |

در جدول ۲ توزیع فراوانی آلودگی به هرپس ویروس تیپ ۱ در گاومیش به تفکیک سن و با روش خنثی‌سازی ویروس ارائه گردیده است. این جدول نشان می‌دهد که به‌ترتیب کمترین و بیشترین موارد


www.SID.ir

مثبت مربوط به دامنه سنی زیر ۲/۵ سال و بیشتر از ۵ سال است. رده سنی زیر ۲/۵ سال با رده سنی ۳/۵-۲/۵ سال و بالای ۵ سال اختلاف معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۰۱$)، اما بین رده‌های سنی اول و سوم، دوم با سوم و سوم با چهارم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۲- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به هرپس ویروس تیپ۱ در گاومیش‌های تحت بررسی به تفکیک سن (سال) با آزمایش خنثی‌سازی ویروس

| آلودگی | منفی | | مثبت | | جمع کل | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| سن | مطلق | نسبی | مطلق | نسبی | مطلق | نسبی |
| <۲/۵ | ۳۸ | ۵۷/۶ | ۲۸ | ۴۲/۴[b] | ۶۶ | ۴۴ |
| ۲/۵-۳/۵ | ۹ | ۲۷/۳ | ۲۴ | ۷۲/۷[a] | ۳۳ | ۲۲ |
| ۳/۵-۴/۵ | ۸ | ۳۸/۱ | ۱۳ | ۶۱/۹ | ۲۱ | ۱۴ |
| ۵> | ۷ | ۲۳/۳ | ۲۳ | ۷۶/۷[a] | ۳۰ | ۲۰ |
| جمع کل | ۶۲ | ۴۱/۳ | ۸۸ | ۵۸/۷ | ۱۵۰ | ۱۰۰ |

*حروف کوچک متفاوت در ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار خمی‌باشد ($p<۰/۰۵$).

در جدول ۳ توزیع فراوانی آلودگی به هرپس ویروس تیپ ۱ در گاومیش‌های تحت بررسی به تفکیک سن و با روش الیزا ارائه گردیده است. این جدول نشان می‌دهد که در آزمایش الیزا، همانند آزمایش خنثی‌سازی ویروس، رده سنی با آلودگی ارتباط معنی‌دار دارد ($p<۰/۰۰۱$). هم‌چنین، رده سنی کمتر از ۲/۵ سال با رده سنی ۳/۵-۲/۵ سال ($p<۰/۰۰۱$)، رده سنی ۴/۵-۳/۵ ($p<۰/۰۵$) و رده سنی بالاتر از ۵ سال ($p<۰/۰۰۱$) اختلاف معنی‌داری داشت.

جدول ۳- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به هرپس ویروس تیپ۱ در گاومیش‌های تحت بررسی به تفکیک سن (سال) با آزمایش الیزا

| آلودگی | منفی | | مثبت | | جمع کل | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| سن | مطلق | نسبی | مطلق | نسبی | مطلق | نسبی |
| <۲/۵ | ۴۵ | ۶۸/۲ | ۲۱ | ۳۱/۸[c] | ۶۶ | ۴۴ |
| ۲/۵-۳/۵ | ۱۰ | ۳۰/۳ | ۲۳ | ۶۹/۷[ab] | ۳۳ | ۲۲ |
| ۳/۵-۴/۵ | ۸ | ۳۸/۱ | ۱۳ | ۶۱/۹[b] | ۲۱ | ۱۴ |
| ۵> | ۶ | ۲۰ | ۲۴ | ۸۰[a] | ۳۰ | ۲۰ |
| جمع کل | ۶۹ | ۴۶ | ۸۱ | ۵۴ | ۱۵۰ | ۱۰۰ |

*حروف کوچک متفاوت در ستون نشان‌دهنده تفاوت معنادار می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

در جداول ۴ و ۵ توزیع فراوانی آلودگی به هرپس ویروس تیپ ۱ در گاومیش‌های تحت بررسی به تفکیک جنس در آزمایش خنثی‌سازی ویروس و الیزا ارائه گردیده است. بررسی این جدول‌ها نشان می‌دهد که فراونی نسبی موارد مثبت در جنس نر و ماده در آزمایش خنثی‌سازی به ترتیب ۶۲ و ۵۲ درصد و در



www.SID.ir

آزمایش الیزا نیز بـه ترتیـب ۵۸ و ٤٦ درصـد اسـت کـه اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه سنی بـا اسـتفاده از هر دو روش وجود ندارد.

