Archive of SID

مقایسه‌ی آزمایش‌های خنثی‌سازی ویروس و الیزای تجاری، جهت جستجوی پادتن ضد ویروس BVD در گاومیش

محمدرحیم حاجی‌حاجیکلایی[*۱]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۲] و فاطمه مامی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۸

چکیده

به منظور مقایسه‌ی کیت تجاری الیزا با آزمایش خنثی‌سازی ویروس جهت تعیین پادتن ضد ویروس اسهال ویروسی گاو در گاومیش، تعداد ۲۲۴ رأس گاومیش ارجاعی به کشتارگاه اهواز تحت مطالعه قرار گرفتند. بعد از کشتار و ثبت جنس و سن دام، نمونه‌ی خون به منظور جستجوی پادتن ضد ویروس اسهال ویروسی گاو اخذ گردید. جستجوی پادتن با استفاده از کیت تجاری و طبق دستورالعمل شرکت سازنده‌ی آن (IDEEX) و آزمون خنثی‌سازی ویروس انجام گرفت. در آزمایش الیزا هیچ کدام از دام‌های تحت بررسی دارای پادتن ضد ویروس اسهال ویروسی گاو نبودند. در حالی که در آزمایش خنثی‌سازی ویروس از مجموع ۲۲۴ رأس گاومیش تحت بررسی ۴۸ رأس (۲۱/۴۳ درصد) دارای پادتن ضد ویروس اسهال ویروسی گاو بودند. با استفاده از آزمایش خنثی‌سازی ویروس میزان آلودگی در گاومیش‌های ماده ۲۸/۲ درصد و در گاومیش‌های نر ۱۵/۷ درصد بود که بین آن‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P=۰/۰۲۴). گرچه با توجه به فراوانی ۲۱/۴۳ درصد آلودگی سرمی به نظر می‌رسد که آلودگی گاومیش‌ها به ویروس اسهال ویروسی گاو قابل توجه می‌باشد، ولی کیت تجاری الیزا قادر به شناسایی پادتن ضد این ویروس در گاومیش نبود. توصیه می‌گردد که الیزا رقابتی به منظور جستجوی پادتن ضد ویروس اسهال ویروسی گاو برای گاومیش‌ها طراحی شود.

کلمات کلیدی: الیزا، خنثی‌سازی ویروس، ویروس اسهال ویروسی گاو، گاومیش

مقدمه

ویروس اسهال ویروسی گاو (BVDV)[۱] از جنس پستی‌ویروس[۲] و از خانواده‌ی فلاوی‌ویریده[۳] می‌باشد. BVDV یک ویروس کوچک با RNA تک رشته‌ای و دارای دو ژنوتیپ BVDV-1, BVDV-2 و بیوتیپ‌های سیتوپاتیک[۴] (CBVDV) و غیرسیتوپاتیک[۵] (NCBVDV) است (Rodostits et al 2007، صیفی‌آبادشاپوری ۱۳۸۲، Robert 2001).

در میان پستی‌ویروس‌های نشخوارکنندگان، مخصوصاً ویروس اسهال ویروسی گاو، براساس تأثیری که روی محیط کشت می‌گذارند به دو بیوتیپ سیتوپاتیک (CP) و غیرسیتوپاتیک (NCP) تقسیم می‌شوند. بیوتیپ غیرسیتوپاتیک هم شایع‌تر و هم مهم‌تر از بیوتیپ سیتوپاتیک می‌باشد. فقط بیوتیپ غیرسیتوپاتیک قادر است بعد از عبور از جفت با آلوده کردن جنین باعث عفونت پایدار (PI[۶]) می‌شود که عامل مهمی در انتشار

[*۱] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز (نویسنده‌ی مسئول) E-mail: mhajih@scu.ac.ir

[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

1- Bovine viral diarrhea virus
2- Pestivirus
3- Flaviviridea
4- Cytopathic
5- Non-cytopathic
6- Persistant Infection

www.SID.ir

Archive of SID

ویروس است . در مقایسه با آن، بیوتیپ سیتوپاتیک معمولاً فقط باعث بیماری مخاطی (MD[1]) در گاوهای مبتلا به عفونت پایدار با بیوتیپ غیرسیتوپاتیک می‌شود. هر دو بیوتیپ می‌توانند از دام‌های مبتلا به بیماری مخاطی، جدا شوند و این احتمال وجود دارد که بیوتیپ سیتوپاتیک حاصل موتاسیون بیوتیپ غیرسیتوپاتیک در دام‌های مبتلا به عفونت پایدار باشد (همت‌زاده و همکاران ۱۳۸۰، Rodostits et al. 2007).

