بررسی سرم شناسی عفونت ناشی از تیلریا آنولاتا در گاو به روش الایزا و مقایسه آن با مشاهدات بالینی و ریزبینی

دکتر احمد مرشدی[1]* دکتر محمدرضا حریدالهی[2] دکتر موسی توسلی[1] دکتر بهرام دلیرنقده[1]

دریافت مقاله: ۱۴ بهمن ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۱۲ شهریور ماه ۱۳۸۲

هدف: استفاده از آنتی ژن شیزونت سلولی تیلریا در آزمون الایزای غیرمستقیم و تعیین ارزش الایزا در بررسی سرم شناسی میزان آلودگی گاوها به تیلریا است.

طرح: مطالعه توصیفی.

حیوانات: صد و بیست و چهار رأس گاو و گوساله، که پنجاه و شش رأس با علایم درمانگاهی و شصت و هشت رأس بدون علایم بالینی و به ظاهر سالم بودند.

روش: خونگیری از گاوها و جدا نمودن سرم و تهیه گسترش خونی و جستجوی پادتن ضد تیلریا در سرم به روش الایزای غیرمستقیم با تعیینOD نمونه ها و درصد موارد الایزا مثبت و الایزا منفی و مقایسه نتایج به دست آمده از الایزا و گسترش خونی در دو گروه با علایم و بدون علایم بالینی. تعیین حساسیت و ویژگی الایزای تیلریا و نیز تعیین درصد موافقت بین دو آزمون الایزا و گسترش خونی.

تجزیه و تحلیل آماری: آمار توصیفی.

نتایج: از مجموع ۱۲۴ نمونه سرم، ۵۶ نمونه مربوط به موارد با علایم بالینی و لام مثبت خونی بود که ۴۲ مورد آن (۷۵ درصد) الایزا مثبت و ۱۴ مورد (۲۵ درصد) الایزا منفی به دست آمد که ظاهراً منفی کاذب به حساب آمدند. از بین ۶۸ نمونه مربوط به گاوهای فاقد علایم بالینی، ۱۵ مورد (۲۲ درصد) دارای گسترش خونی مثبت و ۱۹ مورد (۲۷/۹ درصد) تست الایزا مثبت داشتند. همچنین از ۱۲۴ گسترش خونی، ۷۱ مورد تیلریا مثبت بودند که ۵۴ مورد (۷۶ درصد) در الایزا نیز مثبت شدند و از ۵۳ لام خونی منفی، ۷ مورد (۱۳/۲۰ درصد) الایزا مثبت به دست آمد که ظاهراً الایزا مثبت کاذب به حساب آمدند.

نتیجه گیری: در تحقیق حاضر نشان داده شد که استفاده از شینرونت سلولی به عنوان آنتی ژن فاز جامد در الایزا حساسیت بالایی در اندازه گیری پادتن دارد و آزمون الایزا توانست ۶۱ مورد (۴۹/۱ درصد) آلودگی به تیلریا را کشف نماید. با توجه به داده های به دست آمده از الایزا و گسترش خونی، حساسیت الایزای تیلریا ۷۶ درصد و ویژگی آن ۸۶/۸ درصد و موافقت بین دو روش ۸۰ درصد به دست آمد. از اینرو از آزمون الایزای غیرمستقیم می توان به عنوان یک آزمون غربالی در تعیین میزان آلودگی گاوها به تیلریا استفاده نمود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۴، ۳۲۲-۳۱۹.

واژه های کلیدی: الایزای تیلریا، تیلریوز گاوی، *تیلریا آنولاتا*.

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

A seroprevalence survey of Theileria infection by ELISA, compare with blood-smear observation in cattle.

Morshedi, A.,[1] Horr-yadollahi, M.R.,[2] Tavassoli, M.,[1] Dalir-Naghade, B.[1]

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

Objective: Evaluation of an ELISA test using the cellular schizont antigen for the diagnosis of *Theileria anulata* infection.

Design: Descriptive study.

Animals: A total of 124 cattle, 56 cases with clinical features and 68 samples without clinical features and apparently healthy.

Procedure: Serum was collected from cattle for the detection of anti-Theileria antibadies by indirect ELISA, using the cellular schizont antigen and the microplates coated with this antigen. On the blood-smears from the same cases, microscopic observation was done for determine the percentage of positeve and negative cases of Theileria infection.

Statistical analysis: Descriptive statistics.

