مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۴، ۱۴۰۱، ۲۵۴-۲۴۷
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: 2251-6190
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

جستجوی هرپس ویروس یک گاوی در اسپرم‌های منجمد تولید ایران

فاطمه عرب‌خالقی[۱]، پژمان میرشکرایی[۲،۳]، حسام الدین سیفی[۲،۳]

[۱] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[۲] گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[۳] قطب علمی سقط جنین و مرگ و میر نوزادان نشخوارکنندگان، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۲۵ مهر ماه ۱۴۰۱، **تاریخ پذیرش:** ۲۸ آذر ماه ۱۴۰۱
10.22059/jvr.2022.345709.3284 20.1001.1.20082525.1401.77.4.6.7

چکیده

زمینهٔ مطالعه: ویروس عامل بیماری IBR (Infectious bovine rhinotracheitis) متعلق به خانواده هرپس و زیر خانواده آلفا هرپس می‌باشد (Bovine herpes virus). BHV1 عامل بیماری راینوتراکییت و سقط عفونی در گاوها است. IPV (Infectious pustular vulvovaginitis) فرم تناسلی بیماری و عفونت واژینال است که به‌وسیله پاستول و ترشحات مخاطی چرکی مشخص می‌شود. IPV متعاقب برخورد ویروس به مخاط دستگاه تناسلی توسط جفت‌گیری طبیعی یا تلقیح مصنوعی اتفاق می‌افتد و از جمله بیماری‌هایی که طی تلقیح مصنوعی می‌تواند توسط اسپرم منجمد به دام سالم منتقل شود.

هدف: آلودگی منی به ویروس یکی از راه‌های گسترش بیماری در بین گاوهای شیری است. از این رو در مطالعه حاضر سعی شد حضور ویروس در پایت‌های اسپرم تولید داخل و مصرفی گاوداری‌های صنعتی مورد ارزیابی قرار داده شد.

روش‌کار: در مطالعه حاضر ۱۴۰ عدد پایت اسپرم منجمد گاو از مراکز مربوطه خریداری شد. پس از ذوب، استخراج با استفاده از کیت استخراج ژنومی انجام گرفت. برای اطمینان از درستی روند استخراج ابتدا PCR با پرایمر ژن PRM1 انجام شد و ردیابی ژنوم ویروس نیز با استفاده از PCR انجام شد.

نتایج: در مجموع یک نمونه از ۱۴۰ نمونه پایت اسپرم مورد بررسی آلودگی به ویروس را نشان داد که پس از چند بار تکرار همگی مراحل از دو پایت مختلف و تعیین سکانس ژن، آلودگی به ویروس IBR تأیید شد.

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به وجود حتی یک مورد آلودگی در این جامعه ۱۴۰تایی و اهمیت بالای بیماری نیاز به بررسی‌ها و پایش‌های بیشتر در ارتباط با انتقال آلودگی از طریق اسپرم‌های منجمد وجود دارد.

کلمات کلیدی: اسپرم، پی سی آر، گاو، ویروس، هرپس ۱

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: پژمان میرشکرایی، گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛ قطب علمی سقط جنین و مرگ و میر نوزادان نشخوارکنندگان، مشهد، ایران

مقدمه

در کشور ایران تولیدات دامی نقش مهمی در چرخه کشاورزی دارند. ۸۰ درصد از تولید لبنیات و گوشت گاو جهان در کشورهای در حال توسعه مورد استفاده قرار می‌گیرد. این کشورها تنها ۲۱ درصد از میزان شیر و ۳۴ درصد از گوشت جهان را تولید می‌کنند؛ بنابراین افزایش تولیدات دامی در این کشورها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. کارشناسان روش‌های متنوعی از جمله تلقیح مصنوعی را برای افزایش فرآورده‌های دامی ارائه کرده‌اند. یکی از سریع‌ترین و ساده‌ترین راه‌ها برای افزایش تولید در دام تلقیح مصنوعی است. تلقیح مصنوعی به‌عنوان یک تکنیک در اصلاح نژاد دام و برای پیشگیری از انتقال و انتشار بیماری‌ها و همچنین به لحاظ بالا بودن ارزش اقتصادی و سهولت در انجام آن در سطح وسیعی در دنیای امروز مورد استفاده قرار می‌گیرد. علی‌رغم این که تلقیح مصنوعی به‌عنوان عامل پیشگیری و کنترل از بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود ولی خود بالقوه می‌تواند در

صورت عدم رعایت ضوابط بهداشتی سبب انتشار بیماری‌ها در سطح گسترده در مقایسه با جفت‌گیری طبیعی شود.

