

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

ندا ارجمندی^۱، محمد رحیم حاجی حاجیکلائی^{۲*}، مسعود رضا صیفی آبادشاپوری^۳، مریم داغری^۳

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: ۱۳/۶/۹۴ پذیرش نهایی: ۳۰/۹/۹۴)

چکیده

به منظور مقایسه کیت تجاری الیزا با آزمایش خنثی‌سازی سرم در تشخیص آلودگی به هرپس ویروس تیپ-۱ در گاومیش‌های کشتار شده 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 ۵۴ 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

هرپس ویروس‌ها است. این ویروس در انواعی از کشت‌های سلولی تکثیر می‌یابد و تغییرات سلولی مشخصی را ایجاد می‌کند که تشخیص و مطالعه

هرپس ویروس تیپ-۱ گاو (BHV-1) که ویروس IBR/IPV نیز نامیده می‌شود، یک DNA ویروس در جنس واریسلا ویروس از خانواده

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 گاو میش‌های 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 گاو میش‌ها از روش خنثی‌سازی سرم (VN) استفاده شده است (حاجی حاجیکلایی و صیفی آبادشاپوری، ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶). 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 ۱۳۹۴ 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 گاو میش نمی‌باشد (مامی و همکاران، ۱۳۹۴). بنابراین، هدف از انجام این مطالعه مقایسه این دو روش (انجام آزمایش الیزا و خنثی‌سازی سرم) در تعیین آلودگی به BHV-1 در گاو میش 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 گاو میش (۱۰۰ رأس نر و ۵۰

بیماری‌زایی، 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 به صورت 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 هرپس ویروس گاو میش را با استفاده از روش محدودسازی DNA ویروس از BoHV-1 متمایز کنند و این نکته بر این دلالت دارد که ویروس گاو میش (BuHV-1) با ویروس گاوی (BoHV-1) تفاوت دارد، در صورتی که از نظر ژنتیکی و آنتی‌ژنی به هم مرتبط هستند. گاو میش‌ها مستعد ابتلا به BoHV-1 و BuHV-1 می‌باشند. نشان داده شده که واکسیناسیون علیه BoHV-1 سبب تحریک

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 ۴۵۰ 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.

$$\%S/P = \frac{OD_{sample} - OD_{nc}}{OD_{pc} - OD_{nc}} \times 100$$

نمونه‌هایی که S/P آنها کمتر از ۵۰٪ بود منفی تلقی شدند. نمونه‌هایی که S/P آنها بیشتر یا مساوی ۵۰٪ و کمتر از ۶۰٪ بود مشکوک تلقی شدند. نمونه‌هایی که S/P آنها بیشتر یا مساوی ۶۰٪ 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

رأس ماده) بعد از ذبح خون‌گیری به عمل آمد. در این بررسی سن دام بر اساس فرمول دندان‌تعیین گردید (FAO, 1977). با توجه به فرمول دندان‌تعیین فک پایین، گاو‌میش‌ها در ۵ گروه، زیر ۲/۵ سال (تمام دندان‌ها شیری)، ۲/۵-۳/۵ سال (یک جفت دندان دائم)، ۳/۵-۴/۵ سال (دو جفت دندان دائم) و ۴/۵-۵/۵ سال (سه جفت دندان دائم) و بالای ۵/۵ سال (تمام دندان‌ها دائم) تقسیم شدند.

جداسازی سرم

سرم‌ها بعد از جمع‌آوری شده به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری (شماره‌گذاری شده) انتقال و تا زمان انجام آزمایش الیزا و خنثی‌سازی سرم در فریزر ۲۰- 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 BHV-1، کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی تشکیل می‌گردد. 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 به کمک شستشوی میکروپلیت، محلول سوبسترا-کروموژن (TMB-H₂O₂) اضافه شد. نتیجه رنگ‌پذیری (ظهور رنگ آبی) بستگی به مقدار آنتی‌بادی اختصاصی موجود در نمونه

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 طور کلی در روش الیزا و خنثی‌سازی ویروس به ترتیب ۵۴ و ۵۸٪ 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 به ترتیب ۹۰/۹ درصد و ۹۸/۴ درصد بیان شده است.

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 TCID₅₀ ۱۵۰ در هر حفره افزوده شد و پلیت به مدت ۱۸-۲۴ 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 به مدت ۵ روز در انکوباتور حاوی ۲ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. در طی این مدت پلیت-ها 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،

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

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

خنثی‌سازی ویروس ارائه گردیده است. این جدول نشان می‌دهد که به‌ترتیب کمترین و بیشترین موارد

در جدول ۲ توزیع فراوانی آلودگی به هرپس ویروس تیپ ۱ در گاومیش به تفکیک سن و با روش

مثبت مربوط به دامنه سنی زیر ۲/۵ سال و بیشتر از ۵ سال است. رده سنی زیر ۲/۵ سال با رده سنی ۲/۵-۳/۵ سال و بالای ۵ سال اختلاف معنی‌دار داشت

جدول ۲- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به هرپس ویروس تیپ ۱ در گاومیش‌های تحت بررسی به تفکیک سن (سال) با آزمایش خنثی‌سازی ویروس

سن	آلودگی		مثبت		جمع کل	
	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

^oحروف کوچک متفاوت در ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد ($p < 0.05$).