BVDV در تمام جهان بومی است. سهولت انتقال، شیوع بالای پادتن، دوره‌های نهفته‌ی نامنظم، فراوانی عفونت‌های مخفی یا تشخیص داده نشده و حضور حیوانات PI موجب می‌شوند که این ویروس دارای اپیدمیولوژی پیچیده‌ای باشد (Taylor and Rodwell 2001). میزان فراوانی آلودگی بالا، اما موارد بالینی بیماری مخاطی پایین است (Rodostits et al. 2007).

BVDV باعث بیماری‌های مختلفی از جمله عفونت خوش‌خیم اسهال ویروسی گاو (معمولاً به شکل تحت بالینی است)، بیماری مخاطی کشنده در دام‌های PI، شکل فوق حاد (باعث اسهال بسیار کشنده می‌شود)، بیماری‌های هموراژیک وترومبوسیتوپنی، اختلالات تولید مثلی و ناهنجاری‌های مادرزادی در گوساله‌ها می‌شود (Rodostits et al. 2007).

بیماری مخاطی اولین بار در سال ۱۹۶۴ تشخیص داده شد. اکنون مشخص شده است که بیماری مخاطی فقط در دام‌های PI در نتیجه‌ی آلودگی مادرزادی با سویه‌ی غیرسیتوپاتیک در مراحل اولیه‌ی زندگی جنین ایجاد می‌شود. این گونه گوساله‌ها دارای تحمل ایمنی در برابر سویه‌های همولوگ BVDV در بعد از تولد می‌شوند و بیماری مخاطی کشنده در اثر آلودگی با بیوتیپ سیتوپاتیک ایجاد می‌شود که معمولاً در سنین ۲۴-۶ ماه بیش‌تر اتفاق می‌افتد (Rodostits et al. 2007).

در اواخر دهه‌ی ۱۹۸۰ و اوایل دهه‌ی ۱۹۹۰ یک شکل فوق حاد از شکل روده‌ای و ترومبوسیتوپنی در دام‌های جوان و مسن که دارای پادتن بر علیه ویروس بودند گزارش شد و اولین بار بود که اعلام شد که بیماری مخاطی در دام‌هایی که قادر به تولید پادتن بر علیه ویروس می‌باشند نیز، رخ می‌دهد (Robert 2001).

انتقال ویروس یا به صورت افقی یا عمودی از دامی به دام دیگر صورت می‌گیرد. مهم‌ترین منبع آلودگی، دام‌های PI می‌باشند. ویروس می‌تواند از ترشحات بینی، بزاق، منی، مدفوع، ادرار، اشک و شیر دفع شده و عمدتاً از طریق تماس مستقیم و نزدیک انتقال می‌یابد. اصلی‌ترین و مهم‌ترین منبع آلودگی در سطح گله، دام‌های PI می‌باشند (Rodostits et al. 2007). انتقال ویروس و ایجاد بیماری را به شرح زیر می‌توان فهرست‌وار خلاصه نمود: ۱- ورود دام با عفونت پایدار به گله ۲- ورود گاو آبستن آلوده به گله ۳- استفاده از اسپرم آلوده ۴- تماس با سایر نشخوارکنندگان آلوده یا دارای عفونت پایدار یا بیمار ۵- جنین سقط شده ۶- ورود گاوهای نر با عفونت پایدار به گله‌ی حساس ۷- استفاده واکسن زنده BVDV در گاو ۸- مصرف انواع واکسن‌های زنده و ویروسی با منشاء کشت سلولی آلوده به BVDV در گاو ۹- از طریق هوا ۱۰- وسایل آلوده (دستکش توشه‌رکتال، سوزن زیرجلدی . . .) ۱۱- از طریق حشرات (Lang-Ree et al. 1994, Rodostits et al. 2007, Taylor and Rodwell 2001, Valle et al. 1999).