Results: Out of 56 serum samples, belong to animals with clinical features, 42 cases (75%) were ELISA-Positive and the rest (25%) were ELISA-negative whereas, all of them had positive blood-smears. Also, out of 68 serum from appatently healthy animals, 19 cases (27.9%) were ELISA-positive and 15 cases (22%) were blood smear-positive.

Conclusion: The present study by using of cellular schizont as solid phase antigen, showed high quality for detection of anti-Theileria antibodies by ELISA, and this test could detect 54 cases (76%) from a total of 71 animals with Thieleria-positive blood-smears. The results showed good correlation (80% coincidence) between the data obtained by two methods. Therefore, the ELISA could be recomended as a screening test for detecting of Theileria infection in cattle. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 4:319-322, 2003.***

Key words: *Teileria anulata*, Indirect ELISA, Cattle.

Corresponding author email:Ahmad_Morshedi@yahoo.com

تیلریوز، بیماری تک یاخته ای خطرناک نشخوارکنندگان اهلی بویژه گاو می باشد. عامل اصلی این بیماری در ایران *تیلریا آنولاتا*، تک یاخته قابل انتقال به وسیله کنه است (۳). در مناطق بومی اکثر گاوهای بالغ و گوساله ها آلوده می باشند و از نظر اقتصادی یک مشکل مهم در اجرای برنامه های اصلاح نژاد در خاورمیانه و آسیا می باشد و حدود ۲۰۰ میلیون گاو در خطر ابتلاء قرار دارند. خسارات دیگر این بیماری زردی، لاغری و مرگ است (۱۱). توسلی و همکاران در سال ۱۳۷۹ در بررسی روی گاوهای کشتاری در ارومیه، میزان آلودگی به تیلریا را با روش گسترش خونی، ۲۶ درصد به دست آوردند. آنتی بادیهای ضد تیلریا بر ضد اسپوروزوئیت، شیزونت و پیروپلاسم انگل در بدن ساخته می شود (۴). همچنین در مطالعه دیگری Anju Manuja و همکاران در سال ۲۰۰۱ با استفاده از آزمون ایمونوپراکسیداز نشان دادند که دو آنتی بادی منوکلونال Eu-1 و Eu-106 می توانند با آنتی ژنهای سطحی شیزونت *تیلریا آنولاتا* واکنش نمایند. در یک بررسی با آزمون ایمونوبلاتینگ یک پروتئین ایمونودامینت پلی مرفیک در پرده پلاسمایی لنفوبلاست های آلوده به *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا پاروا* به وسیله آزمون الایزا نشان داده شد (۱۲). در بررسی دیگری توسط Schnittger و همکاران در سال ۲۰۰۲ بین پروتئین ایمونودامینت سطح شیزونت سلولی *تیلریا آنولاتا* و *تیلریا پاروا* ۹۳ درصد تشابه به دست آمد که در آزمونهای سرم شناسی، قابل استفاده تشخیص داده شد. اخیراً تست الایزای غیرمستقیم را برای جستجوی آنتی بادی تیلریا پس از واکسینه کردن گاوان به کار گرفته اند (۱۴). هدف از تحقیق حاضر استفاده از آنتی ژن شیزونت سلولی در بررسی

سرم شناسی گاوهای با علایم بالینی، لام خونی مثبت و گاوهای به ظاهر سالم با آزمون الایزای غیرمستقیم و تعیین ارزش الایزا در بررسی میزان آلودگی گاوها به تیلریا است.

مواد و روش کار

۱ ـ تهیه گسترش خونی و خونگیری از ۱۲۴ گاو و گوساله و تهیه سرم جهت آزمون الایزا. سرمها تا هنگام آزمایش در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۲ ـ آنتی ژن: از واکسن تیلریوز گاوی، حاوی لنفوبلاست های آلوده به شیزونت تیلریا و شیزونت آزاد، ساخت مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن رازی استفاده گردید. از این واکسن شیزونت نسبتاً خالص تهیه و به عنوان آنتی‌ژن به کار رفت.

۳ ـ سایر معرفهای الایزا، شامل: بافر رقیق کننده سرم، بافر شوینده پلیت، کنژوگه پراکسیداز آنتی IgG گاوی، محلول سوبسترا، محلول متوقف کننده، سرم شاهد منفی، ساخت شرکت (Svanova, Biothec, Sweden)، سرم شاهد مثبت (مؤسسه رازی حصارک).