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

جدول ۳- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به هرپس ویروس تیپ ۱ در گاومیش‌های تحت بررسی به تفکیک سن (سال) با آزمایش الیزا

سن	آلودگی		مثبت		جمع کل	
	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

^oحروف کوچک متفاوت در ستون نشان‌دهنده تفاوت معنادار می‌باشد ($p < 0.05$).

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 فراوانی نسبی موارد مثبت در جنس نر و ماده در آزمایش خنثی‌سازی به ترتیب ۶۲ و ۵۲ درصد و در

آزمایش الیزا نیز به ترتیب ۵۸ و ۴۶ درصد است که هر دو روش وجود ندارد. اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه سنی با استفاده از

جدول ۴- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به هرپس ویروس تیپ ۱ در گاو میش‌های تحت بررسی به تفکیک جنس در آزمایش خنثی‌سازی ویروس

جنس	آلودگی		مثبت		جمع کل	
	مطلق	نسبی	مطلق	نسبی	مطلق	نسبی
نر	۳۸	۳۸	۶۲	۶۲	۱۰۰	۶۶/۷
ماده	۲۴	۴۸	۲۶	۵۲	۵۰	۳۳/۳
جمع کل	۶۲	۴۱/۳	۸۸	۵۸/۷	۱۵۰	۱۰۰

جدول ۵- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به هرپس ویروس تیپ ۱ در گاو میش‌های تحت بررسی به تفکیک جنس در آزمایش الیزا

جنس	آلودگی		مثبت		جمع کل	
	مطلق	نسبی	مطلق	نسبی	مطلق	نسبی
نر	۴۲	۴۲	۵۸	۵۸	۱۰۰	۶۶/۷
ماده	۲۷	۵۴	۲۳	۴۶	۵۰	۳۳/۳
جمع کل	۶۹	۴۶	۸۱	۵۴	۱۵۰	۱۰۰

بحث و نتیجه‌گیری

خنثی‌سازی ویروس، به‌طور کمی اثرات مهاری پادتن‌های اختصاصی را روی تکثیر ویروس در کشت سلول تعیین می‌کند و کاربرد آن محدود به آزمایش‌های ویروس‌شناسی است. محققین مختلف حساسیت آزمایش خنثی‌سازی ویروس در تشخیص سرمی BHV-1 را بین ۹۸-۹۴ درصد و ویژگی این آزمایش را حدود ۹۶ درصد برآورد نموده‌اند (Lucas *et al.*, 1986)، که این ارقام جهت یک آزمایش سرمی ارقام مطلوبی به حساب می‌آیند، اما از آنجایی که جهت انجام آزمایش خنثی‌سازی ویروس نیاز به سوش زنده ویروس می‌باشد و از طرفی فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی خاص مورد نیاز است، امکان انجام این آزمایش در کمتر جایی از ایران مقدور است. لذا، انجام

از روش‌های مختلفی مانند آزمایش خنثی‌سازی ویروس، الیزا و ایمونوفلورسنت جهت مشخص نمودن حضور پادتن ضد ویروس BHV-1 در سرم خون گاو و گاو میش استفاده می‌شود. آزمایش خنثی‌سازی ویروس یک آزمایش استاندارد است و سایر روش‌ها با این آزمایش سنجیده می‌شوند. آزمایش خنثی‌سازی ویروس از حساسیت و ویژگی بسیار بالایی برخوردار می‌باشد. اگرچه روشی سخت بوده و نیازمند لوازم آزمایشگاهی خوب و افراد باتجربه می‌باشد و به‌طور معمول ۵ الی ۶ روز طول می‌کشد تا به‌طور کامل انجام گیرد، اما بیشترین کاربرد آن به‌عنوان یک آزمایش طلایی برای سنجش و ارزیابی سایر روش‌ها می‌باشد. آزمایش

لذا از آزمایش الیزا می‌توان جهت مشخص نمودن حضور پادتن ضد ویروس BHV-1 در سرم خون گاو میش 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 گاو میش‌های مستقر در مرکز تهیه اسپرم ارومیه ۴/۱ درصد به‌دست آمد (کارگر و همکاران، ۱۳۸۱). در مطالعه حاجی حاجیکلائی و صیفی آباد شاپوری در سال ۱۳۸۶ که روی ۳۲۶ رأس گاو میش ارجاعی به کشتارگاه اهواز انجام گرفت، با استفاده از روش خنثی‌سازی ویروس نشان دادند که ۶۱/۷۰ درصد از گاو میش‌های تحت مطالعه دارای پادتن ضد ویروس BHV-1 بودند (حاجی حاجیکلائی و صیفی آباد شاپوری، ۱۳۸۶). بررسی‌های صورت گرفته در

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 کشت سلول 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 گاو میش‌های تحت مطالعه، در آزمایش خنثی‌سازی ویروس و الیزا به‌ترتیب ۵۸/۷ درصد و ۵۴ 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 ضد ویروس 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 ۹۸/۴ درصد بیان شد،