از روش‌های مختلف سرولوژی برای تشخیص آلودگی سرمی به ویروس اسهال ویروسی گاو استفاده می‌شود که عبارتند از خنثی‌سازی ویروس، ثبوت کمپلمان، وسترن بلات، روش ایمنوفلورسانس، روش ایمونوپراکسیداز، AGID و الیزا. از بین روش‌های فوق تنها دو روش خنثی‌سازی ویروس و الیزا به طور روتین در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش خنثی‌سازی ویروس به عنوان آزمایش مرجع برای استانداردسازی سایر روش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. گرچه حساسیت و ویژگی

1- Mucosal Disease

www.SID.ir

Archive of SID

این روش بالا است ولی به دلیل نیاز به تجربه بسیار زیاد، امکانات کشت سلول و زمان‌بر بودن آن، کم‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرد. امروزه بیش‌تر از روش الیزا استفاده می‌شود. این روش وابسته به کشت سلول نمی‌باشد و زمان کوتاه برای رسیدن به نتیجه نیاز دارد. انواع مختلف کیت‌های تجاری الیزا موجود می‌باشند که برای جستجوی پادتن ضد این ویروس در سرم و شیر گاو استفاده می‌شوند (Bhatia et al. 2008, Howard et al. 1985, Sandvik 1999, Sandvik 2005). از آن جایی که این کیت‌ها برای جستجوی پادتن ضد ویروس اسهال ویروسی گاو در سرم و شیر گاوها طراحی شده‌اند، لذا هدف از انجام این مطالعه ارزیابی کیت تجاری شرکت IDEEX برای جستجوی پادتن ضد این ویروس در سرم گاومیش و مقایسه‌ی آن با آزمایش خنثی‌سازی ویروس بود.

مواد و روش کار

این مطالعه در طی ماه‌های آذر ۱۳۸۸ تا اردیبهشت ۱۳۸۹ با مراجعه به کشتارگاه اهواز بر روی ۲۲۴رأس گاو میش (۱۰۳ رأس ماده و ۱۲۱ رأس نر) انجام گرفت. بلافاصله بعد از ذبح و ثبت مشخصات مربوط به سن (با استفاده از فرمول دندانی) و جنس هر رأس دام، ۱۰ سی‌سی خون اخذ گردید. نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال و سرم‌های تهیه شده تا زمان انجام آزمایش جهت جستجوی پادتن ضد BVDV با استفاده از کیت تجاری الیزا و آزمایش خنثی-سازی ویروس در ۱۸- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

در این مطالعه جهت تکثیر ویروس BVD و انجام آزمایش سرولوژیک خنثی‌سازی ویروس، از سلول‌های BT و سویه‌ی NADL، یکی از سویه‌های استاندارد ویروس BVD، استفاده شد. در ابتدا ویروس BVD در سلول‌های BT کشت یافته در محیط کشت DMEM حاوی ۵ درصد سرم اسب تکثیر داده شد و با روش اسپیرمن و کاربر[1] و بر مبنای میزان عفونی‌زایی ۵۰ درصد در کشت سلولی ($TCID_{50}$) تعیین عیار گردید. جهت انجام آزمایش خنثی‌سازی ویروس، در ابتدا، از هر یک از سرم‌های مورد آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر رقت ۱/۵ در محیط کشت حاوی ۵ درصد سرم اسب در یک میکروتیوب تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر ویروس تعیین عیار شده و رقیق گشته که حاوی ۴۰۰، $TCID_{50}$ بود به آن افزوده شد. پس از مخلوط کردن هر یک از سرم‌های رقیق شده با میزان مناسب ویروس، میکروتیوب‌های حاوی این مخلوط‌ها به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای هر سرم ۲ گوده در پلیت کشت سلولی در نظر گرفته شد و به هر یک از آن‌ها ۵۰ میکرولیتر از مخلوط مربوطه انتقال داده شد. ۵۰ میکرولیتر از هر مخلوط در واقع حاوی ۱۰۰، $TCID_{50}$ ویروس و رقت نهایی ۱:۱۰ از نمونه‌ی سرمی بود. پس از این مرحله در داخل تمام گوده‌های میکروپلیت ۹۶ خانه کشت سلولی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی (حاوی 10^4 سلول) اضافه گشت. در این آزمایش به عنوان کنترل، در چند خانه تنها محیط کشت و سلول به عنوان کنترل سلول و در چند خانه تنها ویروس و سلول به عنوان کنترل ویروس اضافه شد. پس از افزودن سوسپانسیون سلولی در تمام خانه‌ها، میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در حضور ۲ درصد گاز CO_2 قرار داده شد. میکروپلیت هر روز تحت مشاهده میکروسکوپی قرار می‌گرفت و در پایان روز پنجم براساس وجود یا عدم وجود CPE، وجود یا عدم وجود پادتن خنثی کننده‌ی ضد BVDV در سرم‌های مورد آزمایش تعیین گردید.