از جمله بیماری‌هایی که طی تلقیح مصنوعی می‌تواند منتقل شود بیماری IBR است (۱). بیماری IBR یک بیماری مهم برای همه گاوداران محسوب می‌شود زیرا میزان بیماریزایی آن بالا است و می‌تواند یک مانع مهم برای تجارت بین‌المللی باشد. عامل بیماری تورم عفونی بینی و نای گاو، Bovine Herpes Virus-1، یک آلفا هرپس ویروس است. هرپس ویروس عامل تضعیف‌کننده سیستم ایمنی بوده لذا زمینه را برای ایجاد عفونت‌های ثانویه فراهم می‌کند و یکی از رایج‌ترین پاتوژن‌های موجود در مایع منی گاو است (۲). گاوهای نر نقش مهمی در انتشار فرم تناسلی دارند زیرا ویروس در هر دو فاز حاد و نهفته عفونت از منی دفع می‌شود. شناسایی علائم بیماری مهم است و ممکن است همیشه در هنگام شیوع BHV1 در گاوهای نر علائم عفونت مشاهده نشود (۳). در کشورهایی با تولید لبنیات بالا و شرکت‌های تولیدی گوشت، شیوع بیماری در سطح گله‌ها ۷۰ تا ۸۵ درصد به ثبت رسیده است. BHV1 یک عفونت اندمیک در گله محسوب می‌شود که وقوع آن غیر قابل پیش‌بینی است (۴). سقط‌جنین، ناباروری در گاو، کاهش تولید، مرگ ناشی از فرم تنفسی بیماری در تمام سنین، مرگ ناشی از فرم بسیار کشنده بیماری در گوساله‌های جوان، هزینه درمان به علت عفونت‌های ثانویه باکتریایی دستگاه تنفسی، عفونت پنهان در دام‌های مولد از اثرات زیان‌بار بیماری در دام‌های آلوده است که موجب بروز مشکلات و محدودیت در تجارت ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی دام و اسپرم و ورود دام مولد به مراکز تلقیح مصنوعی می‌شود؛ بنابراین هر برنامه سلامت گاو باید دارای یک استراتژی کنترل باشد (۵). آلودگی منی به ویروس یکی از راه‌های گسترش بیماری در بین گاوهای شیری است، ازاین‌رو در طی مطالعه حاضر سعی شده است تا حضور ویروس را در اسپرم‌های منجمد تولید داخل، مصرفی گاوداری‌های صنعتی مورد بررسی قرار داده شود.

مواد و روش کار

مشخصات توصیفی نمونه‌ها: در مطالعه حاضر تعداد نمونه مورد نیاز بر پایه confidence level ۹۵ درصد، دقت ۵ درصد، جمعیت ۲۵۰ رأس و شیوع ۵۰ درصد حدود ۱۴۰ نمونه محاسبه شد. نمونه‌ها از ۴ مرکز فروش اسپرم گاو در سطح شهرستان مشهد خریداری شد که از بین آن‌ها تعداد ۳ نمونه از نژاد جرزی، ۲ نمونه نژاد براون سوئیس، ۶ نمونه مون بیلیار و بقیه هولشتاین بود. نمونه‌ها پس از خریداری درون تانک ازت قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل شد. پایت‌ها در آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد ذوب و به درون میکروتیوب تخلیه شدند. مطابق مطالب درج شده دفترچه راهنمای کیت (Exgene Genomic GeneAll.DNA Micro ساخت Germany)، از روش اتصال سیلیکا برای خالص‌سازی DNA استفاده شد. DNA استخراج شده از مایع منی به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری وارد و در دمای ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

نحوه ارزیابی مولکولی: برای ارزیابی کیفیت نمونه ۵۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده را درون کوت مخصوص دستگاه قرار داده و جذب نوری نمونه در دستگاه بایوفتومتر اپندورف در طول موج های ۲۳۰، ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ خوانده شد.