۴ ـ ۱۵ نمونه سرم از گاوان با گسترش خون منفی از نظر تیلریا، که ۲۵ روز قبل از خونگیری یک دوز واکسن تیلریا به هر گاو تزریق شده بود، به منظور اندازه‌گیری پادتن ضد *تیلریا آنولاتا* در گاوان واکسینه، آماده شد.

۵ ـ بافر پوشش دهنده پلیت (Coating Buffer). شامل بافر کربنات بی کربنات با pH برابر ۸/۶.

۶ ـ آلبومین ۱ درصد در بافر PBS جهت پر کردن فضاهای بین شیزونت در پلیت و گلوتارآلدئید ۰/۲۵ درصد در بافر PBS جهت فیکسه کردن شیزونت‌ها در میکروپلیت.

۷ ـ محلول فایکول ـ هایپک با وزن مخصوص ۱/۰۸۰ (ساخت لابراتوار بهار ـ تهران) جهت جداسازی لاشه لنفوبلاست ها از واکسن تیلریا و تهیه شیزونت سلولی.

روش کار

نوع حیوان: نمونه‌برداری در این مطالعه از گاوان دورگ و بومی منطقه ارومیه به صورت تصادفی انجام گرفت. از نظر سن و جنس، گروه سنی وجنس مدنظر نبود و گاوان در همه سنین و گوساله‌های بالای شش ماه مورد نمونه برداری قرار گرفتند و نتایج به دست آمده نیز از نظر گروههای سنی و جنس مورد تجزیه و تحلیل قرار نگرفتند. از نظر فصل نمونه‌برداری از اواخر فروردین آغاز و تا نیمه دوم مهر ماه ادامه یافت.

نمونه برداری: در ۶ ماهه اول ۱۳۸۰ از ۱۲۴ گاو و گوساله نمونه سرم و گسترش خونی تهیه گردید، گسترشها پس از رنگ آمیزی با گیمسا مورد مشاهده میکروسکپی قرار گرفتند. از ۱۲۴ گاو، تعداد ۵۶ رأس دارای علایم بالینی تیلریوز و بقیه دامها به ظاهر سالم بودند. خونگیری از دامهای به ظاهر سالم به طور تصادفی و به روش خوشه ای انجام شد. از ۱۵ دام با علایم بالینی تیلریوز علاوه بر گسترش خونی از غده لنفاوی پیش کتفی نیز گسترش ریزبینی و پس از رنگ آمیزی با گیمسا از نظر وجود شیزونت مورد آزمایش قرار گرفتند. وجود شیزونت در تمام ۱۵ نمونه در میدان ریزبینی تأیید شد. ضمناً از دامهای بدون علایم دوبار با فاصله گسترش خونی پهن و ضخیم تهیه شد، به جز در مواردی که دسترسی مجدد به دام امکانپذیر نبود.

تهیه آنتی‌ژن از واکسن تیلریا: ابتدا جهت آزاد شدن شیزونت از لنفوبلاست ها، با پنج بار انجماد و ذوب، اقدام به پاره کردن لنفوبلاست ها

جدول ۱ـ نتایج به دست آمده از الایزا و مشاهدات گسترش خونی در ۱۲۴ گاو و گوساله با علایم تیلریوز و به ظاهر سالم.

تعداد نمونه	میانگین OD	نتیجه الایزا +/-	نتیجه مشاهده ریزبینی +/-	علایم بالینی تیلریوز +/-
۱۲	۱/۵۳۷	+	+	-
۷	۱/۴۱۸	+ (مثبت کاذب)	-	-
۳	۰/۷۹۱	- (منفی کاذب)	+	-
۴۶	۰/۷۵۹	-	-	-
۴۲	۱/۷۶۳	+	+	+
۱۴	۰/۹۲۴	- (منفی کاذب)	+	+