از کیت الیزا تجاری شرکت IDEEX جهت تعیین حضور پادتن ضد BVDV استفاده شده است. روش انجام آزمایش طبق دستور العمل شرکت سازنده‌ی کیت بود. در پایان، برای تعیین میزان عیار پادتن، میزان جذب نوری یا محلول‌های رنگی به دست آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مخصوص الیزا که اصطلاحاً

1- Spearman and kairber

www.SID.ir

Archive of SID

(ELISA reader) نامیده می‌شود، در طول موج ۴۵۰ نانومتری قرائت گردید.

نتایج با استفاده از آزمون مربع کای و آزمون دقیق فیشر و نرم افزار SPSS با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج

جستجوی پادتن ضد BVDV به روش الیزا

با استفاده از کیت تجاری الیزا، پادتن ضد BVDV در هیچ کدام از گاومیش‌های تحت مطالعه قابل ردیابی نبود.

جستجوی پادتن ضد BVDV به روش خنثی‌سازی ویروس (VN)

نتایج حاصل از آزمون خنثی‌سازی ویروس (VN) جهت مشخص نمودن آلودگی سرمی به ویروس BVD در گاومیش‌های تحت مطالعه در جدول ۱ آمده است. بدون در نظر گرفتن سن و جنس از مجموع ۲۲۴ رأس گاومیش تحت بررسی ۴۸ رأس (۲۱/۴۳ درصد) دارای آنتی‌بادی ضد ویروس BVD بود.

جدول ۱: مقایسه‌ی میزان آلودگی سرمی به ویروس BVD در آزمون خنثی‌سازی ویروس (VN)

جنس – سن / نتیجه		منفی	مثبت	جمع کل
نر	تمام شیری	۸۷ (۸۲/۹)	۱۸ (۱۷/۱)	۱۰۵
	یک جفت دندان دائمی	۱۵ (۹۶/۷)	۱ (۶/۳)	۱۶
ماده	تمام شیری	۵۹ (۸۱/۸)	۱۴ (۱۸/۲)	۷۳
	یک جفت دندان دائمی	۱۵ (۵۰)	۱۵ (۵۰)	۳۰
جمع کل		۱۷۶ (۷۸/۶)	۴۸ (۲۱/۴)	۲۲۴

اعداد داخل پرانتز بیان‌گر درصد می‌باشند.

میزان آلودگی در گاومیش‌های ماده ۲۸/۲ درصد و در گاومیش‌های نر ۱۵/۷ درصد بوده و بین دو جنس نر و ماده اختلاف آماری معنی‌دار (P=۰/۰۲۴) وجود داشت. در بین گاومیش‌های ماده، میزان آلودگی در آن‌هایی که تمام دندان‌های آن‌ها شیری بود ۱۸/۲ درصد و در آن‌هایی که دارای یک جفت دندان دائمی بودند ۵۰ درصد بود و بین این دو گروه سنی در گاومیش‌های ماده اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت (P=۰/۰۰۲). در بین گاومیش‌های نر میزان آلودگی در آن‌هایی که تمام دندان‌های آن‌ها شیری بود ۱۷/۱ درصد و در آن‌هایی که دارای یک جفت دندان دائمی بودند ۶/۳ درصد بود و بین این دو گروه سنی در گاومیش‌های نر اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت (P=۰/۲۳۸).

گرچه از نظر فراوانی آلودگی بین گاومیش‌های ماده و نر که تمام دندان‌های آن‌ها شیری بود اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P=۰/۷۲۸). اما این اختلاف بین گاومیش‌های نر و گاومیش‌های ماده که دارای یک جفت دندان دائم بودند بسیار معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۳).

بحث

در این مطالعه جهت جست و جوی پادتن ضد BVDV از آزمون خنثی‌سازی ویروس (VN) و کیت تجاری الیزا استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمون‌ها نشان داد که کیت تجاری الیزا قادر به نشان دادن حضور پادتن ضد این ویروس در گاومیش‌های تحت مطالعه نمی‌باشد. در حالی که با استفاده از آزمون خنثی‌سازی