(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، به دنبال آلودگی حیوان، BHV-1 هم‌چنان در دستگاه عصبی باقی مانده و در هنگام بروز استرس مجدداً به شکل فعال نمایان خواهند شد، به طوری که جهت تشخیص بیماری IBR به شکل مخفی در گاوهای نر وارداتی با تزریق کورتیکو- استروئیدها در طی دوران قرنطینه می‌توان گاوهای نر مبتلا به شکل 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 گاوهای ارجاعی به کشتارگاه اهواز صورت گرفته است، اطلاعات دقیقی از وضعیت نگهداری آن‌ها در دسترس نمی‌باشد. هرچند که با مراجعه نگارندگان به محل‌های نگهداری گاوهای در شهر اهواز جهت درمان گاوهای 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 گاوهای نیز به این موضوع پرداخته‌اند.

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

کشورهای دیگر نیز حکایت از آلودگی سرمی گاوهای آن کشورها دارد، به طوری که میزان آلودگی در گاوهای 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 ۱۸۶۷ رأس گاوهای از ۱۵۵ گله با استفاده از آزمایش الیزا انجام گرفت، ۴۲ درصد از گاوهای از نظر BuHV-1 و ۳۰/۵ درصد از نظر BOHV-1 مثبت بودند (Scicluna *et al.*, 2007). فراوانی آلودگی به BHV-1 در گاوهای 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. به علت 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 به محض 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).

صیفی آبادشاپوری، ۱۳۸۶) است که روی این دام در اهواز صورت گرفته است. از آنجایی که 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 بر ملا 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 آزمایشگاه‌ها وجود ندارد، لذا می‌توان توصیه نمود به جای آن از آزمایش الیزا که روشی آسان و سریع می‌باشد استفاده شود.

افزایش سن به دلیل احتمال افزایش برخورد با عامل بیماری‌زا احتمال وقوع آلودگی در حیوانات نیز زیاده‌تر می‌شود و ارتباط معنی‌دار و مثبتی بین سن و آلودگی وجود دارد (هممت 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، به طوری 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 حاجیکلائی 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 حاجیکلائی و

منابع

- حاجی حاجیکلائی، م.ر. و صیفی آباد شاپوری، م.ر. (۱۳۸۶). بررسی سرواپیدمیولوژی آلودگی با هرپس ویروس تیپ ۱ (BHV-1) در گاو‌های اهواز. مجله دامپزشکی ایران، دوره ۲، شماره ۲، صفحات: ۲۳-۳۲.
- حاجی حاجیکلائی، 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 ۶۴۱.
- حضرتی، ح. (۱۳۵۵). هرپس ویروس‌های گاوی و نقش بیماری‌زایی 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 گاو‌میش‌های مستقر در مرکز تهیه اسپرم در ارومیه. پژوهش و سازندگی، شماره ۲، جلد ۱۵، صفحات ۲۳-۱۶.

- مامی، ف.، حاجی حاجیکلائی، م.ر. و صیفی آباد شاپوری، م.ر. (۱۳۹۴). مقایسه کیت تجاری الیزا با آزمایش خنثی‌سازی ویروس جهت تعیین آنتی‌بادی ضد ویروس اسهال ویروسی گاو در گاومیش. مجله دامپزشکی ایران. در دست چاپ.
- همت‌زاده، ف.، ممتاز، ح.، تاج‌بخش، ا. و صفری، ح. (۱۳۸۱). بررسی سرولوژی آلودگی به ویروس IBR در گاو‌داری‌های استان چهارمهل بختیاری. پژوهشی و سازندگی، شماره ۲، جلد ۱۵، صفحات: ۴۳-۳۸.
- 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). Occurrence 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 herpesvirus 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), PI₃ (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.

-
- 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 pestivirus. *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 Veterinaria Hungarica*, 47(3): 303-309.
 - Yossef, N.M.A. (1997). Prevalence of antibodies to bovine respiratory syncytial virus, infectious bovine rhinotracheitis and parainfluenza-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.

Comparison of commercial ELISA kit with serum neutralization (SN) in diagnosis of BHV-1 infections in water buffalo (*Buballous buballis*)

Arjomandi, N.¹, Haji Hajikolaei, M.R.^{2*}, Seyfi Abad Shapouri, M.R.³, Dagheri, M.⁴

1- Graduate of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2- Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

3- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

4- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author email: mhajih@scu.ac.ir

(Received: 2015/9/4 Accepted: 2015/12/21)

Abstract

In order to compare commercial ELISA kit with serum neutralization (SN) in diagnosis of BHV-1 infection, blood samples were taken from 150 (100 male, 50 female) slaughtered water buffalo (*Buballous buballis*) at Ahvaz abattoir. Sera were tested by commercial ELISA kit and SN to determine antibodies against BHV-1. Out of 150 buffaloes, prevalence of infection with BHV-1 in ELISA and SN was 54% (81 samples) and 58/7% (88 samples) respectively. Statistical analysis showed there was no significant difference between ELISA and SN for detection of antibodies to BHV-1 in sera of water buffalo.

Key Words: Buffalo, ELISA, Serum neutralization, Bovine Herpesvirus-1.