گردید، سپس با استفاده از محلول فایکول ـ هایپک و سانتریفوژ اقدام به جداسازی شیزونت شد. به این ترتیب که ۱۰ میلی‌لیتر واکسن در دو لوله ریخته و به هر لوله ۵ میلی لیتر (نصف حجم واکسن) محلول فایکول ـ هایپک به آرامی و از جدار لوله روی واکسن اضافه شد و لوله ها به مدت ۲۵ دقیقه در ۳۵۰۰ دور سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ ۳ فاز متمایز در لوله‌ها تشکیل شد، به طوری که رسوب پایین لوله حاوی شیزونت و فاز وسط محلول فایکول هایپک و روی آن لایه لنفوسیتی قرار داشت. با دور ریختن محلول رویی و شستن رسوب با PBS (دوبار) جهت حذف فایکول هایپک، رسوب بار آخر به منظور تراکم بیشتر شیزونت در نصف حجم برداشت شده از واکسن (۵ میلی‌لیتر بافر در هر لوله) در بافر کربنات ـ بی کربنات حل گردید. میزان تراکم شیزونت با ریختن ۲۰ میکرولیتر از تعلیق آن روی دایره‌ای برابر قطر حفره پلیت، در روی یک لام و رنگ آمیزی آن، امتحان گردید و تراکم تنگاتنگ شیزونت‌ها مشاهده گردید. از همین تراکم شیزونت و با یک حجم ۵ برابر (۱۰۰ میکرولیتر) از مایع شیزونت به هر یک از حفرات پلیت ریخته شد (۵).

آماده نمودن پلیت ها: نظر به این که پلیت تجارتی پوششدار با آنتی ژن تیلریا در دسترس نبود، میکروپلیت ته صاف بر اساس روش (۵،۱۶) با شیزونت سلولی تیلریا پوشش دار گردید. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی ژن به هر حفره ریخته شد و پس از یکساعت انکوبه در ۳۷ درجه و یک شب در یخچال، جهت فیکسه شدن شیزونت در پلیت به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین حاوی ۰/۲۵ درصد گلوتارآلدیید اضافه و بعد از ۳ دقیقه، ۳ بار شستشو گردید. جهت مسدود کردن فضای بین شیزونت ها به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلبومین گاوی ۱ درصد در بافر فسفات سالین افزوده و یک شب در ۴ درجه گذاشته و سپس ۳ بار شستشو گردید. پرشدن فضای بین شیزونت‌ها به وسیله آلبومین مانع از چسبیدن آنتی بادیهای غیراختصاصی به پلیت شده و از واکنشهای کاذب جلوگیری می کنند (۸).

آزمون الایزا: نمونه های سرمی و سرم شاهد منفی و مثبت به نسبت ۱:۱۰۰ در بافر رقیق کننده سرم رقیق و ۱۰۰ میکرولیتر به هر حفره و به صورت Duplicate از هر سرم به هر حفره میکروپلیت ریخته و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از ۳ بار شستن ۱۰۰ میکرولیتر کنژوگه پراکسیداز به هر حفره ریخته و مجدداً یکساعت در ۳۷ درجه انکوبه و پس از ۳ بار شستن، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا به هر حفره ریخته و ۱۰ دقیقه دور از نور گذاشته شد و به محض مشاهده رنگ آبی ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر حفره اضافه گردید و OD حفرات به وسیله دستگاه فتومتر (Well Scan) در ۴۵۰ نانومتر خوانده و ثبت گردید (۹).

ملاک مثبت شدن: در مورد OD انتخاب شده به عنوان ملاک الایزا مثبت یا منفی گرفتن نمونه‌ها بر حسب مطالعات دیگران روی الایزی تیلریا

جدول ۲ - مقایسه نتایج الایزا با گسترش خونی در گاوهای با نشانه بالینی تیلریوز و دامهای به ظاهر سالم.

	دامهای با علایم بالینی			جمع (فراوانی نسبی)	دامهای به ظاهر سالم		
	الایزای مثبت (فراوانی نسبی)	الایزای منفی (فراوانی نسبی)			الایزای مثبت (فراوانی نسبی)	الایزای منفی (فراوانی نسبی)	جمع (فراوانی نسبی)
لام خونی مثبت	۴۲ (٪۷۵)	۱۴ (٪۲۵)		۵۶ (٪۱۰۰)	۱۲ (٪۸۰)	۳ (٪۲۰)	۱۵ (٪۲۲)
لام خونی منفی	۰	۰		۰(٪۰)	۷(٪۱۳/۲)	۴۶(٪۸۶/۸)	۵۳(٪۷۸)
جمع	۴۲ (٪۷۵)	۱۴ (٪۲۵)		۵۶ (٪۱۰۰)	۱۹ (٪۲۷/۹)	۴۹ (٪۷۲)	۶۸ (٪۱۰۰)

از نسبت T/N استفاده شده که عبارت است از OD سرم تست تقسیم بر OD سرم کنترل منفی (OD of test serum / OD of Negative serum). کلیه سرمهای تست که نسبت T/N آنها مساوی یا بزرگتر از ۲ بود مثبت در نظر گرفته شد (۹). به طوری که ۱۵ مورد سرم گاو که به آنها واکسن تیلریا تزریق شده بود نسبت T/N در همگی آنها مساوی یا بزرگتر از ۲ به دست آمد.

