بررسی فراوانی عفونت ناشی از روتاویروس در گوساله‌های ۱۲ ـ ۰ هفته در ارومیه

دکتر احمد مرشدی[1]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دورهٔ ۵۳، شماره ۳ و ۴، ۴۹ ـ ۴۷، (۱۳۷۷)

در این بررسی به‌منظور تعیین درصد فراوانی اسهال‌های ناشی از روتاویروس در گوساله‌های ۱۲ ـ ۰ هفته در ارومیه تعداد ۱۱۶ نمونه مدفوع توسط آزمون الایزا (Capture ELISA) و تعیین عیار روتاویروس در مدفوع مورد آزمایش قرار گرفت. در این تحقیق ازکیت‌های تجارتی الایزا ـ روتاکیت که حاوی آنتی‌بادی‌های منوکلونال است استفاده شد و بر اساس آن عیار روتاویروس که مولد اسهال در گوساله‌های خیلی جوان است در مدفوع اندازه‌گیری گردید. تحقیق حاضر نشان داد که ۳۱ مورد از ۱۱۶ نمونه از نظر روتاویروس الایزا مثبت گردید (۲۶/۷ درصد) که همگی میزان جذب نوری مساوی یا بزرگ‌تر از ۰/۱۲۵ در اسپکتروفتومتر داشتند. از این رو میزان عفونت ناشی از روتاویروس در گوساله‌های جوان حدود ۲۶ درصد به‌دست آمد. در خاتمه مقایسه‌ای بین تست‌های رایج در تشخیص اسهال روتاویروسی، نظیر الکترون میکروسکوپی، آگلوتی نیشن لاتکس و ایمونودیفیوژن روی پلی آکریلامید با تست الایزا از نتایج به‌دست آمده از کارهای دیگران و تحقیق حاضر به‌عمل آمد و نشان داده شد که آزمون الایزا جهت جستجوی روتاویروس در مدفوع نسبت به آزمون‌های رایج فوق دارای حساسیت و ویژگی بیشتری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: الایزا، روتاویروس، اسهال، گوساله

روتاویروس‌ها عمده‌ترین عامل اسهال در حیوانات جوان به‌ویژه گوساله‌ها هستند که به‌طور جمعی پرورش می‌یابند. بیماری حاصل از روتاویروس‌ها از عفونت تحت درمانگاهی تا التهاب روده‌ها با شدت متفاوت و مرگ تغییر می‌کند. بیماری اغلب در حیوانات جوان از ۸ـ۱ هفتگی بروز می‌کند ولی به‌ندرت در اولین هفته پس از تولد نیز دیده می‌شود (شیمی ۱۳۷۵). اسهال‌های روتاویروس اغلب همراه با آلودگی کوروناویروس بوده که ممکن است همراه با عفونت اشرشیاکولای K99 و یا بدون آن باشد (Radostits, 1994). در ۱۹۸۳ Mcnulty در یک همه‌گیری درصد آلودگی با روتاویروس را ۷۹ درصد گزارش کرد و Alfonso در ۱۹۸۵ در آزمایش مدفوع ۱۹۹ گوساله مبتلا به اسهال، روتاویروس را در ۵۷ درصد نمونه‌ها به‌دست آورد. همچنین Hammami و همکاران در ۱۹۸۹ با کشت روتاویروس از مدفوع گوساله‌ها استفاده از تست ایمونوفلوروسنس و Capture ELISA، ۷۸ درصد روتاویروس مثبت گزارش کرد. بررسی‌های گذشته نشان داده است که بیشتر اسهال‌های ناشی از روتاویروس از گوساله‌ها با آلودگی اشرشیاکولای همراه بوده است. ولی کوشش به عمل نیامده است که معلوم سازد آیا اشرشیاکولای جدا شده حدت و خصوصیت نوع بیماری‌زا را دارد یا خیر؟ (Radostits, 1994). در تحقیق حاضر با استفاده از تکنیک الایزا توسط روتاکیت که در آن از آنتی‌بادی منوکلونال برای شناسایی روتاویروس در مدفوع استفاده شده، درصد فراوانی عفونت روتاویروس در گوساله‌های جوان مورد سنجش قرار گرفت.

مواد و روش کار

۱ ـ نمونه‌گیری: نمونه مدفوع از ۱۱۶ گوساله ۱۲ ـ ۰ هفته اخذ و در ظروف شیشه‌ای استریل ریخته و ظرف ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰ ـ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد. از این نمونه‌ها جهت جستجوی آنتی‌ژن روتاویروس در مدفوع استفاده شد.

