Archive of SID

به‌کارگیری آزمون ایمنوفلئورسنت غیرمستقیم جهت تشخیص پادتنهای ضدویروس IBR

دکتر فرهید همت‌زاده[1]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۲، ۷۰-۶۵، (۱۳۸۰)

بیماری IBR یکی از مهمترین و فراوانترین بیماریهای عفونی در جمعیت گاوهای جهان می‌باشد. وجود چهره‌های متعدد بالینی در سیستمهای متنوع پرورش گاو و همچنین طبیعت خاص و ویژه عفونت ناشی از این ویروس که بازتابی از پاتوژنز اغلب عفونتهای هرپس ویروسی است اهمیت ویژه‌ای را به تشخیص آزمایشگاهی این بیماری می‌دهد. هدف از انجام این تحقیق تهیه کیت ایمونوفلئوروسنت غیرمستقیم جهت تشخیص سرمی بیماری IBR در گاو بود که طی سه مرحله انجام گرفت. مرحله اول تهیه آنتی‌گلبولین ضدگاوی کنژوگه با فلئورسئین ایزوتیوسیانات بود که با ایمن‌سازی ۱۰ رأس خرگوش، جداسازی سرم، ترسیب ایمونوگلوبولینها، کنژوگاسیون ایمونوگلبولینهای سرمی با FITC، جداسازی پادتنهای کنژوگه در روی ستون سفادکس و خالص‌سازی نهایی آنها در کیسه‌های دیالیز، انجام گرفت. مرحله بعد تهیه پادگن استاندارد بود که با کشت و تکثیر ویروس IBR در کشت سلولی R-BK، عیارسنجی ویروس، تلخیص و تغلیظ ویروس توسط اولتراسانتریفوژ و تثبیت پادگن انجام گرفت. در مرحله سوم کیت حاصله با آزمایش بالغ بر ۱۰۰۰ نمونه سرمی که قبلاً با آزمون SN آزمایش شده بودند، استاندارد گردید طوری که بهترین رقت کنژوگه رقت $\frac{1}{10}$، بهترین عیار ویروس عیار $10^{5/5}TCID50$ تا 10^5 و بهترین رقت سرمی رقت $\frac{1}{8}$ به‌دست آمد. میزان همخوانی دو آزمون SN و IFA برابر با ۹۸/۴ درصد محاسبه شد و طبیعتاً اختلاف معنی‌داری نیز بین این دو آزمون مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی : تورم عفونی بینی و نای گاو، ایمونوفلئوروسانت، فلئوروسین ایزوتیوسیانات، آزمون خنثی‌سازی سرم، حساسیت و ویژگی.

لزوم به‌کارگیری آزمونهای تشخیص سریع، دقیق، حساس، ویژه و ارزان نه تنها برای بیماری IBR (Infectious Bovine Rhinoteracheitis) بلکه برای تمامی بیماریهای واگیردار هدفی است که مدنظر کلیه دست‌اندرکاران امور دامپزشکی می‌باشد. امروزه روشهای بسیار متعددی جهت تشخیص سرمی یا ردیابی پادگنی یا ژنتیکی ویروس IBR در دنیا ابداع گردیده است که به همراه ابزارهای لازم جهت اعمال مدیریت بهداشتی و واکسیناسیون به‌منظور مبارزه با این بیماری به‌کار می‌روند که می‌توان به آزمونهای سرمی ردیابی پادتن مثل الیزا (ELISA)، SN و بعضاً ایمنوپراکسیداز و ایمنوبلاتینگ اشاره نمود که به همراه آزمونهای ردیابی پادگن از قبیل ایمنوپراکسیداز، ایمنوبلاتینگ و ایمنوفلئورسنت در جهت تشخیص بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۲ و ۹).

خانواده بزرگ هرپس ویروسها دارای چندین ویروس از مهمترین اجرام بیماریزای انسان و حیوان است. تاکنون بیش از صد تیپ هرپس ویروس شناخته شده است که آنها را از حشرات، خزندگان، دوزیستان، پرندگان و پستانداران جدا کرده‌اند. بیماریهای آبله مرغان، زونا و تبخال انسانی، بیماری مارک (Mark's disease)، هاری کاذب (Pesudorabies)، تورم بینی و نای عفونی گاو از جمله این بیماریها هستند (۳۱، ۲۵، ۱۱).

ذرات هرپس ویروسی حساس و شکننده بوده و در خارج از بدن زنده نمی‌مانند، ویروس در اثر تماسهای نزدیک مخصوصاً تماسهای فیزیکی که سطوح اپیتلیال مرطوب در مجاورت یکدیگر قرار می‌گیرند، مثل تماس جنسی، لیسیدن یا نوازش نوزاد توسط مادر منتقل می‌شوند. در نقاط مختلف مثل محل پرورش گاوهای پرواری، زایشگاه و آغل و همچنین در مرغداری، عطسه بیماران و انتشار ریز قطرات مهمترین راه انتقال بیماری است. انتشار ویروس می‌تواند به‌طور مداوم یا متناوب بدون حضور بیماری و یا به شکل دوره‌ای همزمان با عفونتهای بالینی برگشت‌پذیر رخ داده و همچنین ممکن است انتشار ویروس سالها پس از عفونت اولیه رخ دهد (۳۰، ۲۵، ۷).

این ویروسها از لحاظ بالینی طیف وسیعی از بیماریها را ایجاد می‌کنند. برخی دارای میزبانهای متعدد و عده‌ای دیگر واجد تعداد محدودی میزبان هستند. چهره بارز همه عفونتهای هرپس ویروسی حضور مادام‌العمر ویروس در بدن است که معمولاً به شکل پنهان دیده می‌شود. فعال‌شدن مکرر این ویروسهای نهفته در موارد سرکوب دستگاه ایمنی، عوارض شدید بالینی را موجب می‌شود (۲۶، ۷).

ویریون غشادار این ویروسها قطری حدود ۱۵۰ نانومتر دارد، ژنوم ویروس به‌صورت DNA دو رشته‌ای است که در بخش مرکزی ویریون قرار دارد. قرابت پادگنی بین هرپس ویروسها پیچیده است، اگرچه بین اعضای این خانواده پادگنهای مشترکی تشخیص داده شده است ولی هر یک از آنها واجد گلیکوپروتئینهای اختصاصی بوده که خاصیت پادگنی آنها ثابت است (۲۸، ۲۵، ۷، ۵).