www.SID.ir

Archive of SID

ویروس (VN) و بدون در نظر گرفتن سن و جنس از مجموع ۲۲۴ رأس گاومیش تحت بررسی ۴۸ رأس (۲۱/۴۳ درصد) دارای پادتن ضد ویروس BVD بودند. جهت جستجوی پادتن ضد BVDV در گاو از آزمون خنثی‌سازی ویروس و الیزا استفاده می‌شود و حساسیت و ویژگی این دو روش با هم‌دیگر مقایسه شده‌اند. گرچه در آزمایش الیزا بر حسب نوع کیت و شرکت سازنده ممکن است نتایج متفاوت باشد به طوری که در مطالعه‌ی Ghazi و همکاران در سال ۲۰۰۸، نشان داده شده است که آزمون خنثی‌سازی ویروس نسبت به الیزا از حساسیت بالاتری جهت مشخص نمودن پادتن ضد BVDV در گاومیش برخوردار است. در حالی که در گاو حساسیت الیزا بیش‌تر از خنثی‌سازی ویروس است. فراوانی آلودگی سرمی به BVDV به ترتیب با آزمون‌های خنثی‌سازی سرم و الیزا در گاو ۵۸ و ۶۵ درصد و در گاومیش ۲۵ و ۱۲/۵ درصد بوده است. بررسی صورت گرفته بر روی گاومیش‌های ارجاعی به کشتارگاه بغداد با استفاده از کیت تجاری شرکت Bio-X بلژیک مشخص نموده است که ۳۹/۵ درصد از گاومیش‌های تحت مطالعه دارای پادتن ضد اسهال ویروسی گاو بوده‌اند (Khawlah et al. 2012). همچنین با استفاده از کیت تجاری الیزای رقابتی در گاومیش‌های ۹ استان هند، ۲۳/۲۱ درصد دارای پادتن ضد اسهال ویروسی گاو بوده‌اند (Sudharshana et al. 1999). مطالعه‌ی صورت گرفته در مصر با استفاده از آزمایش خنثی‌سازی ویروس نشان داد که میزان آلودگی در گاو، گاومیش، گوسفند، بز و شتر به ترتیب ۴۹/۲ درصد، ۵۲ درصد، ۳۱/۴ درصد و ۵۲/۵ درصد می‌باشد (Zaghawa 1998). فراوانی آلودگی در گاومیش‌های برزیل ۵۲/۷ درصد و در ترکیه ۵۶/۸ در صد گزارش شده است (Gur and Akca 2008, Lage et al. 1996). علت اختلاف در نتایج حاصل از این مطالعه و سایر مطالعاتی که از کیت‌های تجاری الیزا استفاده نمودند و موفق به جستجوی پادتن ضد اسهال ویروسی گاو در سرم گاومیش شده‌اند را می‌توان به تفاوت بین این کیت‌های تجاری به خصوص نوع کونژوگه مورد استفاده در آن‌ها، نسبت داد. ضمن این که در برگه‌ی دستورالعمل کیت به نوع کونژوگه اشاره نشده بود تا بتوان قاطعانه در این خصوص اظهار نظر نمود. از طرف دیگر، مثبت شدن کنترل مثبت و منفی شدن کنترل منفی دلالت بر صحت روش انجام کار می‌باشد.

در بررسی‌های محدودی که طی سال‌های گذشته در رابطه با این بیماری در ایران صورت گرفته است نیز به حضور آن با استفاده از آزمایشات سرولوژیک اشاره شده است. هر چند که گزارشات موجود در خصوص وضعیت این بیماری در گاومیش در مقایسه با گاو بسیار محدود می‌باشد. در بررسی Haji Hajikolaei و همکاران در سال ۲۰۱۰ میزان آلودگی به BVDV با استفاده از آزمون خنثی‌سازی ویروس در ۳۳/۹ درصد گاومیش‌های ارجاعی به کشتارگاه اهواز گزارش گردید (Haji Hajikolaei et al. 2010). با توجه به محل مطالعه (کشتارگاه اهواز) و نوع آزمایش (آزمون خنثی‌سازی ویروس) علت احتمالی اختلاف در میزان فراوانی بین این دو مطالعه را می‌توان به اختلاف در سن گاومیش‌های تحت بررسی نسبت داد. به طوری که در مطالعه‌ی حاضر از ۱۰۳ رأس گاومیش ۷۳ رأس دارای تمام دندان شیری و ۳۰ رأس دارای حداقل یک جفت دندان دائم که به ترتیب ۱۸/۲ درصد و ۵۰ درصد مثبت بودند ولی در مطالعه‌ی Haji Hajikolaei و همکاران در سال ۲۰۱۰ از ۱۵۷ رأس گاومیش تحت بررسی ۱۰۱ رأس دارای حداقل یک جفت دندان دائم و ۵۶ رأس تمام دندان شیری بودند که به ترتیب ۴۶/۵ درصد و ۲۶/۸ درصد مثبت بودند (Haji Hajikolaei et al. 2010). علت دیگر احتمالی اختلاف در میزان فراوانی بین این دو مطالعه را علاوه بر سن دام‌های تحت بررسی، می‌توان به فاصله‌ی زمانی بین این دو مطالعه که ۴ سال می‌باشد نیز نسبت داد. زیرا میزان آلودگی در بین سال‌های مختلف ممکن است متفاوت باشد. بررسی حاجی‌حاجیکلایی و صیفی‌آبادشاپوری در سال ۱۳۸۶ میزان آلودگی به این ویروس در گاوهای اهواز

www.SID.ir

Archive of SID

۲۸/۵ درصد گزارش شد. همچنین در مطالعه‌ی کریمی در سال ۱۳۸۴ میزان آلودگی به این ویروس در گوسفند و بز در اهواز به ترتیب ۴۶/۶ درصد و ۳۳/۳ درصد گزارش شد.

