

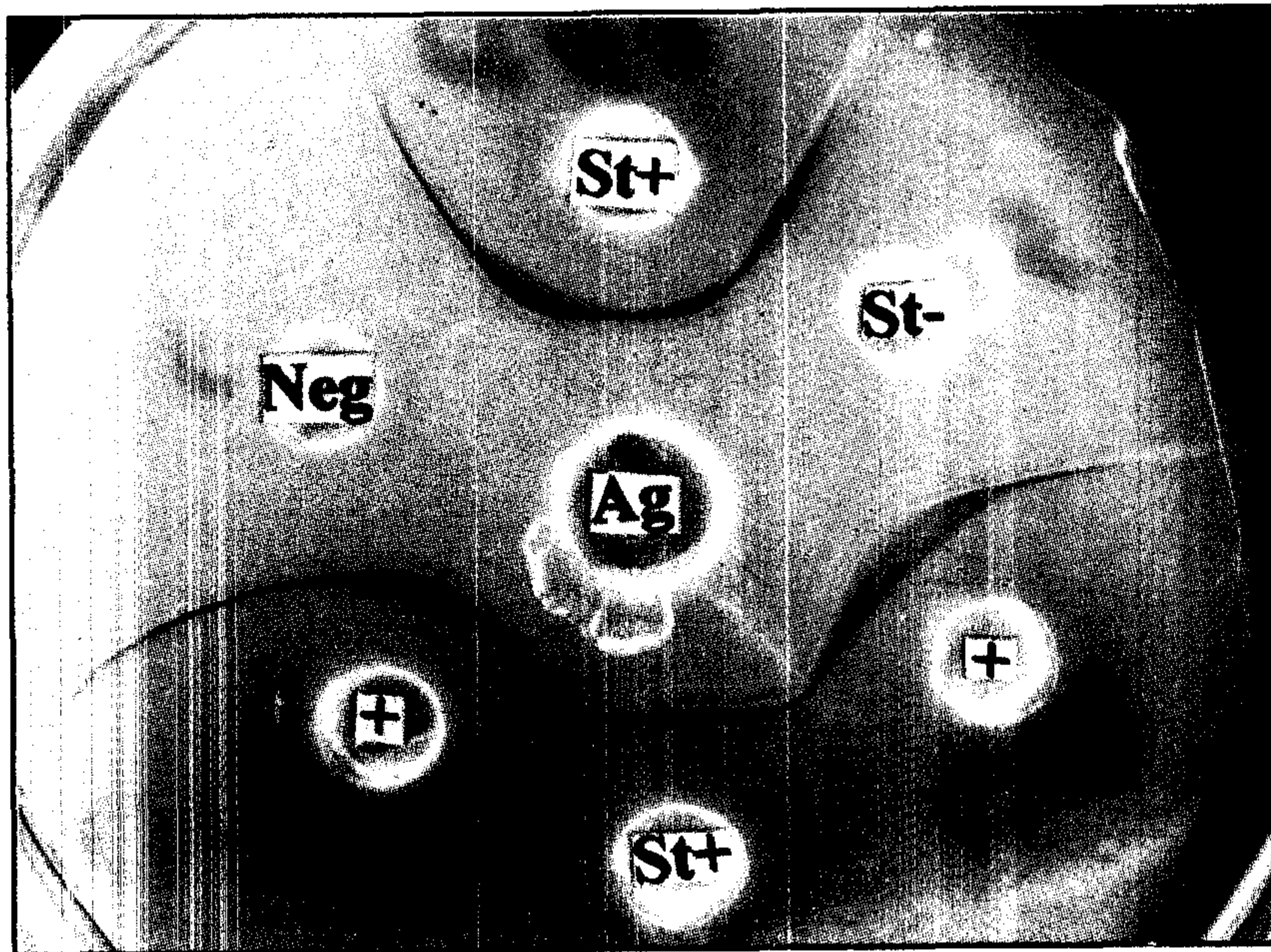
ارزیابی به‌کارگیری آزمون ژل دیفوزیون در تشخیص سرمی اسهال ویروسی گاوان

دکتر فرید همت‌زاده^۱

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۱، ۲۶-۲۵، (۱۳۸۰)

به‌کارگیری آزمون ژل دیفوزیون در تشخیص سرمی یا ردیابی پادگنی بیماری BVD وجود دارد ولی بیشتر از این آزمون جهت ردیابی پادگنهای ویروسی در نمونه‌های مرضی استفاده شده است. مطابق گزارش هائل در ۱۹۹۳ در صورت به‌کارگیری آزمون ژل دیفوزیون می‌توان ۸۷ درصد گاوهای آلوده به شکل پایداری که آلودگی آنها با آزمون جداسازی تأیید شده بود را شناسایی نمود (۸ و ۵).