دون خانواده آلفا هرپس ویرینه (Alphaherpesvirinea) دربرگیرنده ویروسهایی است که به سرعت رشد کرده سلولهای آلوده شده را منهدم می‌کنند. این هرپس ویروسها به‌طور معمول عصب‌گرا (Nurotropic) (نروتروپیک) بوده و در عقده‌های حسی، عصبی عفونت نهفته ایجاد می‌کنند (۲۵ و ۲۳).

ویروس عامل بیماری IBR یا هرپس ویروس تیپ یک گاوی (BHV-1) تحت خانواده آلفا هرپس ویرینه و منتسب به جنس واریسلا ویروس می‌باشد. این ویروس را به سهولت می‌توان در کشت کلیه جنین گاو جدا ساخت، همچنین ویروس در کشت سلولهای کلیه خوک، سگ، گوسفند، بز و اسب رشد کرده و در تمام آنها اثرات سیتوپاتیک (" Cytopathic effect " CPE) شدیدی ایجاد می‌کنند، آثار CPE پس از ۳۶-۲۴ ساعت شروع شده و ظرف ۹۶-۷۲ ساعت مرگ سلول به حد نهایی رسیده و می‌توان بعضاً در هسته سلولها گنجیدگیهای ویژه‌ای را مشاهده نمود (۳۱، ۲۵، ۲۳).

BHV-1 تمایل شدیدی به رشد در بافتهای مختلف بدن گاو داشته و بیماریهایی مانند (" IPV " Infectious Postular Vulvovaginit)، IBR، (" IBP " Infectious Balano Postitis)، انسفالیت، تورم ملتحمه چشم و ... را تولید می‌کند، چنین به‌نظر می‌رسد که با وجود تشابه عامل مولد آنها، شاید بین سویه‌های مختلف BHV-1 از نظر توانایی تکثیر و تمایل به سلولها و ساختمان پادگنی اختلافاتی موجود باشد و به واسطه همین اختلافات از یکدیگر متمایز شده و هر سویه با خواص پادگنی مشخص، آلودگی ویژه‌ای را در دام تولید نماید. با استفاده از روش خنثی‌سازی سرم مشخص گردیده که آنتی‌سرم تهیه‌شده برعلیه هر سویه، سویه‌های مختلف BHV-1 را به یک میزان خنثی می‌نماید. به‌طور خلاصه می‌توان گفت که سویه‌های مختلف BHV-1 اختلاف پادگنی فاحشی با یکدیگر ندارند و همه آنها را باید در یک گروه پادگنی هرپس ویروس تیپ یک گاوی رده‌بندی نمود (۲۸، ۲۷، ۲۵، ۱۶، ۶).

گلیکوپروتئینهای اصلی شناخته شده در ساختمان BHV-1 عبارت‌اند از gD.gC.gB که به همراه ۷ گلیکوپروتئین دیگر، تعدادی پروتئین غیرقنددار و تعدادی آنزیم و عوامل تنظیم‌کننده پروتئینهای اصلی ویروس را تشکیل می‌دهند (۲۸، ۱۳، ۱۲، ۸).

۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

مهمترین و زیان‌آورترین چهره بالینی عفونت با BHV-1 بیماری IBR است که عفونتی است بسیار واگیر که قسمتهای مختلفی از دستگاههای تنفس، گوارش و تناسلی و سایر سطوح اپیتلیال را درگیر می‌کند. ویروس گرایش خاصی به بافت پوششی قسمت فوقانی دستگاه تنفس، بوقکهای بینی حلق، حنجره و نای داشته و ممکن است برونشها را نیز درگیر کند، در دستگاه تناسلی نیز ایجاد تورم عفونی پوستولر فرج و واژن در ماده گاوها و تورم غلاف و قضیب در گاوهای نر را ایجاد می‌کند که از نظر اقتصادی اهمیت ویژه‌ای دارند (۳۱، ۲۴، ۱۳).

تورم بینی و نای عفونی و یا همان فرم تنفسی بیماری و سقط جنین ماده گاوها، ویژه دامداریهایی است که در آن تعداد زیادی گاو یا گوساله به‌صورت متراکم در یک جا نگهداری می‌شوند و کمتر در میان گاوهایی که به‌صورت پراکنده نگهداری می‌شوند بروز می‌کند زیانهای اقتصادی بیماری مربوط به هزینه‌های درمان و پیشگیری، کاهش وزن و تولید شیر و بالاخره سقط جنین و مرگ و میر می‌باشد، به‌طوری که در بعضی از مراکز تولید شیر در امریکا تا ۵۱ دلار برای هر رأس گاو شیرده برآورد شده است (۲۹، ۱۴، ۱۰).

بعد از سال ۱۹۵۰ که اولین موارد ابتلا به ویروس IBR در ایالت کلورادای امریکا مشاهده شد تاکنون اشکال مختلف آلودگی به این جرم از نقاط مختلف دنیا گزارش گردیده است. در ایران تا قبل از ورود گاوهای اصیل خارجی بیماری IBR سابقه نداشته است. در سال ۱۳۴۴ به‌دلیل شیوع سقط جنین در یکی از گاوداریهای صنعتی اطراف تهران به بیماری مشکوک شدند و در سال ۱۳۵۲ با ورود گاو از انگلستان بیماری در گاوداریهای اطراف تهران شایع گردید. ماهیت ویروس با جداکردن آن توسط دکتر حضرتی به اثبات رسید. از آن پس وجود بیماری در استانهای مختلف کشور به‌وسیله بررسیهای سرولوژیکی مشخص گردید و امروزه اکثر مناطق کشور آلوده است (۲۹، ۹، ۲).

ایمنی در برابر ویروس عامل بیماری IBR مکانیسم پیچیده‌ای دارد و در اثر ابتلا به این ویروس سیستم ایمنی هومورال و سلولی تحریک می‌گردند. پادتنهای خنثی‌کننده ضدویروس از نوع IgG و IgM هستند که ۱۰ روز بعد از ایجاد عفونت به‌وجود می‌آیند. IgA در بینی و ترشحات دستگاه تناسلی وجود دارد ولی نقش حفاظت‌کنندگی آن هنوز معلوم نیست. فعالیت ایمنی سلولی به‌علت فعالیت ویروس ۵ روز بعد از آلودگی ایجادشده و ۱۰-۸ روز بعد از ایجاد عفونت به حداکثر می‌رسد. تصور می‌شود که پاسخهای ایمنی سلولی مسئول بهبودی از بیماریهای هرپس ویروسی هستند. ابتلا به IBR باعث افزایش حساسیت حیوان به عفونتهای ثانویه باکتریال بویژه پاستورلا هملولتیکا می‌گردد که موجب تغییر وضعیت ایمنی میزبان می‌گردد (۱۷ و ۱۵).