در این بررسی رابطه‌ی بین سن و آلودگی مورد بررسی قرار گرفته است. مشاهده گردید که در بین جمعیت گاومیش‌های ماده آلودگی در آن‌هایی که تمام دندان‌های آن‌ها شیری بود ۱۸/۲ درصد و در آن‌هایی که دارای یک جفت دندان دائمی بودند ۵۰ درصد بود و بین این دو گروه سنی در گاومیش‌های ماده اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت (P=۰/۰۰۲). در بین گاومیش‌های نر میزان آلودگی در آن‌هایی که تمام دندان‌های آن‌ها شیری بود ۱۷/۱ درصد و در آن‌هایی که دارای یک جفت دندان دائمی بودند ۶/۳ درصد بود و بین این دو گروه سنی در گاومیش‌های نر اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت (P=۰/۲۳۸). مطالعه‌ی پیش رو نشان داده شده است که در گاومیش‌های ماده با افزایش سن بر میزان آلودگی افزوده می‌شود و رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری بین سن و میزان آلودگی وجود دارد ولی در گاومیش‌های نر رابطه‌ای بین سن و آلودگی وجود ندارد. در بررسی Haji Hajikolaei و همکاران در سال ۲۰۱۰ آلودگی در گاومیش‌های دارای دندان‌های تمام شیری ۲۶/۷۹ درصد و در گاومیش‌های دارای حداقل یک جفت دندان دائم ۴۶/۵۳ درصد بوده است و اختلاف آماری معنی‌داری بین سن و آلودگی وجود داشت. در بررسی حاجی-حاجیکلایی و صیفی‌آبادشاپوری در سال ۱۳۸۶ نیز رابطه-ی بین سن و آلودگی مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده گردید که در بین جمعیت گاوهای ماده آلودگی در تلیسه‌ها ۱۰/۱۶ درصد و در گاوهای مسن‌تری که سابقه‌ی حداقل یک بار زایش را دارند ۲۵/۵۷ درصد بود. در تجزیه و تحلیل آماری اختلاف معنی‌داری بین سن و میزان آلودگی مشاهده شد. همچنین در مطالعه‌ی کریمی در سال ۱۳۸۴ نشان داده شد که در گوسفندان، با افزایش سن بر فراوانی آلودگی افزوده شده و اختلاف بین گروه-های سنی معنی‌دار بود ولی در بزها هر چند که با افزایش سن بر فراوانی آلودگی افزوده شد ولی اختلاف بین گروه-های سنی معنی‌دار نبود. با افزایش سن، احتمال تماس با ویروس و ایجاد پادتن ضد آن افزایش می‌یابد. شاید یکی از دلایل عدم ارتباط بین سن و آلودگی را در گاومیش-های نر، به تعداد کم آن‌ها در این مطالعه می‌توان نسبت داد. اختلاف بین سنین مختلف را می‌توان به رابطه‌ی مستقیم افزایش احتمال تماس با ویروس با افزایش سن نسبت داد به طوری که در مطالعه‌ی همت‌زاده و همکاران در سال ۱۳۸۰، هو و میلینگ در سال ۱۹۹۱ و فراری و همکاران در سال ۱۹۹۹ نیز نشان داده شده است که با افزایش سن بر میزان آلودگی افزوده می‌شود و رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری بین سن و آلودگی وجود دارد.