نمونه‌های DNA که نسبت A260 / A280 ۱/۷ تا ۲ و نسبت A260 / A230 بیشتر از ۱/۵ و مقدار A260 باید بین ۰/۱ تا ۱ بود به عنوان نمونه با کیفیت وارد روند PCR شد در غیر این صورت مراحل استخراج مجدد تکرار گردید.

برای اطمینان از درستی روند استخراج ابتدا آزمایش PCR با پرایمر PRM1 به‌عنوان House keeping gene انجام شد تا صحت استخراج DNA محرز شود. PRM1 ژنی است که در همه اسپرم‌ها وجود دارد. اطلاعات مربوط به پرایمرها و سایز باند مورد انتظار در جدول ۱ و برنامه‌ریزی حرارتی دستگاه ترموسایکلر در جدول ۲ آورده شده است. جهت کنترل مثبت از نمونه‌های DNA استخراج شده از جنین‌های مثبت استفاده شد. در این نمونه همگی مواد و محلول‌های مورد استفاده درون لوله ریخته شد و فقط به‌جای DNA نمونه مورد بررسی، از یک نمونه مثبت استفاده شد. برای هر بار PCR علاوه بر نمونه کنترل مثبت نمونه کنترل منفی که فاقد DNA مورد آزمایش فوق بوده اما همگی شرایط آن با بقیه نمونه‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یکسان بود، قرار داده شد. اطلاعات مربوط به پرایمرها و سایز باند مورد انتظار PCR مربوط به IBR در جدول ۱ و برنامه‌ریزی حرارتی دستگاه ترموسایکلر در جدول ۳ آورده شده است. بعد از انجام PCR، برای آشکارسازی و مشاهده محصول و نتیجه واکنش از روش الکتروفورز افقی استفاده شد.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به پرایمرها.

نام پرایمر	طول باند	توالی	Acc. No. (Gene)
PRM1	۲۷۴	رفت (۵ به ۳) CGA AGA AGA TGT CGC AGA CG	NM_174156.2 Protamine 1 (PRM1)
		برگشت (۳ به ۵) TTC AAG ATG TGG CAA GAG GGT	
IBR	۲۰۲	رفت (۵ به ۳) GCG GGC CTG GTT GCG TAC TAC	D00438 (BoHV-1 *tk* gene)
		برگشت (۳ به ۵) AGC AGA TCT TCC GCG TTG ATC	

جدول ۲. برنامه‌ریزی حرارتی دستگاه ترموسایکلر ژن PRM1.

تعداد سیکل	مدت	دما (سانتی‌گراد)	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۵	دناتوراسیون اولیه
	۳۰ ثانیه	۹۵	دناتوراسیون
۳۵	۳۰ ثانیه	۵۵	اتصال
	۳۰ ثانیه	۷۲	پیشروی
۱	۷ دقیقه	۷۲	پیشروی نهایی

آنالیز آماری: نمونه مثبت مورد آزمایش همراه نمونه‌ای که به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد جهت تعیین توالی دوطرفه به شرکت ژن فن‌آوران ارسال شد. خوانش دوطرفه نمونه کنترل مثبت و نمونه تحت آزمایش هر یک به طور جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت توالی به دست آمده از هر دو نمونه توسط نرم‌افزار EMBOSS Needle-Alignment باهم دیگر مورد مقایسه قرار گرفت. توالی نهایی با استفاده از نرم‌افزار nucleotide Blast با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن مقایسه شد.