جداکردن ویروس عامل بیماری در کشت سلول و کاوش در پادتنهای سرمی طی دو بار خونگیری، یکی در شروع بیماری و دیگری در دوره نقاهت برای تشخیص قطعی بیماری ضروری است. آزمایش ترشحات بینی به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی (" EM " Electron Microscopy) وسیله ساده‌ای جهت پی‌بردن به ماهیت بیماری است. روشهای مستقیم برای تشخیص ویروس در نمونه شامل روش تشخیص با EM، روش تشخیص با میکروسکوپ ایمنوفلورسانس، هیبریدیزاسیون DNA و آنالیز اندونوکلناز - محدودکننده است که با استفاده از این روشها می‌توان به‌طور مستقیم ویروس یا پادتن ویروسی را در بافت آلوده بیمار یا کشت سلول تلقیح شده یا بافت یا ترشحات آلوده تشخیص داد. با استفاده از برخی روشهای سرولوژی می‌توان حضور پادتن ضدویروس را در سرم تعیین نمود. این روشهای شناسایی عبارتند از: الیزا، رادیو ایمنواسی (" RIA Radio Immuno Assay)، ایمنوپراکسیداز (" IP Immuno Proxidase). روشهای مذکور از روشهای جدید شناسایی پادتن هستند. روشهای قدیمی شامل ثبوت عناصر مکمل (" CF Complement Fixation) و خنثی‌سازی سرم (SN) است که همچنان در برخی آزمایشگاهها کاربرد دارد (۲۹، ۱۳، ۱۰، ۵).

آزمون ایمنوفلورسانس اغلب برای ردیابی پادگنهای این ویروس در مقاطع بافتی یا کشتهای سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد و کمتر در تشخیصهای سرولوژیک به‌کار گرفته شده است. Lucas در سال ۱۹۸۶ از آزمون IFA جهت تشخیص سرولوژیک IBR استفاده نموده و به نتایج جالب توجهی نیز رسید ولی اشاره‌ای به میزان حساسیت و ویژگی آزمون یا میزان همخوانی آن با آزمونهای سرمی معمول نکرده است (۲۲).

مواد و روش کار

مواد مصرفی : کشت سلول (" RBK Razi Bovine Kidny)، محیط کشت سلولی (" MEM Minimal Essential Medium)، محیط کشت سلولی استوکر (Stocker)، سرم جنین گاو (" FCS Fetal Calf Serum)، تریپسین ورسن (Trypsin Versen)، آنتی‌بیوتیکهای پنی‌سیلین، استرپتومایسین و نیستاتین، ادجوانت ناقص فروند (Ferund in Compelet Adjuvant)، سولفات آمونیوم، سفادکس G25، بافر فسفات سالین (" PBS Phosphat Buffered Salin)، بافر کربنات بی‌کربنات، فلوروسین ایزوتیوسیانات (FITC)، تریپان بلو، آگار نوبل، اتانول فوق خالص، سدیم آزاید و سویه ویروس IBR جدا شده در ایران (۲).

وسایل : بطریهای رو (Roux buttle)، ستون کروماتوگرافی، لامهای فلئورسنت، میکروسکوپ معکوس (Inverted Microscope)، میکروسکوپ فلئورسنت، اسپکتروفتومتر، اواتراسانتریفوژ، همزن مغناطیسی (Magnetic stirre) به اضافه ۱۰ رأس خرگوش جوان به وزن تقریبی ۵۰۰ گرم.

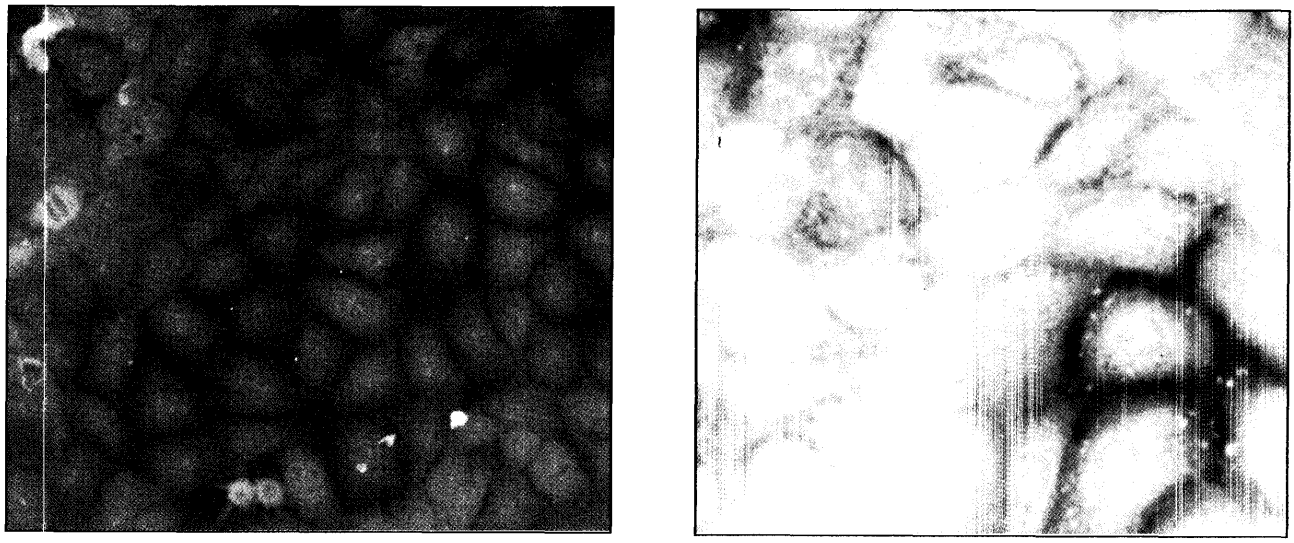
روشها : ۱ - ایمن‌سازی : با انتخاب ۱۰ سر خرگوش جوان و سالم به وزن تقریبی ۵۰۰ گرم اقدام به تزریق آنها طبق برنامه‌ای مشخص به فاصله ۱۵ روزه گردید، تزریقات اول و دوم و سوم با استفاده از گلبولین‌های ترسیب‌شده مخلوط سرم چند گاو به همراه ادجوانت ناقص فروند از راه زیرجلدی در ۱۰ ناحیه از پوست ناحیه کمر در دو طرف ستون مهره‌ها در هر محل به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر از مخلوط مکمل فروند و سرم انجام گرفت. تزریقات چهارم تا نهم از راه داخل عضلانی به میزان یک میلی‌لیتر در عضله ران و فاقد مکمل فروند انجام شد (۱۹ و ۱).