نتایج

از ۱۲۴ نمونه سرم مورد آزمایش، ۶۱ مورد (۴۹/۱ درصد) تست سرمی الایزا مثبت داشتند و بقیه الایزای منفی بودند. ملاک مثبت شدن در آزمون الایزا به این ترتیب بود که OD سرمهای با بیش از ۲ برابر OD سرم شاهد منفی، الایزا مثبت در نظر گرفته شد. بالاترین میانگین OD سرمهای الایزا مثبت ۱/۷۶۳ و پایین ترین میانگین آنها ۱/۴۱۸ به دست آمد (جدول ۱). میانگین OD سرم شاهد منفی ۰/۶۱۳ به دست آمد. از مجموع ۱۲۴ نمونه سرم، ۶۸ نمونه آن مربوط به گاوان فاقد علایم بالینی بود که ۱۵ مورد آن (۲۲ درصد) در مشاهده ریزبینی از نظر پیروپلاسم تیلریا مثبت بودند و نیز ۱۹ مورد (۲۷/۹ درصد) تست الایزا مثبت نشان دادند. ۵۶ نمونه دیگر از سرمها از گاوان با علایم بالینی تیلریوز و لام خونی مثبت به دست آمده بودند که ۴۲ مورد آن (۷۵ درصد) الایزا مثبت و ۱۴ مورد (۲۵ درصد) الایزا منفی بودند که ظاهراً منفی کاذب به حساب می آیند (جداول ۱ و ۲). از مجموع ۱۲۴ لام خونی، ۷۱ نمونه از نظر ریزبینی تیلریا مثبت بودند که ۵۴ مورد آن (۷۶ درصد) در تست الایزا نیز مثبت بودند. از طرف دیگر از ۵۳ نمونه لام خونی تیلریا منفی فقط ۷ نمونه (۱۳/۲۰ درصد) الایزا مثبت بودند که ظاهراً مثبت کاذب به حساب می آیند (جدول ۲).

بحث

در مطالعه ای در ارومیه نشان داده شد که بیماری تیلریوز تظاهر فصلی داشته و از فروردین ماه شروع و در طول ماههای خرداد و تیر به فراوانی آن افزوده شده و در ماههای مرداد و شهریور از تعداد مبتلایان کاسته شده به طوری که در ماههای مهر و آبان تعداد مبتلایان بسیار کم و در نیمه دوم آبان به صفر می رسد (۲). از این رو در مطالعه حاضر نمونه برداری از اواخر فروردین شروع و تا نیمه اول مهرماه ادامه یافت.

Gupta و همکاران در سال ۱۹۹۸ یکماه پس از واکسینه کردن ۱۲۶ گوساله با واکسن کشت نسجی تیتر آنتی بادی را به روش الایزا از ۱:۱۲۸۰ تا ۱:۴۰۹۶۰ به دست آوردند. در یک بررسی توسط Singh و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داده شد که ۷۸/۳ درصد از گاوهای غیرواکسینه در فصل شیوع بیماری الایزا مثبت بودند و ۹۷/۵ درصد از حیوانات واکسینه یک ماه پس از واکسینه شدن افزایش عیار آنتی بادی را بوسیله الایزا نشان دادند. میانگین عیار آنتی بادی در دامهای واکسینه بیش از دامهای غیرواکسینه به دست آمد. در مقایسه ای بین آنتی ژنهای شیزونت محلول و شیزونت سلولی و پیروپلاسمی محلول برای جستجوی آنتی بادی *تیلریا آنولاتا* با الایزا، نشان داده شد که آنتی ژن پیروپلاسم و شیزونت سلولی می توانند در جستجوی آنتی بادیها به طور موفقیت آمیزی در سرم گاو به کار گرفته شوند (۵). در تحقیق حاضر نیز از شیزونت سلولی به عنوان آنتی ژن در تست الایزا استفاده شد که حساسیت بالایی در اندازه گیری پادتن در سرم نشان داد.