جدول ۴- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به هرپس ویروس تیپ۱ در گاومیش‌های تحت بررسی به تفکیک جنس در آزمایش خنثی‌سازی ویروس

| آلودگی | منفی | | مثبت | | جمع کل | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| جنس | مطلق | نسبی | مطلق | نسبی | مطلق | نسبی |
| نر | ۳۸ | ۳۸ | ٦۲ | ٦۲ | ۱۰۰ | ٦٦/۷ |
| ماده | ۲٤ | ٤۸ | ۲٦ | ۵۲ | ۵۰ | ۳۳/۳ |
| جمع کل | ٦۲ | ٤۱/۳ | ۸۸ | ۵۸/۷ | ۱۵۰ | ۱۰۰ |

جدول ۵- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به هرپس ویروس تیپ۱ در گاومیش‌های تحت بررسی به تفکیک جنس در آزمایش الیزا

| آلودگی | منفی | | مثبت | | جمع کل | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| جنس | مطلق | نسبی | مطلق | نسبی | مطلق | نسبی |
| نر | ٤۲ | ٤۲ | ۵۸ | ۵۸ | ۱۰۰ | ٦٦/۷ |
| ماده | ۲۷ | ۵٤ | ۲۳ | ٤٦ | ۵۰ | ۳۳/۳ |
| جمع کل | ٦۹ | ٤٦ | ۸۱ | ۵٤ | ۱۵۰ | ۱۰۰ |

## بحث و نتیجه‌گیری

از روش‌هـای مختلفـی ماننـد آزمـایش خنثـی‌سـازی ویروس، الیزا و ایمونوفلورسنت جهت مشخص نمـودن حضور پادتن ضد ویروس BHV-1 در سرم خون گاو و گاومیش استفاده می‌شود. آزمایش خنثی‌سـازی ویـروس یک آزمایش استاندارد اسـت و سـایر روش‌هـا بـا ایـن آزمایش سنجیده می‌شوند. آزمایش خنثی‌سازی ویـروس از حساسیت و ویژگی بسیار بالایی برخوردار مـی‌باشـد. اگرچه روشی سخت بوده و نیازمند لـوازم آزمایشـگاهی خوب و افراد باتجربه می‌باشد و به‌طور معمول ۵ الـی ٦ روز طول می‌کشـد تـا بـه‌طـور کامـل انجـام گیـرد، امـا بیشترین کاربرد آن به‌عنوان یک آزمـایش طلایـی بـرای سنجش و ارزیـابی سـایر روش‌هـا مـی‌باشـد. آزمـایش خنثـی‌سـازی ویـروس، بـه‌طـور کمـی اثـرات مهـاری پـادتن‌هـای اختصاصـی را روی تکثیـر ویـروس در کشت‌سـلول تعیـین مـی‌کنـد و کـاربرد آن محـدود بـه آزمایش‌های ویـروس‌شناسـی اسـت. محققـین مختلـف حساسیت آزمایش خنثـی‌سـازی ویـروس در تشـخیص سـرمی BHV-1 را بـین ۹۸-۹٤ درصـد و ویژگـی ایـن آزمایش را حدود ۹٦ درصد برآورد نموده‌انـد ( Lucas *et al.*, 1986) ، که این ارقام جهت یک آزمایش سـرمی ارقام مطلوبی به‌حساب می‌آیند، اما از آنجایی‌کـه جهـت انجام آزمایش خنثی‌سازی ویروس نیاز به سـوش زنـده ویـروس مـی‌باشـد و از طرفـی فـراهم آوردن امکانـات آزمایشگاهی خاص مورد نیاز اسـت، امکـان انجـام ایـن آزمایش در کمتر جایی از ایران مقدور است. لذا، انجـام


www.SID.ir

این آزمایش در سطح کشور به‌منظور تشخیص سریع بیماری با مشکلات بسیار فراوانی مواجه است. در این میان به‌کارگیری آزمایش‌های ساده‌تر مانند الیزا مورد توجه قرار گرفته‌اند.