جهت ردیابی آنتی‌گلبولین تولیدشده در بدن خرگوش طی مراحل مختلف ایمن‌سازی بعد از تزریق پنجم، هفتم و نهم از ورید حاشیه گوش خرگوشها به میزان تقریبی یک میلی‌لیتر خونگیری به‌عمل آمد و به‌وسیله آزمون ژل دیفوزیون در مجاور مخلوط سرم گاوها مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین میزان پادتن، اختصاص به دو هفته بعد از تزریق نهم بود (روز صد و شصت و ششم) که در این روز خونگیری نهایی از قلب خرگوشها به‌عمل آمده و اقدام به جداسازی سرم و غیرفعال‌سازی در ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت نیم ساعت گردید (۱۸).

۲ - خالص‌سازی و کنژوگاسیون سرم : جهت حذف پادتنهای غیراختصاصی تولیدشده برعلیه پروتئینهای غیرایمنوگلبولینی گاوها در بدن خرگوشها اقدام به جذب آنتی‌سرمها با سرم آلبومین گاوی گردید به‌طوری که حجم مشخصی از آنتی‌سرم با میزان هم حجم سرم آلبومین گاوی حل شده در تامپون PBS به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و سپس مجموعه حاصل در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت سانتریفوژ گردید، مایع رو جهت انجام مراحل بعدی آزمون جدا شد و در فریزر نگهداری گردید. سپس ایمنوگلبولین‌های موجود در سرم خرگوش با استفاده از سولفات آمونیم اشباع رسوب داده شده و پس از دو بار شستشو و ترسیب مجدد جهت انجام آزمون پروتئین سنجی به روش لوری مورد استفاده قرار گرفتند. میزان پروتئین حاصله برابر ۱۱۰ میلیگرم در دسی‌لیتر به‌دست آمد، که بر همین اساس میزان FITC مورد نیاز در بافر کربنات بیکربنات محاسبه شده و پس از آماده‌سازی به آرامی به محلول آنتی‌گلبولین اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت برروی همزن مغناطیسی در حرارت ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا عمل ترکیب‌شدن FITC با ایمنوگلبولین‌ها بخوبی انجام گردید (۱۹).

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۱ – الف) فلئورسنت سبز درخشان در نمونه‌های مثبت در مقایسه با ب) فلئورسنت زمینه‌ای در موارد منفی.

جهت پالایش و جداسازی ایمنوگلبولین‌های کنژوگه مجموعه حاصل از ستون کروماتوگرافی حاوی سفادکس G25 عبور داده شد. معمولاً فراکسیون حاوی پادتنهای کونژوگه به شکل یک باند پررنگتر از سطح ستون به طرف پایین شروع به حرکت کرده که می‌بایستی بلافاصله پس از رسیدن باند به انتهای ستون اقدام به جمع‌نمودن محلول حاصله در ویالهای مختلف به حجم تقریبی یک میلی‌لیتر نمود (معمولاً بهترین غلظت ایمنوگلبولین‌های کونژوگه در ویالهای دوم و سوم حاصل می‌آید) در پایان این مرحله جهت حصول اطمینان از خروج مواد غیرکنژوگه اضافی و افزایش خلوص کنژوگه، حاصل پالایش مرحله قبل در حضور PBS دیالیز گردید و حاصل دیالیز مجدداً به روش لوری پروتئین‌سنجی شده که میزان پروتئین در این مرحله ۷۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر برآورد گردید، نهایتاً غلظت نهایی محلول کنژوگه به ازای ۲۰ میلی‌گرم در ۲ میلی‌لیتر تنظیم شده و به‌عنوان آنتی‌گلبولین کنژوگه ضدگاو به‌عنوان یکی از اجزای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت (۱۹ و ۱۸).

۳ - تهیه پادگن استاندارد : پادگن مورد استفاده در این آزمون ویروس IBR جدا شده در ایران می‌باشد. اولین قدم برای تهیه پادگن انتخاب سلول مناسب جهت انجام کشت سلولی به‌منظور تکثیر ویروس است. از آنجایی که هرپس‌ویروسهای گاوی بخوبی در کشتهای سلولی با منشأ گاو تکثیر می‌یابند و سویه‌های سیتوپاتوژن آنها پس از چند روز CPE واضحی را در کشتهای سلولی ایجاد می‌نمایند، برای انجام کشت سلول در این تحقیق از تیره سلولی RBK (تیره سلولی RBK توسط دکتر خدمتی در مؤسسه رازی تهیه شده و در حال حاضر جهت مصارف تشخیصی در بخش ویروس‌شناسی مؤسسه رازی استفاده می‌شود) استفاده شد. ویروس IBR پس از ۳ روز CPE مناسبی را در این تیره سلولی ایجاد می‌نماید. محیط کشت مناسب برای این تیره سلولی محیط کشت استوکر به اضافه ۱۰ درصد سرم جنین گاو می‌باشد.

بعد از رشد کامل ویروس در تیره سلولی کلیه گاو اقدام به عیارسنجی ویروس به روش TCID50 گردید و از عیار 10^{5} تا $10^{5/5}$ جهت انجام آزمونهای بعدی استفاده شد. مایع حاصل از تکثیر ویروس در کشت سلولی یکبار در ۲۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نموده تا قطعات بزرگ سلولی ته‌نشین گردد سپس جهت رسوب کلیه ذرات غیرویروسی اقدام به سانتریفوژ در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد شد و سپس مایع رویی لوله‌ها در ۸۰۰۰۰g (۲۶۰۰۰ دور در دقیقه) در درجه حرارت ۴ درجه به مدت ۲ ساعت اولترا سانتریفوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شده و رسوب باقیمانده را پس از حل‌کردن در $\frac{1}{100}$ حجم اولیه در بافر به‌عنوان پادگن جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۴ - راه‌اندازی و استانداردنمودن آزمون : پس از تثبیت پادگن تخلیص‌شده (ویروس IBR) برروی لام با استفاده از اتانل مطلق، نمونه‌های سرمی مثبت و منفی گاو که قبلاً حضور یا عدم حضور پادتنهای ضد IBR با توسل به آزمون SN تشخیص داده شده بود با پادگن تثبیت شده برروی لام مجاور شده و بعد از گذشت نیم ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با PBS شستشو داده شدند، بعد از شستشوی لام برروی هر کدام از نمونه‌ها در محل مشخص شده یک قطره پادتن کونژوگه اضافه می‌گردد به‌طوری که محلول مذکور تمام سطح مشخص‌شده برای نمونه را کاملاً بپوشاند پس از این مرحله نیز نیاز به نیم ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد می‌باشد که پس از طی این زمان اقدام به شستشوی لامها با استفاده از PBS می‌گردد. در پایان این مرحله می‌توان نمونه‌ها را در زیر میکروسکوپ فلئورسنت مشاهده نمود که نمونه‌های مثبت به رنگ سبز درخشان مشخص شده و نمونه‌های منفی تنها رنگ فلئورسنت زمینه یا سبز مایل به خاکستری را از خود نشان می‌دهند (تصویر ۱) (۱۸).