۲ ـ برگه‌های نمونه‌برداری: کلیه مشخصات گوساله مورد نمونه‌برداری شامل سن، جنس، نژاد، نوع اسهال، نام صاحب دام، و آدرس در برگه‌های شماره‌دار ثبت می‌شد.

۳ ـ کیت الایزای روتاویروس: شامل ۲ میکروپلیت ۹۶ تستی همراه با آنتی‌بادی کنژوگه پراکسیداز و کلیه معرف‌های لازم متعلق به شرکت روکت اینترنشنال و به نام Bio-X ساخت آلمان بود.

۴ ـ آنتی‌ژن شاهد مثبت (Rota antigen positive control): که در هنگام مصرف در ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید.

۵ ـ دستگاه خواندن تست الایزا: از یک فتومتر به نام Denley Wellscan که SAV (Specterophotometre Absorbence Value) هر حفره میکروپلیت را خوانده و توسط چاپگر متصل به دستگاه روی کاغذ ثبت می‌کرد، استفاده شد.

روش کار

۱ ـ تمام محلول‌ها و معرف‌های مواد مورد آزمایش دست‌کم نیم‌ساعت قبل از مصرف در حرارت آزمایشگاه قرار می‌گرفت.

۲ ـ نمونه‌های مدفوع به روش V/V و به نسبت 1:2 با بافر رقیق‌کننده مخلوط شد و جهت جدا شدن ذرات درشت به مدت ۲۰ ـ ۱۵ دقیقه در آزمایشگاه بی‌حرکت باقی می‌ماند و سپس مایع رویی به آرامی با پی‌پت پاستور برداشت می‌شد. این مایع به‌عنوان آنتی‌ژن در تست الایزا به کار رفت.

۳ ـ مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن به‌دست آمده از هر نمونه مدفوع (بند ۲) به‌شرح زیر به حفرات میکروپلیت اضافه شد. نمونه شماره ۱ در حفرات A1 و B1 (یعنی دو حفره اول ستون ۱ ردیف‌های A و B). نمونه شماره ۲ در حفرات C1 و D1 و الی آخر... ضمناً دو حفره آخر ستون ۱۲ مربوط به ردیف G و H به آنتی‌ژن مثبت رفرنس اختصاص یافت.

۴ ـ میکروپلیت به مدت یک ساعت در حرارت اطاق قرار گرفت و سپس ۳ بار با بافر شوینده آبکشی شد.

۵ ـ آنتی سرم کنژوگه پراکسیداز را به نسبت 1:50 در بافر رقیق‌کننده حل کرده و به هر حفره میکروپلیت اضافه شد، و به مدت یک ساعت در حرارت اطاق نگهداری گردید. پس از اتمام مدت پلیت سه بار با بافر شسته شد.

۶ ـ در این مرحله برای تهیه ۱۰ میلی‌لیتر محلول سوبسترا ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول کرموژن به ۹/۵ میلی‌لیتر محلول آب‌اکسیژنه ۰/۳ درصد اضافه شد و بلافاصله به هر حفره میکروپلیت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا ریخته شد و بلافاصله در زیر سرپوش (برای جلوگیری از نور) قرار گرفت.

۷ ـ در این مرحله در فاصله ۱۰ ـ ۵ دقیقه پلیت تحت نظر قرار گرفت و به‌محض تغییر رنگ و آبی شدن آن محلول متوقف‌کننده به‌میزان ۵۰ میکرولیتر به هر حفره اضافه گردید.

۸ ـ سپس میکروپلیت آماده خواندن بود و SAV حفرات با استفاده از دستگاه

۱) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه ـ ایران.

ELISA reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد و توسط چاپگر متصل به دستگاه روی کاغذ ثبت گردید.

اصول تست الایزا برای جستجوی روتاویروس در مدفوع بااستفاده از روتاکیت:

در این تست از میکروپلیت‌های ۹۶ حفره‌ای که با آنتی‌بادی اختصاصی ضد روتاویروس حساس شده است (Couted plate) استفاده شد. این آنتی‌بادی‌ها قادرند این پاتوژن را (روتاویروس) که در نمونه مدفوع وجود دارند به‌طور اختصاصی به خود جذب نمایند و به آن بچسبند.

