# بررسی سرولوژیک میزان آلودگی گاوان به BHV-1 با آزمون الایزا، مقایسه استفاده از نمونه‌های شیر و سرم در ارومیه

دکتر احمد مرشدی[1*] دکتر علیرضا محمودیان[1] دکتر بهرام دلیر نقده[1] دکتر احمد قره خانی[2] دکتر رضا رحمتی[2]

دریافت مقاله: ۲۳ دی ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۳۰ تیر ماه ۱۳۸۲

**هدف:** هدف این مطالعه تعیین آلودگی به BHV-1 با استفاده از نمونه‌های شیر و سرم گاوان توسط الایزای غیرمستقیم و مقایسه نتایج حاصل از نمونه های شیر و سرم بود.

**طرح:** مطالعه گذشته‌نگر.

**حیوانات:** صدو چهل رأس گاو ماده شیری و پنجاه رأس گاو نر از نژاد دو رگ در سنین بالاتر از ۲ سال.

**روش:** خونگیری از گاوان و جدا نمودن سرم و تهیه نمونه شیر از گاوان ماده و جستجوی پادتن BHV-1 در شیر و سرم به روش الایزای غیرمستقیم با تعیین OD نمونه‌ها و درصد موارد الایزا مثبت و الایزا منفی و مقایسه نتایج به دست آمده از شیر و سرم و تعیین درصد موافقت بین نتایج الایزای شیر و سرم.

**تجزیه و تحلیل آماری:** استفاده از آزمونهای استیودنت تی و مربع کای به منظور پی بردن به اختلاف بین درصد نتایج الایزای شیر و سرم، با سطح اطمینان ۹۵ درصد.

**نتایج:** از ۱۴۰ جفت نمونه شیر و سرم مربوط به گاوهای ماده ۳۸ مورد (۲۷/۱۵ درصد) الایزا مثبت از شیر و ۴۵ مورد (۳۲/۱ درصد) از سرم به دست آمد. نتایج نشان داد که الایزای سرم توانست ۵ درصد (۷/۱۴) بیشتر از الایزای شیر موارد آلودگی به BHV-1 را کشف نماید. لکن اختلاف آماری معنی‌داری بین درصد موارد الایزا مثبت شیر و سرم مشاهده نگردید. در این مطالعه همچنین نشان داده شد که بین نتایج الایزای شیر و سرم ۹۵ درصد همخوانی وجود دارد. همچنین در تحقیق حاضر نشان داده شد که حدود ۳۲ درصد از گاوان ماده و ۵۰ درصد از گاوان نر آلوده به BHV-1 می باشند.

**نتیجه گیری:** با توجه به یافته های آزمون الایزای شیر و سرم و نتایج آماری به دست آمده تحقیق حاضر نشان داد که در آزمون الایزا جهت تعیین وضعیت آلودگی گله به BHV-1 می توان نمونه های شیر را به جای سرم به راحتی به کار برد و از آن به عنوان یک تست غربالی در تشخیص گله های آلوده از غیرآلوده استفاده نمود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۳، ۲۵۹_۲۵۷.

**واژه‌های کلیدی:** آلودگی به BHV-1 ، الایزای شیر، گاو.

ویروس *رینوتراکئیت عفونی گاوان* (Infectious bovine rhinotheracheitis "IBR") بیماری بالینی قسمت فوقانی دستگاه تنفس را ایجاد و سبب التهاب بینی، حنجره و نای می شود (۸). آلودگی به این ویروس همچنین می‌تواند سبب تورم مهبل و فرج (IPV)، سقط جنین، ناباروری و گاهی آنسفالیت در گاوان گردد (۱). از طرفی عده زیادی از گاوان بالغ بدون بروز نشانیهای بالینی حامل ویروس بوده و می‌توانند سبب انتشار عفونت گردند (۱). این بیماری گرچه تلفات بسیار کمی دارد ولی خسارات اقتصادی مهمی نظیر کاهش تولید شیر و کم شدن گوشت و نیز سقط جنین به گله وارد می‌سازد. آزمون الایزا به طور وسیعی جهت جستجوی موارد مثبت سرمی و تعیین میزان آلودگی به BHV-1 در گله به کار رفته است (۹،۱۱). همچنین جستجوی anti- BHV-1 در شیر گاوان با آزمون الایزا جهت شناسایی گله‌های آلوده می تواند جایگزین سرم گردد (۲). هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان آلودگی به BHV-1 با استفاده از نمونه شیر و سرم و مقایسه نتایج حاصل از آنها با آزمون الایزا می‌باشد.