جهت به‌دست‌آوردن بهترین رقت پادگن کونژوگه اقدام به تهیه رقتهای ۱، $\frac{1}{5}$، $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{20}$ از پادتن کنژوگه گردید و در مجاور نمونه‌های متعدد مثبت و منفی اقدام به انجام آزمون به روش ذکر شده در قبل شد که در این حالت بهترین پاسخها در رقت $\frac{1}{10}$ پادتن کونژوگه به‌دست آمد و واکنش رنگی مطلوب و قابل تشخیص در نمونه‌های مثبت حاصل شد، در حالی‌که نمونه‌های منفی فاقد هر گونه واکنش فلئورسنت مشخص بودند. پس از انتخاب عیار مطلوب کنژوگه، ۱۰۰۰ نمونه سرمی اخذ شده از مناطق مختلف استان چهار محال و بختیاری که قبلاً با آزمون SN مورد آزمایش قرار گرفته بودند و حضور یا عدم حضور پادتنهای ضدویروس IBR در آنها مشخص شده بود اقدام به انجام آزمون IFA به روش فوق‌الذکر گردید. روی کلیه نمونه‌ها به‌طور تقریباً هم زمان توسط دو فرد متفاوت و بدون اطلاع از نتایج کار همدیگر آزمونهای SN و IFA انجام گرفت، نتایج حاصله در جدول ۱ به تفکیک ذکر گردید (۳).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ - نتایج حاصل از مقایسه آزمونهای سرولوژیک SN و IFA در تشخیص سرمی IBR.

	SN+	SN-	جمع
IF+	۴۲۰	۱۲	۴۳۲
IF-	۴	۵۶۴	۵۶۸
	۴۲۴	۵۷۶	۱۰۰۰

P value<۰/۰۰۰۱

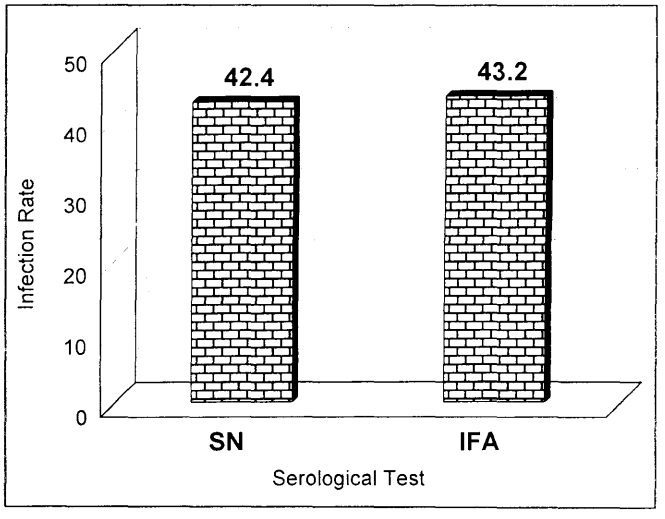
نتایج

همان‌گونه که در مباحث مربوط به روش کار نیز بیان گردید می‌توان نتایج حاصل از این تحقیق را به دو دسته تقسیم نمود. نتایج مرحله اول که مربوط به روش استانداردنمودن آزمون و به‌دست‌آوردن بهترین عیار سرمی از خرگوشها، بهترین رقت سرمی مربوط به سرمها و کونژوگه و بهترین غلظت پادگن ویروسی بود. بهترین عیار سرمی با توجه به نتایج حاصل از آزمون ژل دیفوزیون در ۱۵ روز پس از نهمین تزریق داخل عضلانی در خرگوشها به‌دست آمد که در همین زمان نیز از خرگوشها خونگیری به‌عمل آمد و اقدام به جداسازی سرم گردید.

بهترین غلظت پادگن ویروسی معمولاً غلظتی است که رسوب حاصل از اولتراسانتریفوژ در $\frac{۱}{۱۰۰}$ حجم اولیه نمونه ویروسی با عیار ۱۰۵ تا ۱۰۵/۵ تهیه گردد و در نهایت با استفاده از اولتراسانتریفوژ نمونه ویروسی در ۸۰۰۰۰g (۲۶۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۲ ساعت در حرارت ۴ درجه سانتیگراد و شرایط خلأ سانتریفوژ گردید و غلظت و خلوص مطلوب ویروسی حاصل شد (۱۹، ۱۲، ۶).

در مرحله بعدی جهت مشخص‌نمودن بهترین رقت پادتن کونژوگه اقدام به انجام آزمون IFA با رقتهای ۱، $\frac{۱}{۵}$، $\frac{۱}{۱۰}$ و $\frac{۱}{۲۰}$ برروی رقتهای $\frac{۱}{۲}$ تا $\frac{۱}{۱۶}$ نمونه‌های سرمی منفی و مثبت گردید که بهترین رقت سرم مورد آزمون رقت $\frac{۱}{۸}$ به‌دست آمده در آزمون SN نیز از رقت $\frac{۱}{۸}$ سرم جهت آزمایش نمونه‌های سرمی استفاده می‌گردد. متعاقب آزمایش ۱۰۰۰ نمونه سرمی با رقتهای تنظیم شده مواد مورد استفاده در مراحل قبلی نتایج زیر حاصل شد.

از تعداد ۱۰۰۰ نمونه آزمایش شده به روش SN تعداد ۴۲۴ نمونه دارای عیار $\frac{۱}{۸}$ و بالاتر بوده‌اند که میزان آلودگی در این روش به ۴۲/۴ درصد بالغ می‌شود، انجام آزمون IFA روی همین نمونه‌ها تعداد ۴۳۲ نمونه مثبت را مشخص نمود که میزان آلودگی با توسل به این آزمون برابر ۴۳/۲ درصد برآورد گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱ - نتایج حاصل از مقایسه آزمونهای سرولوژیک SN و IFA در تشخیص سرمی IBR.