ردیف‌های A،C،E وG میکروپلیت (یعنی یک در میان) به‌وسیله آنتی‌بادی‌های ضد روتاویروس حساس شده‌اند. ردیف‌های B،D،F وH حاوی آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی هستند. به این معنی که با سرم گوساله‌هایی که از نظر آنتی‌بادی‌های ضد روتاویروس سرونگاتیو هستند حساس شده‌اند و به‌عنوان ردیف‌های شاهد منفی محسوب می‌شوند. این ردیف‌های شاهد تمایز بین واکنش‌های ایمونولوژیک اختصاصی و اتصال‌های غیراختصاصی را مشخص می‌کنند. برای به‌دست آوردن SAV خالص هر نمونه مورد آزمایش بایستی عدد ثبت شده برای حفره شاهد منفی را از عدد مربوط به حفره نمونه مورد آزمایش کسر نمود (جدول ۱).

جدول ۱ ـ تعداد موارد الایزا مثبت روتاویروس از بین ۱۱۶ نمونه مدفوع SAV آنها مساوی یا بزرگ‌تر از ۰/۱۲۵ می‌باشد.

ردیف	شماره نمونه	ارزش خالص SAV	ردیف	شماره نمونه	ارزش خالصه SAV
۱	۱	۳/۲۵۵	۱۷	۵۵	۱/۶۳۲
۲	۳	۲/۸۳۱	۱۸	۶۳	۳/۳۴۴
۳	۴	۱/۴۷۵	۱۹	۶۹	۰/۱۸۲
۴	۵	۰/۱۳۷	۲۰	۷۰	۰/۱۶۶
۵	۹	۰/۳۴۸	۲۱	۷۳	۳/۱۳۸
۶	۱۶	۲/۸۵۴	۲۲	۷۵	۰/۱۷۳
۷	۱۷	۱/۰۰۹	۲۳	۷۸	۰/۳۸۶
۸	۱۸	۳/۲۶۴	۲۴	۷۹	۰/۱۹۷
۹	۱۹	۰/۱۷۵	۲۵	۸۵	۳/۳۲۵
۱۰	۲۳	۲/۷۲۱	۲۶	۹۷	۱/۸۱۹
۱۱	۲۶	۲/۳۵۱	۲۷	۹۹	۳/۲۲۴
۱۲	۲۸	۰/۱۲۹	۲۸	۱۰۹	۲/۱۱۹
۱۳	۳۲	۲/۸۹۰	۲۹	۱۱۱	۲/۳۲۹
۱۴	۳۳	۰/۶۰۵	۳۰	۱۱۲	۲/۵۱۲
۱۵	۳۵	۰/۲۴۱	۳۱	۱۱۳	۰/۲۹۴
۱۶	۳۷	۲/۴۲۳			

آنتی‌ژن شاهد مثبت همراه کیت ارزش رفرنس را به‌دست می‌دهد به این معنی که ارزش SAV به‌دست آمده از دو حفره مربوط به آنتی‌ژن کنترل مثبت را ثبت کرده و از هم تفریق می‌کنم عدد حاصل ارزش رفرنس است، با ضرب این ارزش رفرنس در یک ضریب مخصوص (C) حد مثبت شدن را برای کیت تعیین می‌کنیم. ضریب ثابت C برای آنتی‌ژن کنترل مثبت عبارت است از عکس غلظت آن آنتی‌ژن، به‌عنوان مثال ضریب آنتی‌ژن کنترل مثبت روتاویروس در کیت مورد استفاده ۰/۰۴ بوده است. به عبارت دیگر چنانچه این آنتی‌ژن را به نسبت ۱:۲۵=۰/۰۴ رقیق کرده و به کار بریم SAV حاصل از آن برابر SAV حد مثبت شدن خواهد شد. لکن چون آنتی‌ژن رفرنس را با عیار ۲۵ در الایزا به کار می‌بریم واضح است که SAV حاصل از آن را باید در ۰/۰۴ ضرب کنیم. حد مثبت شدن برای آنتی‌ژن با روتاکیت از ضرب SAV خالص آن یعنی ۳/۱۳۹ در ضریب اختصاصی C یعنی ۰/۰۴ محاسبه شد که برابر ۰/۱۲۵ گردید. تمام نمونه‌هایی که SAV بزرگ‌تر یا مساوی این عدد داشتند مثبت گرفته شد.