هر دو جنس نر و ماده به BVDV آلوده می‌شوند. میزان آلودگی در گاومیش‌های ماده ۲۸/۲ درصد و در گاومیش‌های نر ۱۵/۷ درصد بوده و بین دو جنس نر و ماده اختلاف آماری معنی‌داری (P=۰/۰۲۴) مشاهده شد. گرچه از نظر فراوانی آلودگی بین گاومیش‌های ماده و نر و تلیسه‌ها که تمام دندان‌های آن‌ها شیری بود اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P=۰/۷۲۸)، اما این اختلاف بین گاومیش‌های نر و گاومیش‌های ماده که دارای یک جفت دندان دائم بودند بسیار معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۳). گزارش-ها در مورد تأثیر سن بر آلودگی متفاوت می‌باشد به طوری که در بررسی Haji Hajikolaei و همکاران در سال ۲۰۱۰، میزان آلودگی در گاومیش‌های ماده ۳۹/۵ درصد و در گاومیش‌های نر ۲۲/۷۸ درصد بود که اختلاف آماری معنی‌داری بین دو جنس نر و ماده مشاهده شد. از نظر فراوانی آلودگی بین گاومیش‌های نر و تلیسه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما این اختلاف بین گاومیش‌های نر و گاومیش‌های دارای حداقل یک بار زایش بسیار معنی‌دار بود که با توجه به معنی‌دار بودن بین تلیسه‌ها و گاومیش‌های با دارای حداقل یک بار زایش اختلاف بین گاوهای نر و ماده را به تفاوت بین سن آن‌ها نسبت داده شد. در بررسی حاجی‌حاجیکلایی و صیفی-

www.SID.ir

Archive of SID

آبادشاپوری در سال ۱۳۸۶ روی گاو، میزان آلودگی در جنس ماده ۲۹/۵۵ درصد و در جنس نر ۱۷/۶۴ درصد گزارش گردید و در تجزیه و تحلیل آماری اختلاف معنی-داری بین دو جنس نر و ماده وجود نداشت. در مطالعه‌ی همت‌زاده و همکاران در سال ۱۳۸۰ اختلاف معنی‌داری بین دو جنس نر و ماده مشاهده شده است و اختلاف بین گاوهای نر و ماده را به تفاوت بین سن آن‌ها نسبت دادند.

در یک نتیجه‌گیری کلی میتوان گفت بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، کیت تجاری الیزا شرکت IDEEX که بر پایه‌ی مشخص نمودن حضور پادتن ضد ویروس اسهال ویروسی گاو در سرم و شیر گاو طراحی شده است قادر نمی‌باشد تا وجود پادتن ضد این ویروس را در سرم گاومیش ردیابی نماید. لذا توصیه می‌شود جهت تعیین وجود پادتن ضد ویروس اسهال ویروسی گاو در سرم گاومیش یا از روش خنثی‌سازی ویروس استفاده گردد یا الیزای رقابتی بدین منظور طراحی و ارزیابی گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حوزه‌ی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر حمایت مالی این فعالیت پژوهشی در قالب پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکتری عمومی دامپزشکی تقدیر و تشکر نمایند.

منابع

حاجی‌حاجیکلایی، محمدرحیم و صیفی‌آبادشاپوری، مسعودرضا (۱۳۸۶). بررسی سرولوژیکی آلودگی به - اسهال ویروسی گاو در گاوهای اهواز. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۲، شماره ۱، ۲۶-۲۱.

صیفی‌آبادشاپوری، مسعودرضا (۱۳۸۲). تشخیص بیماری-های ویروسی در دامپزشکی. تالیف آنتونی ای کاسترو و ورنر پی هوشل. چاپ اول، اداره انتشارات و چاپ دانشگاه شهید چمران اهواز. صفحات ۲۴۸-۲۳۷.

کریمی، امینه (۱۳۸۴). بررسی سرولوژیکی آلودگی به اسهال ویروسی گاوان در گوسفند و بز در اهواز. پایان نامه دکتری عمومی دامپزشکی. شماره ۸۴۵۸۵۵۷

همت‌زاده، فرید؛ کجوری، غلامعلی؛ کارگرموخر، روحانی و روحانی، مسعود (۱۳۸۰). بررسی سرمی بیماری اسهال ویروسی گاوان در استان چهارمهال بختیاری، مجله دانشکده دامپزشکی تهران. دوره ۵۶، شماره ۳ صفحه ۹۲-۸۵.

Bhatia, S.; Sood, R.; Mishra, N.; Pattnaik, B. and Pradhan, H.K. (2008). Development and evaluation of a MAB based competitive- ELISA using helicase domain of NS3 protein for sero-diagnosis of bovine viral diarrhea in cattle and buffalo. Research in Veterinary Sciences. 85, 39-45.

Ferrari, G.; Scicluna, M.T.; Bonvicini, D.; Gobbi, C.; Della Verita, F.; Valentini, A. and Autorino, G.L. (1999). Bovine virus diarrhoea (BVD) control programme in an area in the Rome province (Italy). Veterinary Microbiology, 64(2-3): 237-245.