از ۱۰۰۰ نمونه آزمایش‌شده، ۴۲۰ نمونه در هر دو آزمون IFA و SN پاسخ مثبت دادند، تعداد ۱۲ نمونه در آزمون IFA پاسخ مثبت و در SN پاسخ منفی و تعداد ۴ نمونه نیز در SN پاسخ مثبت و در IFA پاسخ منفی از خود نشان دادند. تعداد ۵۶۴ نمونه هم در هر دو آزمون پاسخ منفی داشتند. انجام آزمون آماری فیشرحاکی‌از وجود ارتباط معنی‌دار بین این دو آزمون بوده و میزان همخوانی این دو روش جهت تشخیص پادتنهای ضدویروس IBR برابر ۹۸/۴ درصد برآورد گردید.

بحث

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. کما اینکه اولین گزارشات ناشی از وقوع بیماری نیز در امریکا بوده است. جالب آن است که اولین گزارشات ناشی از حضور بیماری نیز با ورود گاوهای اصیل خارجی بویژه در گاوداریهای اطراف تهران در دهه ۴۰ مصادف می‌باشد (۲۰ و ۲).

وجود ویژگیهای خاص جمعیتی و اپیدمیولوژیک بیماری در ایران، طبیعت خاص و ویژه‌ای را به این بیماری در مملکت ما بخشیده است، به‌عنوان مثال در اکثر قریب به اتفاق گاوهای مملکت واکسیناسیون جهت پیشگیری از این بیماری انجام نمی‌گیرد، گرچه در برخی از گاوداریهای اطراف تهران یا برخی از شهرهای بزرگ یا مراکز تحقیقاتی دامپروری یا تولید اسپرم برخی برنامه‌های واکسیناسیون با استفاده از واکسنهای کشته انجام شده است (۳ و ۲).

از آنجایی که منبع اصلی ویروس در طبیعت خود گاوها هستند، مهمترین برنامه‌ریزی جهت مبارزه با این بیماری اولاً شناسایی گاوهای نر آلوده و جلوگیری از استفاده از اسپرم آلوده در تلقیح مصنوعی می‌باشد. البته در این زمینه بررسیهای اپیدمیولوژیک جهت برآورد میزان موارد مثبت سرمی به‌منظور برنامه‌ریزی برای کنترل بیماری جای خود را دارد.

با توجه به آن که اصولاً برنامه مدونی جهت واکسیناسیون برعلیه این بیماری در سطح مملکت وجود ندارد، لذا مشاهده هر گونه عیار سرمی در خون گاوها دال بر آلودگی با ویروس IBR خواهد بود و با توجه به طبیعت بیماری که از الگوی پاتوژنز هرپس ویروسها تبعیت می‌کند به‌دنبال آلودگی حیوان، ویروس IBR همچنان در دستگاه عصبی باقیمانده و به محض بروز استرس، مجدداً به شکل فعال چهره خود را نمایان خواهد کرد، به‌طوری که جهت تشخیص بیماری IBR به شکل مخفی در گاوهای نر وارداتی با تزریق کورتیکواستروئیدها در طی دوران قرنطینه می‌توان گاوهای نر مبتلا به شکل مخفی بیماری را (که فاقد عیار سرمی نیز می‌توانند باشند) پس از ظهور علایم بالینی تشخیص داده و مجزا نمود. نکته حایز اهمیت در اینجا حضور تعدادی از گاوهاست که علی‌رغم آلوده‌بودن به ویروس فاقد هر گونه عیار سرمی هستند (۲۰ و ۱۴).

به‌کارگیری آزمونهای سرمی ابزار مناسبی جهت تعیین میزان آلودگی و تشخیص سرمی موارد عفونت در گله‌های گاو بوده و آزمون SN آزمونی مناسب جهت تشخیص بیماری IBR (خصوصاً در مواردی که سابقه واکسیناسیون قبلی وجود نداشته باشد) می‌باشد، محققین مختلف حساسیت آزمون SN در تشخیص سرمی IBR را بین ۹۸-۹۴ درصد و ویژگی این آزمون را حدود ۹۶ درصد برآورد نموده‌اند که این ارقام جهت یک آزمون سرمی ارقام مطلوبی به حساب می‌آیند اما از آنجایی که جهت انجام آزمون SN نیاز به سوش زنده ویروس وجود داشته و از طرفی فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی، خاصه امکان انجام کشت سلولی در کمتر جایی از مملکت فراهم است، لذا انجام این آزمون در سطح مملکت به‌منظور تشخیص سریع بیماری اشکالات بسیار فراوانی مواجه می‌نماید. در این میان به‌کارگیری آزمونهای ساده‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند. آزمون IFA جهت تشخیص سرمی بیماری IBR کمتر به‌کار می‌رود و کاربرد آن

www.SID.ir

Archive of SID

بیشتر جهت تشخیص پادگنی بیماری است. محققین مختلف به کرّات آزمون IFA را جهت تشخیص پادگنی ویروس به‌کار گرفته‌اند (۲۲).

روش ایمنوفلئورسنت مورد استفاده در این تحقیق با توجه به سهولت نسبی کاربرد و سرعت بسیار چشمگیر آن در جهت تشخیص سرمی بیماری در مقایسه با SN (دو ساعت در مقابل حداقل ۵ روز) ابزار بسیار مناسبی جهت تشخیص بیماری IBR است و همان‌گونه که در مباحث نتایج نیز ذکر شد از همخوانی بسیار مطلوب ۹۸/۴ درصد با آزمون SN برخوردار بوده و انجام آزمونهای آماری نیز وجود همخوانی معنی‌دار بین نتایج حاصل از این دو آزمون را نشان می‌دهند. لذا با توجه به استانداردشدن این آزمون و همچنین کارآیی نسبتاً ساده آن در هر کجایی که میکروسکوپ فلئورسنت در دسترس باشد می‌تواند به‌عنوان یک آزمون تشخیصی سریع، دقیق و ارزان مورد توجه قرار گرفته و لذا می‌تواند رقیب مناسبی برای آزمون SN به‌حساب آید. گرچه کیت طراحی‌شده در این تحقیق هنوز امکان سنجش حساسیت و ویژگی دقیق در سطح جمعیت و آزمایشگاه را پیدا نکرده است ولی با توجه به نتایج حاصل از آزمون SN و تحلیل آنها در آزمونهای آماری به‌نظر می‌رسد حساسیت این آزمون از آزمون SN کمی زیادتر و ویژگی آن در حدود آزمون SN باشد. لذا ارقام ۹۶ تا ۹۸ درصد جهت ویژگی و ۹۵ تا ۹۶ درصد جهت حساسیت این آزمون قرین به حقیقت به‌نظر می‌رسند (۲۶، ۲۲، ۱۴، ۱۳، ۱۰، ۵، ۴).