در مطالعه ای که در تامیل هندوستان با روش الایزا و گسترش خونی روی ۲۵۰ نمونه سرم گاو و گاومیش انجام شد، ۶۴/۴ درصد گاوها و ۴۱/۹ درصد گاومیشها تست الایزا مثبت داشتند و حال آنکه ۲۲/۸ درصد گاوها و ۸ درصد گاومیشها پارازیتمی را نشان دادند (۱۵). در مطالعه حاضر از ۶۸ گاو به ظاهر سالم و فاقد علایم درمانگاهی ۲۲ درصد گاوها لام خونی مثبت نشان دادند و حال آن که ۲۷/۹ درصد آنها تست الایزای مثبت داشتند. این ۵/۹ درصد تفاوت ظاهراً الایزا مثبت کاذب به حساب آمد. لکن می تواند ناشی از تماس قبلی دام با تیلریا و ایجاد یک شکل تحت بالینی زودگذر با بهبود خود به خودی نیز باشد. همچنین از ۵۶ سرم مربوط به گاوهای با علایم درمانگاهی و لام خونی مثبت ۷۵ درصد الایزا مثبت و ۲۵ درصد الایزا منفی به دست آمد که ظاهراً منفی کاذب به حساب آمدند. لکن این احتمال وجود دارد که تعدادی از نمونه های الایزا منفی کاذب مربوط به مواردی از بیماری درمانگاهی باشد که دوره کمون کوتاهتر از ۷ روز داشته و هنوز تیتر آنتی بادی به حدی نرسیده بوده که در الایزا مثبت گردند.

در یک بررسی در شرق ترکیه روی ۱۱۰ گاو با تستهای PCR، IFA و گسترش خونی، نشان داده شد که آزمون PCR ۳۰ درصد، IFA ۲۹/۱ درصد و گسترش خونی ۱۶/۱ درصد نتیجه مثبت داشتند. گرچه در مقایسه PCR با لام خونی، PCR موارد منفی کاذب نشان نداد، ولی حدود ۱۴ درصد موارد PCR مثبت فاقد لام خونی مثبت بودند که ظاهراً مثبت کاذب به حساب می آیند. لکن همان طور که بحث گردیده موارد PCR مثبت با لام خونی منفی می تواند به علت آلودگی قبلی حیوان و ایجاد شکل تحت بالینی زودگذر باشد (۷). در تحقیق حاضر با توجه به نتایج به دست آمده از الایزا و گسترش خونی، ۱۷ نمونه الایزا منفی کاذب نشان داده شد (جدول ۲). از این رو حساسیت الایزا ۷۶ درصد به دست آمد. از سوی دیگر ۷ مورد الایزا مثبت کاذب در بین حیوانات فاقد علایم بالینی و لام خونی منفی مشاهده گردید (جدول ۲). از این رو ویژگی الایزای تیلریا ۸۶/۸ درصد به دست آمد. همچنین داده های به دست آمده از دو آزمون گسترش خونی و الایزا همخوانی بین نتایج دو آزمون را ۸۰ درصد (۱۰۰/۱۲۴) نشان داد. مطالعات روی اندازه‌گیری پادتنهای ضد تیلریا با روش الایزا از وسعت کمی برخوردار بوده و مقالات موجود نسبتاً کم است. هدف این مطالعه آن بود که نشان دهیم آیا اصولاً آنتی‌بادی قابل اندازه گیری با الایزا در سرم دامهای آلوده و

یا دامهای واکسن گرفته وجود دارد یا نه و دیگر اینکه نسبت T/N در مورد ODهای به دست آمده از گاوان واکسینه و یا آلوده با لام خونی مثبت در مقایسه با OD سرم کنترل منفی می‌تواند با ارزش باشد یا خیر. نظر به اینکه در تمامی تست‌های سرمی الایزا در بیماریهای عفونی مختلف نسبت T/N ۲ یا ۲/۵ برابر و بالاتر را الایزا مثبت در نظر می‌گیرند و در مورد الایزای تیلریا نیز همین نسبت صادق بود، از این رو روش الایزا می تواند در تعیین میزان دامهای سروپوزتیو در گله و نیز اندازه گیری پادتن ضد تیلریا در گاوان واکسینه و طول دوام پادتن در سرم مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج کلی این مطالعه نشان داد که با توجه به حساسیت و ویژگی خوب و وجود ۸۰ درصد سازگاری بین آزمون الایزا و گسترش خونی و نیز سهولت انجام الایزا در حجم های زیاد نمونه، می توان از الایزا به عنوان یک آزمون غربالی استفاده نمود.