الیزا برای تشخیص پادتن IgM نیز مفید است و آزمایش میکروالیزا برای تشخیص عفونت تازه با BHV-1 در گوساله‌ها استفاده می‌شود. در یک مقایسه آزمایشگاهی در اروپا، آزمایش خنثی‌سازی ویروس و الیزا ویژگی و حساسیت بالایی را در مقایسه با سایر آزمایش‌ها نشان داده‌اند (Rodostits *et al*., 2007). به‌منظور تعیین پادتن ضد ویروس BHV-1 در سرم، انواع مختلفی از کیت‌های تجاری الیزا وجود دارند. روش الیزا به‌دلیل آن‌که برای ارزیابی تعداد بسیار زیادی از نمونه‌های سرمی مناسب است، به کشت‌سلول نیاز ندارد، در مدت زمان کمی نتایج بسیار خوبی را به‌دست می‌آورد و به نسبت کاربردی که دارد ارزان قیمت می‌باشد، باعث شده است تا نسبت به آزمایش خنثی‌سازی ویروس مزیت بیشتری کسب کرده و به‌عنوان روش جایگزین آن مورد استفاده قرار گیرد (Riegel *et al*., 1987). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از مجموع ۱۵۰ رأس گاومیش‌های تحت مطالعه، در آزمایش خنثی‌سازی ویروس و الیزا به‌ترتیب ۵۸/۷ درصد و ٥٤ درصد دارای پادتن ضد ویروس BHV-1 بودند. مقایسه نتایج آزمایش خنثی‌سازی ویروس و الیزا نشان داد که بین این دو روش از نظر مشخص نمودن حضور پادتن ضدویروس BHV-1 اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و آماره کاپا برابر با ۰/۸۸ بوده است. حساسیت و ویژگی آزمایش الیزا نسبت به خنثی‌سازی ویروس به‌ترتیب ۹۰/۹ درصد و ۹۸/٤ درصد بیان شد، لذا از آزمایش الیزا می‌توان جهت مشخص نمودن حضور پادتن ضدویروس BHV-1 در سرم خون گاومیش استفاده نمود.

عفونت‌های ناشی از BHV-1 از اکثر کشورهای دنیا گزارش شده است و عمدتاً گزارش‌های اولیه هر کشوری مبتنی بر آزمایش‌های سرم‌شناسی می‌باشد. در بررسی‌های محدودی که طی سال‌های گذشته در ایران صورت گرفته است، در ارتباط با حضور این ویروس با استفاده از آزمایش‌های سرم‌شناسی گزارش‌هایی اعلام شده است. از آنجایی که بیماری IBR را بیماری سیستم گاوداری مدرن و صنعتی می‌دانند، لذا وقوع این بیماری در کشورهای آسیایی یا آفریقایی به‌عنوان هدیه‌ای از جهان غرب تلقی می‌گردد. از طرفی اولین گزارش‌های ناشی از وقوع بیماری نیز در آمریکا بوده است. جالب آن است که اولین گزارش‌های حاکی از حضور بیماری نیز با ورود گاوهای اصیل خارجی به‌ویژه در گاوداری‌های اطراف تهران در دهه چهل مصادف می‌باشد (حضرتی، ۱۳۵۵؛ Karshoek *et al*., 1996).

در بررسی کارگر و همکاران در سال ۱۳۸۱ میزان آلودگی به BHV-1 با استفاده از روش خنثی‌سازی در گاومیش‌های مستقر در مرکز تهیه اسپرم ارومیه ٤/١ درصد به‌دست آمد (کارگر و همکاران،۱۳۸۱). در مطالعه حاجی حاجیکلایی و صیفی آباد شاپوری در سال ۱۳۸٦ که روی ۳۲٦ رأس گاومیش ارجاعی به کشتارگاه اهواز انجام گرفت، با استفاده از روش خنثی‌سازی ویروس نشان دادند که ٦١/٧٠ درصد از گاومیش‌های تحت مطالعه دارای پادتن ضدویروس BHV-1 بودند (حاجی حاجیکلایی و صیفی آباد شاپوری، ۱۳۸٦). بررسی‌های صورت گرفته در