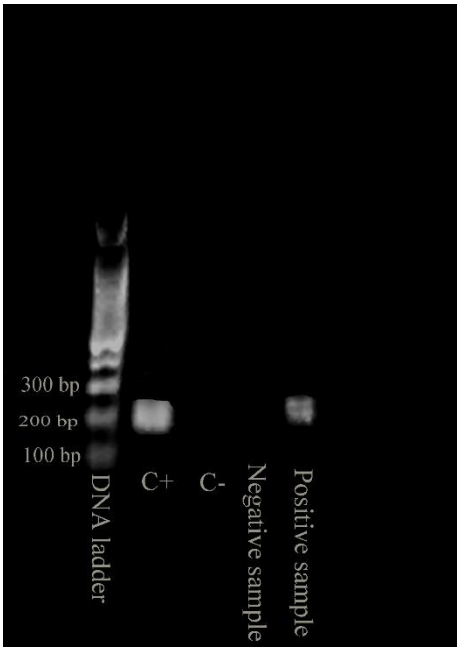
نتایج

در مطالعه حاضر ۱۴۰ نمونه پایت اسپرم منجمد در سطح شهرستان مشهد جمع‌آوری شد و اطلاعات مربوط به هر پایت و شماره آن‌ها ثبت شد. توزیع نژادی نمونه‌ها شامل ۳ نمونه از نژاد جرزی، ۲ نمونه نژاد براون سوئیس، ۶ نمونه مون بیلیار و بقیه هولشتاین بودند، پس از انجام تست کمیت و کیفیت DNA توسط بایوفوتومتر برای انجام PCR استفاده شد.

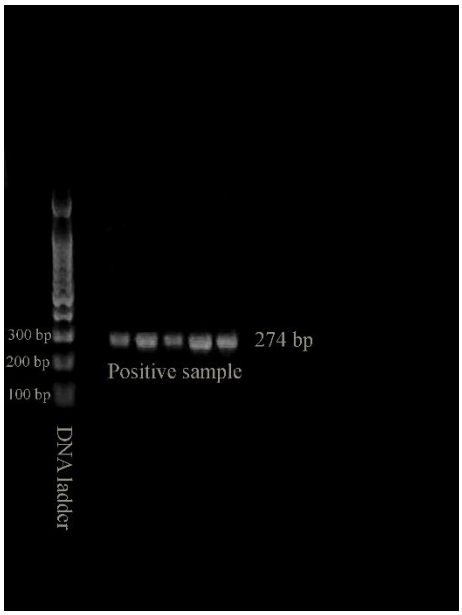
نتیجه آزمایش PCR با پرایمر PRM1 روی ژن Protamine 1 به‌عنوان house keeping gene برای هر کدام از نمونه‌ها انجام شد (تصویر ۱). برای نمونه‌هایی که فاقد باند بودند دو مرتبه از مقدار نمونه اولیه که باقی مانده بود، استخراج گذاشته شد و سپس مجدداً آزمایش PCR انجام شد. در PCR با پرایمر IBR روی ژن BoHV-1 *tk* *(thymidine kinase)* به‌عنوان نمونه کنترل مثبت از بافت کبد سقط‌جنینی که قبلاً IBR آن مثبت اعلام شده بود به همراه نمونه‌ها در شرایط یکسان DNA استخراج شد و PCR آن به همراه نمونه‌ها گذاشته شد. نمونه کنترل مثبت در محدوده ۲۰۲ bp باند ایجاد کرد. لدر مورد استفاده ۱۰۰ bp است. از بین ۱۴۰ نمونه یک نمونه از نژاد هولشتاین مطابق تصویر ۲ در محدوده ۲۰۲ bp باند داد و مثبت در نظر گرفته شد. روی DNA استخراج شده نمونه مثبت مجدد PCR صورت گرفت و همچنین استخراج مجدد از الباقی محتویات پایت انجام شد که در همگی موارد آلوده به ژنوم ویروس تشخیص داده شد. برای اطمینان بیشتر از پایت دوم همین اسپرم روند استخراج و PCR انجام شد که آن نمونه هم آلوده به ژنوم ویروس تشخیص داده شد. برای اطمینان از روند کار از ابتدا تعداد ۳ نمونه به شکل تکراری مورد ارزیابی قرار گرفتند که در همگی موارد نتایج یکسان بود. توالی نهایی با استفاده از نرم‌افزار nucleotide Blast با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن مورد مقایسه قرار گرفت. نتیجه مقایسه با بانک جهانی ژن شباهت ۱۰۰ درصد با میزان هم‌پوشانی ۱۰۰ درصد با جدایه‌های مختلف آلفا هرپس ویروس گاوی I بود. برخی از این جدایه‌ها شامل آلفا هرپس ویروس گاوی I جدایه لوس‌آنجلس (MF421714)، تگزاس (KM258882)، نیویورک (KM258880)، آمریکا (MG407775- MG407792)، هند (KY215944) است. همچنین با جدایه‌های استرالیا (KM258881) و چین (JN787955) دارای ۹۹ درصد شباهت هستند.