دیگر نکته‌ای که در استانداردکردن هر آزمون می‌بایستی مورد توجه قرار گیرد تکرارپذیری نتایج حاصل از آزمون است که در این مورد نیز تعداد ۲۰۰ نمونه از سرمهای مثبت و منفی به شکل تصادفی انتخاب و مجدداً آزمون IFA برروی آنها انجام گرفت. جالب توجه آنکه در کلیه موارد پاسخهای حاصله همخوانی صددرصد را با نتایج اولیه داشته و این بر تکرارپذیربودن آزمون صحه می‌گذارد. با توجه به نتایج حاصل از آزمونهای SN و IFA و همچنین عدم دریافت پاسخهای حدواسط و مشکوک از آزمون IFA به‌نظر می‌رسد این آزمون از نظر تفکیک موارد مثبت و منفی دارای Cut off point بسیار مطلوبی بوده که این نکته یکی از چشمگیرترین برتریهای این آزمون قلمداد می‌گردد به‌طوری که فرد آزمایش‌کننده به سهولت و سرعت می‌تواند قضاوت در مورد منفی یا مثبت‌بودن نتایج را انجام داده و در دایره انتخاب بین مثبت و منفی گرفتار نشود.

با توجه به حساسیت، ویژگی، سهولت، سرعت و ارزانی این روش می‌توان پیشنهاد نمود آزمون IFA جهت یک آزمون غربالگری (Screening) بسیار مناسب بوده و جهت آزمون تأیید تشخیصی از آزمونهای واجد ویژگی زیادتر مثل ایمنوبلاتینگ یا PCR استفاده گردد. از آنجایی که در بسیاری از موارد بیماری پادگنهای ویروسی در بدن گاو مبتلا به روش ایمنوفلئورسنت یا ایمنوپراکسیداز قابل ردیابی هستند. استفاده توأمان آزمونهای ردیابی پادتن و پادگن نتایج بسیار درخشانی را در جهت تشخیص بیماری برجای گذاشته است. البته در مواردی که طراحی روشها و تشخیص سرمی توسط محققین صورت می‌گیرد بهتر است سعی بر استانداردبودن تمامی شرایط به‌عمل آید. ملاحظاتی که در طراحی کیت مذکور به‌عمل آمد شامل پرهیز از بروز هر گونه پاسخ مثبت کاذب یا منفی کاذب و موارد مشکوک بود که موارد فوق‌الذکر با جذب آنتی‌سرم حاصله با سرم آلبومین گاوی جهت حذف پادتنهای آنتی‌آلبومین گاوی در بدن خرگوش بود که از بروز فلئورسنت زمینه‌ای در موارد منفی جلوگیری می‌کند (۱۹).

از آنجایی که در سرم گاو علاوه‌بر گلبولین‌ها سایر پروتئینهای سرمی مخصوصاً آلبومین نیز وجود دارد و آلبومین موجود در سرم گاو به هنگام آزمایش در مرحله مجاورت سرم با پادگن تمایل زیادی برای اتصال به سطوح شیشه‌ای یا پلاستیکی را دارد بنابراین اتصال آلبومین‌های موجود در سرم به مناطقی از لام اجتناب‌ناپذیر است و در صورتی که آنتی‌سرم تهیه‌شده در بدن خرگوش با آلبومین گاوی قبلاً جذب نشده باشد احتمال وقوع پاسخ مثبت کاذب، به‌علت اتصال پادتنهای ضدآلبومین گاوی ایجادشده در بدن خرگوش با آلبومین‌های متصل‌شده به سرم وجود دارد بنابراین قبل از هر گونه اقدامی جهت خالص‌سازی یا کونژوگاسیون آنتی‌سرم مربوطه اقدام به جذب آنتی‌سرم با سرم آلبومین گاوی گردید در این حالت آنتی‌سرمهای ضدآلبومین با آلبومین کمپلکس تشکیل داده و پس از سانتریفوژ حذف خواهند شد، بنابراین آنتی‌سرم ضدگلبولین با درجه خلوص بسیار زیادتری به‌دست خواهد آمد.

مورد دیگر رسوب و شستشو و خالص‌سازی آنتی‌گلبولین‌های حاصله بود که در این شرایط، احتمال وجود هر گونه ناخالصی و در نهایت بروز موارد واکنش متقاطع به حداقل کاهش می‌یابد البته با دیالیز نهایی جهت حذف FITCهای غیرکنژوگه موجب افزایش درجه خلوص آنتی‌گلبولین و جلوگیری از واکنشهای مثبت کاذب خواهد شد و نکته آخر اولتراسانتریفوژ ویروسهای تکثیریافته در کشت سلولی است که در این شرایط ضمن حذف کلیه بقایای تخریب‌شده سلولی از ذرات ویروسی احتمال بروز واکنشهای ثانویه و متقاطع بین آنتی‌گلبولین کونژوگه با ذرات غیرویروسی به حداقل خواهد رسید (۱۹).

البته در همه مراحل کار رعایت استانداردهای آزمایشگاهی از قبیل حفظ زنجیره سرد، رعایت زمان انکوباسیون و شستشو، استفاده از بافرهای مناسب جهت شستشو و در عین حال اطمینان از عدم وجود فلوروسین ایزوتیوسیاناتهای آزاد در طی مراحل کونژوگاسیون از اهم موارد لازم محسوب می‌شوند و عدم رعایت هر کدام از موارد فوق‌الذکر می‌تواند به بروز اختلالاتی در پاسخهای مشاهده شده در زیر میکروسکوپ منجر شود.

منابع

۱. تاج‌بخش، ح. (۱۳۷۴): ایمنی‌شناسی بنیادی، چاپ ششم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۱۶۴-۱۴۹.

۲. حضرتی، ع. (۱۳۵۵): هرپس‌ویروسهای گاوی و نقش بیماریزایی آنها. نشریه شماره ۲۲ سازمان تحقیقات کشاورزی انستیتو رازی.

۳. همت‌زاده، ف.، ممتاز، ح.، صفری، م. و تاجبخش، ح. (۱۳۷۹): بررسی سرولوژیکی آلودگی به ویروس IBR در گاوداریهای استان چهار محال و بختیاری، زیر چاپ.

4. Ackermann, M., Weber, H. and Welyer, R. (1990): Aspects of IBR eradication Programmes in a fattening cattle farm, Preventive Veterinary Medicine, 9(2), pp: 121-130.