Archive of SID
www.SID.ir

کشورهای دیگر نیز حکایت از آلودگی سرمی گاومیش‌های آن کشورها دارد، به‌طوری‌که میزان آلودگی در گاومیش و گاو، در سه ایالت هند به ترتیب ۵۲/۵ و ۵۰/۹ درصد گزارش گردید (Tautz *et al*., 1998). در مطالعه سیکلونا و همکاران که در سال ۲۰۰۷ روی ۱۸٦۷ رأس گاومیش از ۱۵۵ گله با استفاده از آزمایش الیزا انجام گرفت، ٤۲ درصد از گاومیش‌ها از نظر BuHV-1 و ۳۰/۵ درصد از نظر BOHV-1 مثبت بودند (Scicluna *et al*., 2007). فراوانی آلودگی به BHV-1 در گاومیش‌های ترکیه ۸۰/۵، در برزیل ۸۷/۲۵ و در مصر ۵۳ درصد گزارش شده است (Albayrak *et al*., 2012; Carvalho *et al*., 2015; Yossef, 1997). همان‌طور که ملاحظه می‌شود فراوانی آلودگی در بین کشورهای مختلف متفاوت می‌باشد. به‌علت طبیعت خاص این بیماری و پنهان بودن چهره بالینی آن، عدم بروز علائم بالینی جالب توجه در بررسی‌های درمانگاهی و پیچیدگی‌های تشخیص آزمایشگاهی، هیستوپاتولوژیک و ایمونوهیستوشیمی، این بیماری گسترش وسیعی در کشورهای مختلف دارد. نکاتی مانند وجود دام‌های آلوده‌ای که ویروس را طی دوره بیماری به سایر حیوانات منتقل می‌نمایند، وجود دام‌های مبتلا به عفونت نهفته و نمایان شدن علائم بالینی بیماری به‌محض بروز استرس، احتمال آلودگی از طریق فرآورده‌های زیست‌شناختی (بیولوژیک) مثل واکسن‌های زنده و انتقال از طریق اسپرم آلوده، اندازه گله، انجام ندادن اقدامات کنترلی برای بیماری و جفت‌گیری طبیعی در توجیه اختلاف از نظر میزان آلودگی بین کشورهای مختلف مورد توجه قرار گرفته‌اند (McDermott *et al*., 1997; Motha *et al*., 1998; Yossef *et al*., 1997; Rodostits *et al*., 2007; Tekes *et al*., 1999). با توجه به آن‌که اصولاً برنامه مدونی جهت واکسیناسیون علیه این بیماری در سطح کشور وجود ندارد، لذا مشاهده هر گونه عیار سرمی در خون گاوها نشان از آلودگی با BHV-1 خواهد بود و با توجه به طبیعت بیماری که از الگوی بیماری هرپس-ویروس‌ها تبعیت می‌کند، به‌دنبال آلودگی حیوان، BHV-1 هم‌چنان در دستگاه عصبی باقی مانده و در هنگام بروز استرس مجدداً به‌شکل فعال نمایان خواهند شد، به‌طوری که جهت تشخیص بیماری IBR به‌شکل مخفی در گاوهای نر وارداتی با تزریق کورتیکو-استروئیدها در طی دوران قرنطینه می‌توان گاوهای نر مبتلا به‌شکل مخفی بیماری را (که فاقد عیار سرمی نیز می‌توانند باشند) پس از ظهور علائم بالینی تشخیص داده و مجزا نمود. نکته حائز اهمیت در اینجا حضور تعدادی از گاوها است که علی‌رغم آلوده بودن به ویروس، فاقد هر گونه عیار سرمی هستند (Ferankenak, 1997; Karshoek *et al*., 1996).

از آنجایی که این مطالعه روی گاومیش‌های ارجاعی به کشتارگاه اهواز صورت گرفته است، اطلاعات دقیقی از وضعیت نگه‌داری آن‌ها در دسترس نمی‌باشد. هرچند که با مراجعه نگارندگان به محل‌های نگه‌داری گاومیش در شهر اهواز جهت درمان گاومیش‌های بیمار می‌توان بر این امر تأکید نمود که سیستم پرورشی و نگه‌داری آنها تقریباً یکسان بوده و تاثیر قابل ملاحظه‌ای روی اختلاف در فراوانی آلودگی بین این مناطق نمی‌گذارد. از طرف دیگر، مطالعات صورت گرفته در سایر کشورها روی گاومیش نیز به این موضوع نپرداخته‌اند.