۱) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه -ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه -ایران.
*) نویسنده مسؤول Ahmad_Morshedi@yahoo.com

**Detection of anti BHV-1 antibody in milk and serum by ELISA, comparison using of milk and serum ELISA for determine of BHV-1 infection in cattle**

**Morshedi, A.,[1] Mahmoodian, A.,[1] Dalir Naghade, B.,[1] Gharakhani, A.,[2] Rahmati, R.[2]**

[1]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia -Iran.* [2]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia-Iran.*

**Objective :** Detecting seropositive BHV-1 infection in cattle by indirect ELISA using milk and serum samples from individual cows; comparing the use of milk instead of serum for determining the BHV-1 infection in cattle herds.

**Design:** Retrospective study.

**Animals:** A total of 140 cows and 50 bulls from 22 herds.

**Procedures:** Preparing serum and milk for detection of anti BHV-1 antibody by indirect ELISA. The sera were diluted 1:25 and the milk samples were used as undiluted. The sera and milk which had OD higher than 2.5 time OD of reference control serum considered as ELISA positive. The data obtained from 140 matched sets of milk and serum were compared with each other to determine the percentage of agreement between them.

**Statistical analysis:** Using of student's t and chi square tests for determine the significant differences between the percentage of milk and serum-ELISA positive.

**Results:** Out of 140 matched sets of milk and serum, 38 cases (27.15%) of milk -ELISA positive were obtained. The data showed 95% agreement between the results of milk-ELISA and sero-ELISA. The males showed higher levels (40%) of BHV-1 infection than females (32.1%).

**Conclusion:** The present study showed that the milk - ELISA can be used instead of serum-ELISA in detection of infected herds as a screening test. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 3: 257-259, 2003.***

**Key words :** BHV-1 seroprevalence, Milk- ELISA, Cattle.

**Corresponding author email:Ahmad_Morshedi@yahoo.com**

## مواد و روش کار

۱- خونگیری از گاوان در ۲۲ گله به طور تصادفی (Random allocation) انجام شد و نمونه‌های سرمی جدا و تا هنگام آزمایش در فریزر ۲۰- نگهداری گردید.

۲- نمونه شیر از هر گاو از یک کارتیه به میزان ۷-۶ میلی‌لیتر اخذ و در آزمایشگاه پس از سانتریفوژ و حذف چربی آنها، در ۲۰- درجه نگهداری شد.

۳- کیت الایزای غیرمستقیم، برای اندازه‌گیری Anti- BHV-1 در سرم و شیر به نام Svanovir IBR Kit ساخت شرکت Svanova Biotech, sweden شامل: پلیت‌های پوشش شده با آنتی ژن غیرفعال BHV-1، بافر PBS-Tween، کونژوگه پراکسیداز ضد IgG گاو، محلول‌سوبسترا (کروموژن)، محلول متوقف کننده، شیر کنترل منفی و مثبت، سرم کنترل منفی و مثبت.

## روش کار

۱۰۰ میکرولیتر از نمونه شیر و ۱۰۰ میکرولیتر نمونه سرم ۱:۲۵ به صورت دوتایی در دو حفره مجاور هم که یکی حاوی آنتی‌ژن BHV-1 و دیگری حاوی آنتی‌ژن کنترل (فاقد BHV-1) بود، ریخته شد.

چهار حفره آخرین ردیف پلیت جهت سرم مثبت و منفی رفرنس و نیز شیر مثبت و منفی رفرنس اختصاص داده شده پس از یکساعت نگهداری در گرمخانه ۳۷ درجه و ۳ بار شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از کنژوگه پراکسیداز به هر حفره ریخته و پس از یکساعت نگهداری در گرمخانه ۳۷ درجه و ۳ بار شستشو به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا اضافه و حدود ۱۵ دقیقه در حرارت اتاق گذاشته شد. پس از مشاهده تغییر رنگ ۵۰ میکرولیتر ماده متوقف کننده به هر حفره اضافه و OD (Optical Density) آنها در ۴۵۰ نانومتر خوانده و ثبت گردید. ارزش میانگین OD نمونه‌ها و رفرنس با کاهش OD حفره کنترل آنتی‌ژن از OD حفره آنتی ژن BHV-1 محاسبه گردید.