5. Babiuk, L.A., Van Drunen, S. and Tikoo, S.K. (1996): Immunology of Bovine Herpes Virus. Veterinary Microbiology, 53, pp: 31-34.

6. Branowski, E., Keil, G. and Lyaka, J. (1996): Stractural and functional analysis of BHV-1 minor glycoprotein. Veterinary Microbiology 53, 91-101.

7. Belsh Robert, B. (1991): Textbook of Human Virology, (2th-ed) Mosby Company, pp: 822-925.

8. Buonavoglia, C., Cavalli, A. and Ferrara, G. (1996): BHV-1 in sheep: Restriction enzyme analysis of the viral genome; Obiettivi, C., Documenti. Veterinaria, 17(10), pp: 74-83.

9. Castro, A.E. and Huschele, W.D. (1992): Veterinary Diagnostic Virology. Mosby Year Book. pp: 134-136.

10. Durham, P.J.K. and Hassard, L.E. (1990): Serological studies of PI3-IBR-BVD and BRSV viruses in calves following entry to a bull test station, Canadian Veterinary Journal 32, pp: 427-429.

11. Edward, S.E. and Newman, R.H. (1991): The Virulence of British isolation of BHV-1 in relationship to Viral genotype; British Veterinary Journal, pp: 147-216.

www.SID.ir

Archive of SID

12. Eric, B. and Gtinther, K. (1991): Stractural and functional analysis of BHV-1 major Glycoproteins; Veterinary Microbiology 27, pp: 81-101.
13. Espuna, E., Vendrell, J. and Artigas, G. (1988): IBR in dairy Cattle: Serological study. Journal of Veterinary Medicine 5: 10, pp: 499-505.
14. Ferankenak Franken, 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, pp: 90-92.
15. Godfroid, J. and Wellmans, G. (1995): IBR diagnosis based on an invitro BHV-1 antigen-specific IFN-g production; Immunology of Viral infections proceedings 3rd congress of the european society of veterinary virology. 4-7 september, pp: 159-163.
16. Granutova, M. and Psikal, I. (1989): Cell mediated immunity in calves immunized or infected with IBR, Journal of Veterinary Medicine, 34(7), pp: 385-394.
17. Hanna, U., Waron, and Alexander A. (1989): IgM indirect ELISA and involvement of IgM rhumatoid factor in the serodiagnostic of BHV-1 infection, Veterinary Microbiology 26, pp: 35-43.
18. Harlow, E. and Lane, D. (1991): Antibodies A labratory manual, Cold Spring Horbor press, pp: 105-110.
19. Hudson, L. and Hay, F.C. (1989): Practical Immunology, (3th-ed) Blackwell scientific publication pp: 1-12.
20. Karshoek, M.J., Rijsew, J.K. and Vanairschat, J.T. (1996): Persistant of antibodies against BHV-1 and Virus reactivation two to three years after infection. Veterinary Microbiology 53, pp: 103-110.
21. Kent, U.M. (1994): Purification of antibodies using ammonium sulfate fractionation or gel filtration. In: Methods in molecular biology. Immunocytochemical Methods and Protecols, Human press, pp: 13-22.
22. Lucas, M.H., Westcott, D.G. and Edwards, S. (1986): Immunoflurescence and cell culture techniques in the diagnosis of viral infection of abortive fetus. Journal of Veterinary Record 114, pp: 242-243.
23. Martin, S.W. and Mathius, A.M. (1996): Molecular virology of ruminant herpes viruses, Veterinary Microbiology, 53, pp: 17-29.
24. Moniko, E. and Ackermann, M. (1996): Pathogenesis of ruminant herpes virus infection; Veterinary Microbiology 53, pp: 3-15.
25. Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J. Horzinek, M.C. and Studdert, M.J. (1999): Veterinary Virology Third Edition Academic Press, Ink, pp: 301-327.
26. Nettleton, P.F., Herring, J.A. and Herring, A.J. (1983): Evaluation of an immunofluorescent test for the rapid diagnosis of field infections of IBR. Veterinary Record 112, pp: 293-300.
27. Okazaki, K. and Kawakura, H. (1987): Interacellular localization and transport of three different BHV-1 glycoprotein involved in neutralization: Archive of Virology, 92, pp: 17-28.
28. Osorio, F.A., Reed, D.E. and Vandermaten, M.J. (1985): Comparison of the herpes viruses of cattle by DNA restriction endonuclease analysis and serologic analysis: American Journal Veterinary Research 46: 10, pp: 2104-2109.
29. Riedmann, S. and Tadich, N. (1991): Serological survey of PI3-BHV-1 and BVD in sheep. Archives-de-Medicina Veterinaria, 23(2), pp: 165-187.
30. Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. and Barlough, J.E. (1988): Hagen and Bruner's Microbiology and infectious disease of domestic animal, (8th-ed), Comstock cornell, pp: 591-594.
31. Wonnal, L. and Hutching, S. (1990): Lymphocyte prolifrative responses to separated BHV-1 proteins in immune cattle, Journal of Virology 45, pp: 5112-5114.

Development of an immunofluorescent kit for IBR serodiagnosis

Hematzadeh, F.[1]

[1]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.*

IBR is one of the most important contagious viral diseases in cow. The main purpose of this study was to develope an indirect immunoflourescent kit for detecting anti BHV-1 antibodies in bovine serum. Rabbit antibovine immunoglobulin was obtained by immunizing 10 apparent healthy rabbit with bovine globulins. Antibovine globulins were precipitated by using 45% ammonium sulphate and conjugated with FITC. For purification of conjugated sera we passed the sera through cephadex column and dyalized against PBS. We used purified and concentrated IBR virus as antigen. The most proper concentration of antigen for this purpose was 10^5-$10^{5.5}$ TCID50 of IBR virus propagated in R.BK cell line and purified and concentrated by ultra centrifuge at 80000g for 2 hours. To standardize such IFA kit, we examined a 1000 serum samples that were previously tested by SN. In comparison, we found the results by IFA and SN tests as follow: In SN test, out of 1000 tested samples 624 were positive (42.4%) but in IFA 632 were positive (43.2%). A number of 420 samples were positive in both tests. Four samples positive in SN and negative in IFA, 12 samples negative in SN and positive in IFA and 568 samples were negative in both tests. The correlation coefficient of the results obtained by two tests for detecting IBR infection was high about 98.4%. Because of simplicity, rapidity and lack of infectivity of this IFA test, we recommend this kit for detecting IBR antibodies in cow.

Key words : IBR, FITC, SN, Sensitivity, Specificity.

www.SID.ir