References

۱. توسلی، م.، تاجیک، ح. و نجفیان بالا، ع. (۱۳۸۰): بررسی کشتارگاهی آلودگی به تک یاخته های خونی در گاو در ارومیه. نشریه خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره دامپزشکی ایران، چاپ اول، صفحه: ۷۲.

۲. شیرازی، ج. (۱۳۷۱): بررسی موارد بالینی تیلریوز در نشخوارکنندگان در ارومیه، پایان نامه شماره ۲۴۲، دانشکده دامپزشکی ارومیه، صفحه: ۲۸-۲۳.

۳. هاشمی فشارکی، ر. (۱۳۶۵): تیلریوز گاوی در ایران، نشریه مؤسسه رازی حصارک سازمان تحقیقات کشاورزی، چاپ اول، صفحه: ۱۰-۵.

4. Anju, M., Nichani, A. K., Kumar, R., Raka, N. D. and Sharma, R. D. (2000): Comparison of cellular schizont, soluble schizont and soluble piroplasm antigens in ELISA for detcting antibodies against *Theileria anulata*. Vet. Parasitol. 80: 93-101.

5. Anju, M., Rakesh, K., Nichani, A. K., Sharma, R.D. and Kumar, B. (2001): Assays for studies on *Theileria anulata* using monoclonal Antibodies, Indian J. Vet. Res. 10, 1: 21-27.

6. Anju, M., Nichani, A. K.; Kumar, R. Sharma, R.D. and Kumar, B. (2001): Single dilution ELISAS using soluble piroplasm, cellular schizont and soluble schizont antigens for the detecting of antibodies against Theileria anulata. Vet. Res. 32, 2: 165-173.

7. Aktas, M., Dumanli, N., Cetinkaya, B. and Cakmak, A. (2002): Field evaluation of PCR in detecting *Theileria anulata* infection in cattle in eastern Turkey. Vet. Rec. 150, 17: 548-549.

8. Caponi, L. and Migliorini, P. (1999): Antibody usage in the Lab. Springer, Lab. manual, London. PP: 34-50.

9. Gray, M.A., Lukins, A.G., Rae, R.F. and Brown, C.G. D. (1980): Evaluation of ELISA for serodiagnosis of infection with *Theileria anulata*, Res. Vet. Sci. 29: 360-366.

10. Gupta, S.A., Shatma, R.D., Rako, N.A. and Nichani, A. K. (1998): Immune response to *Theileria anulata* cell culture vaccine under field condition in bovines. Vet. Parasitol. 21, 2: 137-143.

11. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. and Hinchcliffe, K.W. (2000): Vet. Med. 9th ed. W. B. Saunders Co, London. PP: 1328-1329.

12. Senqupta, P., Bansal, G. and Ray, D. (1997): Immunodominant protein on plasma membrane of bovine lymphoblasts infected with *Theileria anulata*, Indian Vet. J. 67, 3: 205-206.

13. Schnittger, L., Katzer, F., Biermann, R., Shayan, P., Bogushawski, K., McKellar, S., Beyer, D., Shiels, B.R., Ahmed, J.B. (2002): Characterization of a polymorphic *Theileria anulata* surface protein, closely related to PIM of *Theilerria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. Mol. Biochem. parasitol. 120, 2: 247-256.

14. Singh, S., Karti, N.K., Manuja, A., Sharma, R.D. and Nichani, A.K. (2001): Impact of field vaccination with a *Theileia anulata* schizont cell culture vaccine on the epidemilogy of tropical theileriosis. Vet. Parasitol. 101: 91-100.

15. Soundarajan, C., Rajavellu, G. and Anandan, R. (2000): Enzymed-linked Immunosorbant assay for the detection of *Theileria anulata* infection in cattle and buffaloes. J. Vet. Parasitol. 14: 165-166.

16. Suri, D., Rakha, N. and Nickani, A.K. (1996): Comparative studies on ELISA and IFA test for assesment of humoral responses in bovine tropical theileriosis. Indian J. comp. Microbiol. Immunol. Diseases. 17: 1552-1560.