به‌منظور ارزیابی به‌کارگیری آزمون ژل دیفوزیون در تشخیص سرمی بیماری اسهال ویروسی گاو، تعداد ۱۳۵۷ نمونه سرمی که قبلاً روی آنها آزمون SN انجام گرفته بود پس از غیرفعال‌سازی حرارتی جهت انجام آزمون انتخاب گردیدند. پادگن مورد استفاده حاصل تکثیر ویروس در کشت سلولی R-BK و سپس خالص‌سازی آن به روش اولترا سانتریفوژ بود که بدین منظور پس از کشت سویه استاندارد NADL ویروس BVD و کامل‌شدن CPE در کشت سلولی تک‌لایه، محتویات هر بطری یکبار در ۱۰۰۰۰g به مدت نیم ساعت در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد به‌منظور رسوب بقایای سلولی سانتریفوژ شده و سپس به‌منظور خالص‌سازی ویروس مایع روی حاصل سانتریفوژ به مدت ۹۰ دقیقه در ۸۰۰۰۰g در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد اولتراسانتریفوژ گردیده و پس از تخلیه مایع روی سانتریفوژ اقدام به تهیه تعلیق از رسوب حاصل از اولتراسانتریفوژ در PBS حاوی آنتی‌بیوتیک به حجم ۱/۵ مایع تخلیه‌شده اولیه گردید. این عمل به‌منظور تغلیظ ویروس و خارج‌نمودن پروتئینهای محیط کشت جهت ممانعت از ایجاد واکنشهای غیراختصاصی انجام گرفت (۸، ۵، ۴). جهت تهیه ژل مورد نظر از آگار نوبل دیفکو به میزان ۱۵ گرم در لیتر و حاوی ۱/۵ گرم در هزار سدیم آزاید استفاده گردید. پس از آماده‌سازی، انتقال به پلیت‌های پلاستیکی و انعقاد کامل، اقدام به گوده‌برداری با ابزار مخصوص شده و در گوده وسط پادگن و در گوده‌های کناری نمونه‌های سرم گاوریخته می‌شد. پلیت‌ها به مدت حداکثر یک هفته در درجه حرارت آزمایشگاه قرار داده شده و از روز دوم جهت مشاهده هر گونه خط رسوبی در زمینه تیره و نور غیرمستقیم مورد مطالعه قرار می‌گرفتند. کلیه نمونه‌های واجد خط رسوبی بار دیگر به همین روش و در کنار پادتن اختصاصی ضدسویه NADL ویروس BVD که قبلاً در گوسفند تهیه شده بود مجدداً آزمایش شده و در صورت الحاق کامل خط یا خطوط رسوبی بین‌نمونه مورد نظر و آنتی‌سرم استاندارد، نمونه به‌عنوان مثبت تلقی می‌گردد (۶) (تصویر ۱)



تصویر ۱ - خطوط رسوبی ایجادشده در موارد مثبت و منفی در مقایسه با موارد استاندارد در آزمون ژل دیفوزیون