در این تحقیق نمونه شیر و سرمهایی که ارزش میانگین OD آنها مساوی یا بزرگتر از ۲/۵ برابر میانگین OD سرم منفی رفرنس بوده، مثبت در نظر گرفته شد (۶).

## نتایج

در این بررسی ۱۴۰ نمونه شیر و ۱۹۰ نمونه سرم از ۲۲ گله مورد تست الایزا قرار گرفت. از ۱۴۰ نمونه شیر ۳۸ مورد (۲۷/۱۴ درصد) و از ۱۹۰ نمونه سرم ۶۵ مورد (۳۴/۲ درصد) الایزا مثبت به دست آمد. از ۱۴۰ جفت شیر و سرم مربوط به گاوان ماده ۳۸ مورد الایزا مثبت از شیر (۲۷/۱۵ درصد) و ۴۵ مورد (۳۲/۱ درصد) از سرم به دست آمد. نتایج نشان داد که الایزای سرم توانست ۵ درصد (۷/۱۴۰) بیش از الایزای شیر، موارد مثبت را کشف نماید. از بین ۵۰ نمونه سرم مربوط به گاوان نر ۲۰ مورد (۴۰ درصد) الایزا مثبت مشاهده گردید. بزرگترین و کوچکترین میانگین OD در بین نمونه‌های الایزا مثبت به ترتیب برابر ۰/۴۱۵ و ۰/۵۴۰ بود.

میانگین OD شیر رفرنس منفی ۰/۲۱۰ و میانگین OD سرم رفرنس منفی ۰/۱۹۰ به دست آمد. از این رو نمونه‌های شیر یا سرم که میانگین OD آنها مساوی یا بزرگتر از ۰/۵۲۵ بود مثبت به حساب آمد. مقایسه داده‌های به دست آمده از الایزای شیر با الایزای سرم ۹۵ درصد همخوانی بین آنها نشان داد. ضمناً از ۲۲ گله مورد آزمایش ۱۸ گله (۸۱/۸ درصد) آلودگی به BHV-1 را نشان دادند.

## بحث

آزمون الایزا در اندازه‌گیری پادتن ضد BHV-1 در سرم و شیر در اکثر کشورها جهت تعیین آلودگی گله‌ها به کار رفته است (۸). در یک بررسی توسط Sacra و همکاران در سال ۱۹۹۹ با استفاده از الایزا و (Viral neutralization test "VNT") روی ۱۳۴ سرم گاو شیوع سرمی IBR را ۵۵/۹ درصد و همخوانی بین دو آزمون را ۹۶/۵ درصد به دست آورد.

Hartman و همکاران در سال ۱۹۹۷ با استفاده از الایزای شیر و سرم در تشخیص آنتی‌بادی BHV-1 نشان داد که بین نتایج حاصل از شیر و سرم در ۸۶ درصد موارد همخوانی وجود دارد. لکن در تحقیق حاضر همخوانی بین نتایج الایزای شیر و سرم ۹۵ درصد به دست آمد. در تحقیق دیگری که روی ۳۹۴ نمونه شیر و سرم به روش الایزا انجام شد درصد حساسیت الایزای شیر کمی بیش از ویژگی آن نشان داده شد (۸). در یک بررسی در کشور دانمارک استفاده از شیر جمع‌آوری شده از هر گله (Bulk tank) جهت تعیین وضعیت آلودگی گله‌ها به BHV-1 با الایزای شیر مناسب تشخیص داده شد (۵).

در مطالعه ای که در مجارستان انجام شد با استفاده از الایزای شیر و سرم آلودگی به BHV-1 در گله‌های بزرگ (۵۰<) ۶۴ درصد و در گله‌های کوچک ۱۵/۷ درصد تعیین گردید (۱۲). در تحقیق دیگری که روی ۲۱۴ سرم گاو انجام شد، حساسیت الایزا در تعیین آلودگی به BHV-1 ۹۹ درصد و ویژگی آن ۹۶/۵درصد تخمین زده شد (۹).