لازم به تأکید است که در بیماری‌های عفونی که به‌طور مستقیم موجب مرگ دام نمی‌شوند، به موازات


www.SID.ir

افزایش سن به‌دلیل احتمال افزایش برخورد با عامل بیماری‌زا احتمال وقوع آلودگی در حیوانات نیز زیادتر می‌شود و ارتباط معنی‌دار و مثبتی بین سن و آلودگی وجود دارد (همت زاده و همکاران، ۱۳۸۱؛ McDermott *et al*., 1997; Riegel *et al*., 1987). در بعضی از مطالعات ارتباط معنی‌داری بین سن و آلودگی وجود نداشته و عدم ارتباط بین سن و آلودگی را به بالا بودن فراوانی ابتلا به این بیماری در مقایسه با پایین بودن مرگ و میر ناشی از آن نسبت داده‌اند، به‌طوری که ممکن است در یک دام‌داری میزان واگیری به ۱۰۰ درصد برسد که در این شرایط ارتباط بین سن و آلودگی از بین می‌رود (Kampa, 2006، حاجی حاجیکلایی و صیفی آبادشاپوری، ۱۳۸۵).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که فراوانی آلودگی به BHV-1 در گاومیش‌های تحت بررسی در اهواز تقریباً مشابه مطالعات قبلی (حاجی حاجیکلایی و صیفی آبادشاپوری، ۱۳۸٦) است که روی این دام در اهواز صورت گرفته است. از آن‌جایی‌که در مطالعه قبلی فقط از روش آزمایش خنثی‌سازی ویروس استفاده گردید و در این مطالعه علاوه بر آزمایش خنثی‌سازی ویروس از آزمایش الیزا هم استفاده شد و بررسی‌های آماری نشان داد که اختلافی بین این دو روش از نظر نشان دادن میزان آلودگی گاومیش‌ها به BHV-1 وجود ندارد، یا به عبارت دیگر هر دو روش قادر به برملا نمودن وجود پادتن ضد ویروس BHV-1 در سرم خون گاومیش می‌باشند و از طرف دیگر به دلیل اینکه روش خنثی‌سازی ویروس زمان‌بر و نیاز به کشت سلول و امکانات و تجهیزات متناسب با کشت سلول می‌باشد و این امکانات در همه آزمایشگاها وجود ندارد، لذا می‌توان توصیه نمود به جای آن از آزمایش الیزا که روشی آسان و سریع می‌باشد استفاده شود.

## منابع


- حاجی حاجیکلایی، م.ر. و صیفی آباد شاپوری، م.ر. (۱۳۸٦). بررسی سرواپیدمیولوژی آلودگی با هرپس ویروس تیپ ۱ (BHV-1) در گاوهای اهواز. مجله دامپزشکی ایران، دوره ۲، شماره ۲، صفحات: ۳۲-۲۳.
- حاجی حاجیکلایی، م.ر. و صیفی آباد شاپوری، م.ر. (۱۳۸۵). فراوانی حضور آنتی‌بادی برعلیه اسهال ویروسی گاو و هرپس ویروس تیپ ۱ در گاومیش‌های کشتار شده در کشتارگاه اهواز. طرح تحقیقاتی شماره ٦٤١.
- حضرتی، ح. (۱۳۵۵). هرپس ویروس های گاوی و نقش بیماری زایی آنها. نشریه شماره ۲۲ سازمان تحقیقات کشاورزی انستیتو رازی.
- کارگر، م.ر.، بکائی، س. و شکوه، م. (۱۳۸۱). بررسی میزان شیوع پادتن‌های ضد ویروس‌های BLV, BH4 , IBR, BVD, PI3 در گاومیش های مستقر در مرکز تهیه اسپرم در ارومیه. پژوهش و سازندگی، شماره ۲، جلد ۱۵، صفحات ۲۳-۱٦.