نتایج

در این بررسی جمعاً ۱۱۶ نمونه مدفوع گوساله‌های ۱۲ ـ ۰ هفته مبتلا به اسهال و غیر اسهالی به‌منظور تعیین درصد فراوانی ابتلاء اسهال روتاویروسی یا آلودگی با ویروس تحت آزمون الایزا قرار گرفت. از بین ۱۱۶ نمونه ۳۱ مورد (۲۶/۷ درصد) روتاویروس مثبت به‌دست آمد که همگی SAV ۰/۱۲۵ و بالاتر داشتند. از بین نمونه‌های مثبت سرمی بزرگ‌ترین SAV، ۳/۳۴۴ به‌دست آمده که مربوط به نمونه شماره ۶۳ بود و با توجه به اینکه عدد SAV حد مثبت شدن ۰/۱۲۵ است عیارویروس در این نمونه ۲۶ می‌باشد و کمترین SAV، ۰/۱۲۹ به‌دست آمد که مربوط به نمونه شماره ۲۸ بود (جدول ۱).

تفکیک نتایج مثبت سرمی بر اساس سن، جنس و نژاد گوساله نظر به اینکه اختلاف درصد معنی‌داری بین آنها وجود نداشت از ذکر آن خودداری گردید، و به ترتیب ۴۷ درصد و ۵۳ درصد در جنس نر و ماده مشاهده گردید.

بحث

سندرم اسهال یک علت اصلی مرگ در گوساله‌های جوان زیر یک ماه است. گاستروآنتریت گوساله‌های نوزاد و تا سن ۱۰ هفتگی یک بیماری است که با عوامل متعددی نظیر روتاویروس، کوروناویروس، E.coli-K99 و کریپتوسپور می‌تواند ایجاد شود. در سال ۱۹۹۲ Thoms و همکاران یک تست الایزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال جهت جستجوی عوامل فوق به‌طور همزمان در مدفوع را شرح دادند.

عامل وقوع اسهال هرچه باشد نتیجه اصلی یکی و آن هم اتلاف آب و الکترولیت‌ها است و ممکن است گوساله‌ها بیش از ۱۲ درصد از وزن بدن خود آب از دست بدهند و به علت کاهش شدید حجم خون حیوان دچار کلاپس عروق محیطی و شوک و نهایتاً مرگ شود (Radostits. etal, 1994). تشخیص عامل اسهال از جمله روتاویروس به‌وسیله تکنیک الایزا و استفاده از مدفوع مورد آزمایش جهت جستجوی مستقیم عامل عفونت روش نسبتاً سریع و مناسبی به‌نظر می‌رسد.

استفاده از این تکنیک به‌صورت یک تست غربالی در تمام افراد گله و پیدا کردن افراد دچار عفونت و درمان آن‌ها می‌توان از سندرم اسهال در گله پیشگیری و تا حدود زیادی آن را کاهش داد (Thoms, 1992).

در تحقیق حاضر نشان داده شد که درصد فراوانی آلودگی با روتاویروس در گوساله با تست الایزا و اندازه‌گیری عیار ویروس در مدفوع حدود ۲۷ درصد بوده است. لکن در گزارش‌های دیگری که در سایر کشورها انجام شده درصد فراوانی اسهال‌های روتاویروس را بزرگ‌تر یافته‌اند. به‌طوری که Mcnulty و Logan در ۱۹۸۳ درصد فراوانی آلودگی گوساله‌ها با روتاویروس را ۷۹ درصد گزارش کردند که ۵۸ درصد مربوط به فرم درمانگاهی و ۴۲ درصد بقیه مربوط به عفونت تحت درمانگاهی بود. لکن نظر به اینکه روتاویروس را از گوساله‌هایی که هرگز به اسهال مبتلا نشده‌اند نیز جدا کرده‌اند (Raddostits etal, 1994)، از این رو جداسازی روتاویروس از مدفوع اسهالی به تنهایی دلیل محکمی برای اثبات عفونت روتاویروس نمی‌باشد. در مطالعه حاضر نظر به اینکه با استفاده از تکنیک الایزا آلودگی به روتاویروس با تعیین عیار آنتی‌ژن در مدفوع بررسی شد می‌توان درصد فراوانی بدست آمده را نزدیکتر به واقعیت دانست. در این بررسی از نظر

جنس و نژاد گوساله اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید، ولی از نظر گروه سنی نظر به اینکه روتاویروس‌ها تا دو ماه پس از آلودگی در مدفوع باقی می‌ماند (شیمی، ۱۳۷۵) از این‌رو تست سرولوژیک الایزا مثبت بر اساس جستجوی عیار ویروس در مدفوع گوساله نمی‌تواند آلودگی را در محدوده سنی مشخص کند و تنها تظاهرات بالینی در فاصله سنی مشخص مطرح است.