در تحقیق حاضر نشان داده شد که می‌توان نمونه های شیر را به جای سرم در آزمون الایزا جهت تعیین وضعیت آلودگی گله به BHV-1 به راحتی به کار برد. زیرا همان طور که داده‌ها نشان داد الایزای شیر فقط ۵ درصد آلودگی به BHV-1 را کمتر از الایزای سرم تعیین نمود، لکن با استفاده از آزمونهای آماری استیودنت تی و تست مربع کای با سطح اطمینان ۹۵درصد اختلاف معنی‌دار آماری بین درصد موارد الایزا مثبت شیر (۲۷/۱۵ درصد) و سرم (۳۲/۱ درصد) مشاهده نگردید. از طرف دیگر نشان داده شد که بین نتایج الایزای شیر و سرم ۹۵ درصد همخوانی وجود دارد. از این رو و از آنجا که نمونه‌برداری از شیر آسانتر و عملیتر از خونگیری از حیوان است. می‌توان در آزمایشات غربالگری جایگزین نمونه سرم گردد. در این مطالعه همچنین نشان داده شد که درصد آلودگی گاوان نر به BHV-1 بیش از گاوان ماده (به ترتیب ۴۰ درصد در برابر ۳۲/۱ درصد) است.

با توجه به نتایج مطالعات بالا می‌توان گفت که آزمون الایزای شیر و سرم با آزمون VNT که تست استاندارد است برابری کرده و می‌تواند به جای آن در تعیین آلودگی گله به کار برده شود. از سوی دیگر الایزا بر خلاف VNT نیاز به کشت سلول، ویروس زنده و صرف زمان طولانی نداشته و می‌تواند در هر آزمایشگاهی انجام شود.

اخیراً استفاده از شیر گاوان چه به طور انفرادی و یا به شکل شیر مخلوط گله و به کمک آزمون الایزا در تشخیص گله‌های آلوده به BHV-1 از گله‌های عاری از عفونت در برنامه های غربالگری در اکثر کشورها به کار گرفته است.

## References

1. Fenner, F., Bachman, P. A., Gibbs, EPJ., Murphy, F. A., studdert, M. J. and white, D.C. (1999): Veterinary Virology, Academic press., London. PP: 337-348.
2. Frankena, K., Franken, P., Vandhook, J., Koskamp, G. and Kramps, J. A. (1997): Probability of detecting antibodies to BHV-1 in bulk milk after introduction of a positive animal on to a negetive farm, J. Veter. Diagnosis Invest. 9: 24-31.
3. Hartman, A. and Vanwuijckuise, L. (1997): Within-herd BHV-1 prevalence pridiction from an ELISA on bulk milk, Vet. Rec. 140, 9: 484.
4. Miller, J.M. and Vander matten, M.J. (1986): Experimentally induced IBR virus infection during early pregnancy, Am. J. Vet. Res. 47: 223-228.
5. Nylin, B., Stroger, U. and Ronsholt, L. (2000): A retrospective evalution of BHV-1 antibody ELISA on bulk milk samples for BHV-1 status of Danish dairy herds. Preve. Vet. Med. 47, 91-105.

6. Perrin, B., Bitsxh, V., Cordioli, P., Edwards, S.M. and Van oitschot, J.T. (1993): A European comparative study of serological methods for the diagnosis of IBR, Rev. Sci. Tech. 12: 969-984.
7. Pritchard, G.C., Kirkwood, G.M. and Sayers, A.R. (2002): Detecting Ab to infectious bovine rhinctracheitis and *BVD* infection using milk samples from individual cows. Vet. Rec. 150: 182-183.
8. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. and Hinchcliffe, K. W. (2000): Veterinary Medicine, 9th ed. W. B. Saunders CO. London. PP: 1174-1185.
9. Rosskopf, A. and Staub, E. (1993): Comparison of two ELISA system for the detection of antibodies against IBR / TPV, Rev. Sci. tech. 12, 3: 969-984.
10. Sarca, M., Barboi, G., Tanasa, E. and Ianca, E. (1999): Immunoenzymatic method for the serodiagnosis of infectious bovine rhinoteracheitis. Studies Res. Vet. Med. 7: 29-35.
11. Straub, O.C. (2001): Advances in BHV-1 (IBR) research. J. Vet. Diag. Invest. 10: 43-48.
12. Tekes, L., Markos, B., Mate, Z. and Kudron, E. (1999): Prevalence of BHV-1 infection in Hungarian cattle herds., Acta Veterinaria Hungarica. 47: 303-309.