به‌منظور ارزیابی به‌کارگیری آزمون ژل دیفوزیون در تشخیص سرمی بیماری اسهال ویروسی گاو، تعداد ۱۳۵۷ نمونه سرمی که قبلاً روی آنها آزمون SN انجام گرفته بود جهت انجام آزمون انتخاب گردیدند. پادگن مورد استفاده حاصل تکثیر و خالص‌سازی سویه استاندارد NADL ویروس BVD در کشت سلولی R-BK بود. جهت تهیه ژل از آگار نوبل دیفکو استفاده گردید و آزمون به روش معمول ژل دیفوزیون انجام گرفت. کلیه نمونه‌های واجد خط رسوبی بار دیگر در کنار پادتن اختصاصی ضدسویه NADL ویروس BVD مجدداً آزمایش شده و در صورت الحاق کامل خط یا خطوط رسوبی بین نمونه مورد نظر و آنتی‌سرم استاندارد، نمونه به‌عنوان مثبت تلقی می‌گردید. در نهایت از بین ۱۳۵۷ نمونه‌ای که به این روش مورد آزمایش قرار گرفته بودند تعداد ۲۵۱ نمونه واجد واکنش مثبت بودند در حالی که از بین همین ۱۳۵۷ نمونه آزمایش‌شده به روش SN، ۳۱۷ نمونه برعلیه ویروس BVD پاسخ مثبت از خود نشان داده‌اند. تعداد ۲۳۴ نمونه در هر دو آزمون واکنش مثبت داشته و تعداد ۱۰۲۳ نمونه در هر دو آزمون واکنش منفی از خود نشان داده‌اند. ۸۳ نمونه در آزمون SN پاسخ مثبت داشتند در حالی که در آزمون ژل دیفوزیون واکنش منفی از خود نشان دادند و تنها ۱۷ مورد در آزمون ژل دیفوزیون پاسخ مثبت و در SN پاسخ منفی از خود نشان دادند. انجام آزمونهای آماری بر روی یافته‌های فوق‌الذکر حاکی از آن است که پاسخهای حاصل از آزمون SN و ژل دیفوزیون در تشخیص سرمی BVD تا ۹۲/۶ درصد همخوانی داشته و ضریب چوپروف برای میزان همبستگی آنها ۰/۷۶ می‌باشد. با مقایسه حساسیت و ویژگی آزمون SN و میزان همخوانی آن با این آزمون، چنین به‌نظر می‌رسد که می‌توان تا حدی به پاسخهای حاصل از آزمون ژل دیفوزیون جهت قضاوت روی نمونه‌های سرمی اطمینان نمود ولی از آنجایی که جهت انجام یک آزمون غربالگری نیاز به آزمونی با حساسیت بالا وجود دارد و این آزمون با توجه به یافته‌های فوق‌الذکر و نظریات سایر محققین واجد حساسیتی کمتر از ۹۰ درصد است و نمی‌تواند به‌عنوان یک آزمون غربالگری مناسب مورد توجه قرار گیرد ولی به هر ترتیب نظر به سادگی، سهولت انجام، قابلیت تکرار و ارزانی چشمگیر این آزمون می‌تواند به‌عنوان یکی از آزمونهای تشخیص سرمی BVD از اعتبار خاص خود برخوردار باشد.

واژه‌های کلیدی: اسهال ویروسی گاوان، تشخیص سرمی، آزمون SN، آزمون ژل دیفوزیون.

بیماری اسهال ویروسی گاوان به‌عنوان یکی از فراوانترین بیماریهای ویروسی گاو از اغلب کشورها و همه قاره‌های جهان با وفور بین ۱۰ تا ۹۰ درصد گزارش گردیده است. آلودگی بسیاری از جمعیت‌های نشخوارکنندگان به این ویروس از نظر بالینی چندان چشمگیر نبوده و محدود به عوارض تحت بالینی یا بالینی با علائم نه چندان شاخص گوارشی و تنفسی می‌باشد ولی به واسطه تأثیرات نامطلوب ویروس بر باروری گاو مثل مرگ زودرس جنین، سقط، ناهنجاریهای مادرزادی و تولید گوساله‌های ضعیف و مستعدشدن گاوها به عفونتهای ثانویه به‌علت تضعیف دستگاه ایمنی، از یک طرف و وسعت و شدت چشمگیر آلودگی از طرف دیگر، لزوم به‌کارگیری آزمونهای تشخیصی آزمایشگاهی سریع، دقیق و ارزان را طلب می‌کند (۱، ۲، ۷، ۹، ۱۰).

امروزه از آزمونهای متنوعی مثل SN، الیزا و ایمونوپراکسیداز جهت تشخیص سرمی بیماری BVD استفاده می‌کنند. گزارشهای ناچیزی در زمینه