آزمون الایزا و الکترون میکروسکوپی در جستجوی روتاویروس از مدفوع گوساله‌هایی که به‌طور تجربی آلوده شدند اعتبار یکسانی نشان دادند، موافقت بین دو آزمون ۸۴ درصد برای روتاویروس گزارش شده است (Reynolds,1984).

در آزمون الایزا، چنانچه آنتی‌بادی ضد ویروس با تیتر بالا در روده حیوان مبتلا وجود داشته می‌تواند نتیجه تست الایزا را منفی کاذب نشان دهد. از طرفی در آزمون الکترون میکروسکوپی نظر به اینکه روتاویروس‌های گروه B و C که عفونت ایجاد نمی‌کنند ولی از نظر مرفولوژی شبیه روتاویروس گروه A هستند می‌تواند در نتیجه آزمایش اشکالاتی ایجاد نمایند. همچنین برخی از روتاویروس‌های آتیپیک که فاقد آنتی‌ژن مشترک گروهی هستند، چون تست الایزا بر اساس حضور آنتی‌ژن مشترک گروه عمل می‌کند نمی‌تواند آن‌ها را کشف نماید و تست منفی کاذب نشان می‌دهد (Chasey, 1986). از این رو به‌طور کلی ویژگی تست الایزا نسبت به آزمون‌های لاتکس و پلی آکریلامیدژل دارای حساسیت بیشتر اما ویژگی کمتری است (۹۰ درصد) و نیز نشان داده شده که آگلوتی‌نیشن لاتکس نسبت به الکترون میکروسکوپی دارای حساسیت و ویژگی بیشتری برای کشف روتاویروس می‌باشد (Sukara & Neuvon, 1990). از آنچه که در بالا مورد بحث قرار گرفت می‌توان استنباط نمود که آزمون الایزا در مورد روتاویروس داری حساسیت بالا (حدود ۱۰۰ درصد) و ویژگی حدود ۹۰ درصد می‌باشد و نسبت به آزمون‌های رایج الکترون میکروسکوپی، آگلوتی‌نیشن لاتکس و پلی‌آکریلامید دارای حساسیت و ویژگی بیشتری است و می‌توان آن را در بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک در گله به‌کار برد.

منابع

۱. شیمی، احمد (۱۳۷۵)، ویروس‌شناسی دامپزشکی، انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران، صفحه ۵۲۲ـ ۵۱۹.

2. Alfonso, T.M., Schiafer, D.H., & Mebus, C.A. (1985). Rotaviral coronaviral diarrhea, Food animal practice, 1 (3), 471-94

3. Chasey, D., Davies, P.(1984) Atypical rotaviruses in pigs and cattle. Veterinary Record, 114(1), 16-17

4. Hammami,S. Sawyer, M.M., Castero, A.E., Holmberg, C.A., Osburn, B.L. (1989). Detection of rotavirus in fecal samples from calves by a cell culture inddirect immunofliorescence, a tissue culture ELISA, and a commercial capture ELISA, J. Vet. Diag. Invest. 1(1) 22-73

5. Mcnulty, M.S.& Logan, E.F. (1983). Longitiudinal survey of rotavirus infection in caLves. Vet. Rec. 113 (15), 333 - 335

6. Reynolds, D.J., Chasey, D., Scatt, A.C., Bridger, J.C., (1984). Evaluation of ELISA and electron microsopy for coronavirus and rotavirus in bovine faeces. Vet. Rec. 114,397-401.

7. Radostits, O.M., Blood, D.C. & Gay, C.C. (1994). Veterinary Medicine, 8th ed., Baillier Tindall, PP 1016-1025.

8. Sukura, A. & Neuvonven, E.,(1990). Latex test for rapid rotavirus diagnosis in calves. Acta Veterinaria Scandinavica, 31(1), 1-4.

9. Thoms, C.J., Bell, M.M., Chasey, D., Chesham, J. & Roeder, P.L. (1992). Development of monoclonal antibody ELISA for Simultaneous detection of bovine coronavirus, rotavirus serotype A, and Escherichia coli-K99 antigen in Faeces of calves. Am. J. Vet. Res., 53(1), 36-43.

Evaluation of Rotavirus infection in young calves by Capture ELISA in Urmia

Morshedi A.[1]

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

An investigation was Carried out in order to detect the frequency of clinical and subclinical cases of entritis caused by rotavirus in calves up to 12 weeks of age. Commercial ELISA Rotakit was used. The resullts indicated 31 ELISA positive (26/7%) cases out of 116 faecal Samples studied. There was no significant difference in results between the sex and breed of the calves.

Key words: ELISA, Rotavirus, Entritis, Calf