Ghazi, Y.A.; EL-sherif, A.M.; Azzam, R.A. and Hussein, H.A. (2008). Diagnostic studies on bovine viral diarrhoea infection in cattle and buffaloes with emphasis on gene markers. Global Veterinaria, 2(3): 92-98.

Gur, S. and Akca, Y. (2008). IBR/IPV and Rinderpest¼seroepidemiology at BVD seropositive buffaloes. Ankara UniversitesiveterinerFakultesiDergisi. 55(1): 45-50.

Haji Hajikolaei, M.R.; Seyfiabad Shapouri, M. and Lotfi, M. (2010). Serological study of bovine viral diarrhea virus infection in buffalo slaughtered buffaloes in Ahvaz abbatior. International Journal of Veterinary Research. 4(1): 19-22.

www.SID.ir

Archive of SID

Houe, H. and Meyling, A. (1991). Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. Preventive Veterinary Medicine. 11: 9-16.

Howard, C.J.; Clarke, M.C. and Brownlie, J. (1985). An enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle sera. Veterinary Microbiology, 10, 359-369.

Khawlah, M.; Imran Al-Rubaye and Saleem, A. Hasso. (2012). Detection of bovine viral diarrhea –mucosal disease (BVDMD) in buffaloes and cows using ELISA. Iraqi Journal Veterinary Medicine. 36 (1), 45-50.

Lage, A.P.; Castro, R.S.; Melo, M.I.; Aguiar, P.H.; Barreto Filho, J.B. and Leite, R.C. (1996). Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. Revue delevageet de medicine veterinaire des pays tropcaux, 49(3): 195-197.

Lang-Ree, J.R.; Vatn, T.; Kommisrud, E. and Loken, T. (1994). Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. Veterinary Record,135(17): 412-413.

Robert, F.K. (2001). Viral disease of cattle. Second edition. Iowa State, University Press, USA. Pp: 113-126, 159-170.

Rodostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C. and Hinchcliff, K.W. (2007). Veterinary Medicine,tenth edition, W.B. Saunders, London. Pp: 1248-1274.

Sandvik, T. (1999). Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. Veterinary Microbiology 64, 123-134.

Sandvik, T. (2005). Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. Preventive Veterinary Medicine 72, 3-16.

Sudharshana, K.J.; Suresh, K.B. and Rajasekhar, M. (1999). Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in India. Revue Scientifique et Technique (Internstional office of Epizooties). 18 (3), 667-671.

Taylor, L. and Rodwell, B. (2001). Outbreak of fetal infection with bovine pestivirus in a central Queensland beef herd. Australian Veterinary Journal, 79(10): 682-685.

Valle, P.S.; Martin, S.W.; Tremblay, R. and Bateman, K. (1999). Factors associated with being a bovine virus diarrhoea (BVD) seropositive dairy herd in the More and Romsdal country of Norway. Preventive Veterinary Medicine, 40(3-4): 165-177.

Zaghawa, A. (1998). Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminats. Journal of Veterinary Medicine, B, 45(6): 345-351.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 12, No. 3, Autumn, 2016

Comparison between commercial ELISA kit and virus neutralization test for detection of antibodies against bovine viral diarrhea virus (BVDV) in buffalo

Haji Hajikolaei, M.R.[1]; Seyfiabad Shapouri, M.R.[2] and Mami, F.[3]

Received: 17.06.2015 Accepted: 29.11.2015

Abstract

This study was carried on 224 slaughtered buffaloes at Ahvaz abattoir to compare a commercial ELISA kit (IDDEX) and virus neutralization (VN) test for detection of antibodies against bovine viral diarrhea virus (BVDV) in buffalo. Blood samples were taken after slaughter and sex and age parameters were documented. Sera were tested by ELISA and virus neutralization (VN) test for detection of antibodies. The result of ELISA showed none of these buffaloes had antibodies to BVDV, but 48 (21.43%) of buffaloes had antibodies to BVDV by VN test. The prevalence of infection in females and males were 28.2% and 15.7%, respectively and statistical analysis showed that there was significant difference between them (P=0.024). Although the seroprevalence of BVDV in these buffaloes is noticeable, but the commercial ELISA kit is not suitable for detection of antibodies to BVDV in this animal. It is recommended to develop a competitive ELISA for detection of antibodies against bovine viral diarrhea virus (BVDV) in buffalo.

Key words: ELISA, Virus neutralization (VN), BVDV, Buffalo

1- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Haji Hajikolaei, M.R., E-mail: mhajih@scu.ac.ir

www.SID.ir