Archive of SID
www.SID.ir

- مامی، ف.، حاجی حاجیکلایی، م.ر. و صیفی آباد شاپوری، م.ر. (۱۳۹٤). مقایسه کیت تجاری الیـزا بـا آزمـایش خنثی سازی ویروس جهت تعیین آنتی بادی ضد ویروس اسهال ویروسی گاو در گـاومیش. مجلـه دامپزشـکی ایران. در دست چاپ.
- همت‌زاده، ف.، ممتاز، ح.، تاج بخش، ا. و صفری، ح. (۱۳۸۱). بررسی سرولوژی آلودگی بـه ویـروس IBR در گاوداری های استان چهارمهال بختیاری. پژوهشی و سازندگی، شماره ۲، جلد ۱۵، صفحات: ٤۳-۳۸.
- Amoroso, M.G., Corrado, F., Carlo, E. De., Lucibelli, M.G., Martucciello, A., Guarino, A., *et al*. (2013). Bubaline herpesvirus 1 associated with abortion in a Mediterranean water buffalo. Research Veterinary Science 94: 813-816.
- Castrucci, G., Ferrari, M., Osburn, B.I., Frigeri, F., Barreca, F., Tagliati, S., *et al*. (1996). Further investigations on the efficacy of a nonspecific defense inducer evaluated in calves exposed to infectious bovine-rhinotracheitis virus**.** Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease, 2(21): 155-163.
- Albayrak, H., Ozan, E., Beyhan, Y.M., Kurt, M. and Kilicoglu, Y. (2012). A serological Investigation of Some Aetiological Agents Associated with Abortion in Domestic Water Buffalo (Bubalus bubalis Linneaus, 1758) in Samsun Province of Northern. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 7(3): 155-160
- Carvalho, O.S., Gonzaga, L.N.R., Albuquerque, A.S., Bezerra, D.C. and Chves, N.P. (2015). Ocuurence of Brucella abortus, Leptospira interrogans and bovine herpesvirus type 1 in buffalo (Bubalus bubalis) herd under extensive breeding system. African Journal of Microbiology Research, 9(9): 593-603.
- Ferankenak, F.P. (1997). Probability of detecting antibodies to BHV-1 in bulk milk after production of a positive animal on to negative farm. Journal of Veterinary Record, 140: 90-92.
- Karshoek, M.J., Rijsew, J.K. and Vanairschat, J.T. (1996). Persistent of antibodies against BHV-1 and Virus reactivation two to three years after infection. Veterinary Microbiology, 53: 103-110.
- Kampa, J. (2006). Epidemiology of Bovine viral diarrhea virus and bovine herpesirus type 1 Infections in dairy cattle herds**,** evidence of self-clearance and detection of infection with a new atypical pestivirus. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, pp: 17-21
- Lucas, M.H., Westcott, D.G. and Edwards, S. (1986). Immunofluorescence and cell culture techniques in the diagnosis of viral infection of abortive fetus. Journal of Veterinary Record, 114: 243-242.
- McDermott, J.J., Kadohira, M., Ocallaghan, C.J. and Shoukri, M. (1997). A comparison of different Models for assessing Variations in the sero-prevalence of infectious bovine rhinotracheitis by farm, area and district in Kenya. Preventive Veterinary Medicine, 32: 219-234.
- Motha, M.X.Y and Hansen, M.F. (1998). Prevalence of IBR (infectious bovine rhinotracheitis), $PI_3$ (parainfluenza type 3), BRS (bovine respiratory syncytial) and BCV (bovine coronavirus) infections in the dairy cattle population of New Zealand. New- Zealand Veterinary Journal, 46(6): 239-240.
- Riegel, C.A., Ayers, V.K. and Collins, J.K. (1987). Rapid, sensitive, competitive serologic enzyme-linked immunosorbent assay for detecting serum antibodies to bovine herpesvirus type 1. Journal of Clinical Microbiology, 25(12): 2418-2421.
- Robert, F.K. (2001). Viral Disease of Cattle. Second edition. USA: Iowa State, University Press, pp: 113-126, 159-170.
- Rodostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., and Constable, P.D. (2007). Veterinary Medicine. 9th ed., London: W.B. Saunders, pp: 1085-1105.


Archive of SID


www.SID.ir

- Scicluna, M.T., Saralli, G., Bruni, G., Sala, M., Cocumelli, C., Caciolo, D., *et al*. (2007). Epidemiological situation of Herpesvirus infections in buffalo herds: Bubaline Herpesvirus1 or Bovine Herpesvirus1. Italian Journal of Animal Science, 6: 845-849.
- Smith, B.P. (2009). Large Animal Internal Medicine. 2nd ed., London: Mosby, 635-636, 809-814.
- Tautz, N., Meyers, G. and Thiel, H.J. (1998). Pathogenesis of mucosal disease a deadly disease of cattle caused by a pestiviruse. Clinical and Diagnostic Virology, 10: 121-127.
- Tekes, L., Markos, B., Kecskemeti, S., Meheshalvi, J., Mate, Z. and Kudron, E. (1999). Prevalence of bovine herpesvirus 1(BHV-1) infection in Hungarian cattle herds. Acta Veterinary Hungarica, 47(3): 303-309.
- Yossef, N.M.A. (1997). Prevalence of antibodres to bovine res piratory syncytial virus, infectious bovine rhinotracheitis and parainflaenza-3 in Cattle and buffalo calves. Egyptian Journal of Agriculture Research, 75(4): 1135-1146.
- FAO. (1977). Animal Production and Health, the Water Buffalo, 4: 109-111.


Archive of SID



www.SID.ir