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



References

1. Baker, J.C. The clinical manifestation of bovine viral Diarrhea infection. *Veterinary clinic of north American. Food animal practice.* Vol. 11., 3 Nov., P: 147, (1995).
2. Done, J.T., Terleckis, S. and Richardson, C. BVDV, Pathogenicity for the fetus calf following maternal infection *Vet. Rec.* 106: 473-479, (1980).
3. Donis, R. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its introduction with the host. *Veterinary Clinics of the North America, Food Animal Practice.* Vol. 11, 3 Nov., 393, (1995).
4. Edwards, S. and Paton, D.J. Antigenic difference among pestiviruses. *Veterinary Clinics of the North America, food Animal Practic.* Vol. 11, 3 Nov., P: 563, (1995).
5. Hanel, V. A comparison two diagnostic methods for bovine virus diarrhoea infection. *Tierarztl Umschau,* 48, 339-343, (1993).
6. Hemmatzadeh, F., Keyvanfar, H. Effects of NADL strain of BVDV in sheep white blood cells. *Proceeding of the Vaccine and Immunotherapeutics congress.* March 19-23, 2000 Lorne. Australia pp: 20.
7. Keyvanfar, H., Hemmatzadeh, F. and Kargar Moakhar, R. A Serological Survey on Prevalence of Sheep Border Disease in Iran. *Archive of Razi Institute.* No. 59, pp: 27 Dec. (1999).
8. Paton, D.J. Pestivirus diversity. *J. Comp. Path.* Vol. 112: 3, 215-236, (1995).
9. Spangnolo, M. and Kenedys, A.N. BVD infection in bone marrow of experimentally infected calves. *J. Comp. Path.* Vol. 116: 4, P: 97-100, (1997).
10. Withmore, H.I. and Zemjamis, R.C. Effect of BVD virus on conception in cattle. *JAVMA* 178 pp: 1065-1067, (1981).

Evaluation of immunodiffusion test for serodiagnosis of Bovine viral diarrhea

Hemmatzadeh, F.¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.

In this study we tested 1357 serum samples in serum neutralization test (SN) by using the NADL strain of BVD virus and Immunodiffusion test by using concentrated BVD virus propagated on R-BK cell culture as antigen. From 1357 tested samples by S.N. test 317 samples were positive and by Immunodiffusion test 251 samples were positive. 234 samples were positive and 1023 samples were negative in both test, correlation between these two test is 92.6%. However, for reasons of sensitivity and specificity of these two methods, time and economy, the Immunodiffusion test is considered as the practical routine serodiagnostic method.

Key words : BVD, SN, AGID, Serodiagnosis.

در نهایت از بین ۱۳۵۷ نمونه‌ای که به این روش مورد آزمایش قرار گرفته بودند تعداد ۲۵۱ نمونه واجد واکنش مثبت بودند در حالی که از بین همین ۱۳۵۷ نمونه آزمایش شده به روش SN، ۳۱۷ نمونه بر علیه ویروس BVD پاسخ مثبت از خود نشان دادند. تعداد ۲۳۴ نمونه در هر دو آزمون واکنش مثبت داشته و تعداد ۱۰۲۳ نمونه در هر دو آزمون واکنش منفی از خود نشان دادند. هشتاد و سه نمونه در آزمون SN پاسخ مثبت داشتند در حالی که در آزمون ژل دیفوزیون واکنش منفی از خود نشان دادند و تنها ۱۷ مورد در آزمون ژل دیفوزیون پاسخ مثبت و در SN پاسخ منفی از خود نشان دادند (۶ و ۵). انجام آزمونهای آماری بر روی یافته‌های فوق‌الذکر حاکی از آن است که پاسخهای حاصل از دو آزمون SN و ژل دیفوزیون در تشخیص سرمی BVD تا ۹۲/۶ درصد همخوانی داشته و ضریب چوپروف برای میزان همبستگی آنها ۰/۷۶ می‌باشد. با توجه به یافته‌های سایر محققین در زمینه میزان حساسیت و ویژگی آزمون SN در موارد بیماری تجربی در صورت به‌کارگیری سوبه‌های هومولوگ به ترتیب ۹۲ و ۹۰ درصد برای حساسیت و ویژگی و در صورت به‌کارگیری سوبه‌های هترولوگ این مقادیر به ۸۵ و ۸۹ درصد بالغ می‌شوند. چنین به نظر می‌رسد که با توجه به میزان همخوانی ۹۲ درصدی این دو روش و با مدنظر قراردادن حساسیت و ویژگی آزمون SN و ژل دیفوزیون می‌توان تا حدی به پاسخهای حاصل از آزمون ژل دیفوزیون جهت قضاوت روی نمونه‌های سرمی اطمینان نمود ولی از آنجایی که جهت انجام یک آزمون غربالگری نیاز به آزمونی با حساسیت بالا وجود دارد و این آزمون با توجه به یافته‌های فوق‌الذکر و نظریات سایر محققین واجد حساسیتی کمتر از ۹۰ درصد است و نمی‌تواند به‌عنوان یک آزمون غربالگری مناسب مورد توجه قرار گیرد ولی به هر ترتیب نظر به سادگی، سهولت انجام، قابلیت تکرار و ارزانی چشمگیر این آزمون می‌تواند به‌عنوان یکی از آزمونهای تشخیص سرمی BVD از اعتبار خاص خود برخوردار باشد (۳، ۴، ۵).