جدول ۳. برنامه‌ریزی حرارتی دستگاه ترموسایکلر جهت تشخیص IBR.

تعداد سیکل	مدت	دما (سانتی گراد)	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۴	دناتوراسیون اولیه
	۳۰ ثانیه	۹۴	دناتوراسیون
۴۲	۳۰ ثانیه	۵۶	اتصال
	۳۰ ثانیه	۷۲	پیشروی
۱	۷ دقیقه	۷۲	پیشروی نهایی



تصویر ۱. نتایج الکتروفورز محصول PCR ژن PRM1.



تصویر ۲. نتایج الکتروفورز محصول PCR هرپس ویروس تیپ ۱.

بحث

تولیدمثل از فاکتورهای اصلی رونق اقتصادی صنعت گاوداری است. هر عاملی که به این فاکتور لطمه وارد نماید موجب اختلال در صنعت پرورش گاو شیری شده و به‌تبع آن به اقتصاد کشور صدمه وارد می‌آورد. سقط جنین در گاوهای شیری عموماً به از بین رفتن جنین در بین روزهای ۴۲ تا ۲۶۰ آبستنی اطلاق می‌شود. علاوه بر این، ناباروری ناشی از سقط و افزایش فاصله تا آبستنی بعدی از دیگر زیان‌هایی هستند که به گله‌های مبتلا به سقط وارد می‌آیند (۶). بر پایه گزارش‌های موجود میزان شیوع سقط در گله‌های گاو شیری کمتر از ۲/۹ درصد است که عامل بروز سقط تنها در ۴۵/۸ درصد این موارد، تشخیص داده شده است (۷). ۵۰ تا ۶۵ درصد سقط‌ها عامل باکتریایی، ۲۰ تا ۲۵ درصد عامل قارچی و ۱۵ تا ۲۵ درصد علت ویروسی دارند (۸).

ویروس عامل رینوتراکئیت عفونی گاو، آلفا هرپس ویروس گاوی تیپ I است که در سراسر جهان وجود داشته و باعث بیماری تنفسی حاد به همراه تورم ملتحمه چشم می‌شود، همچنین باعث بیماری در ارگان‌های تناسلی از جمله ناباروری و سقط در تلیسه‌ها و گاوها می‌شود (۶). نظرات متفاوتی درباره نقش ویروس IBR در ناباروری وجود دارد. در مطالعات اولیه Parsonson و Helling در سال ۱۹۶۵ اظهار داشتند که ویروس در ناباروری تأثیری ندارد. در حالی که Kendrick و Mcentee در سال ۱۹۶۷ دریافتند که اگر منی آلوده به ویروس برای تلقیح مصنوعی استفاده شود، میزان آبستنی کاهش می‌یابد. به طور تجربی وقتی منی آلوده به ویروس به داخل رحم تلقیح می‌شود، باعث نکروز شدید و اندومتریت می‌شود اما جراحات در محل سایت ویروس باقی می‌ماند و طی ۱ تا ۲ هفته از بین می‌رود (۹). Hens khars و همکاران در سال ۱۹۸۶ اظهار کردند که تلقیح ویروس IBR به داخل رحم باعث اندومتریت می‌شود و به احتمال زیاد باعث ناباروری نیز می‌شود بنابراین تلقیح مصنوعی با منی آلوده مسلماً با مرگ رویانی در ارتباط است. عفونت ویروسی می‌تواند باعث یک نکروز دوطرفه تخمدانی شود و به نظر می‌رسد جسم زرد به عفونت حساس‌تر است، به خصوص در چند روز اول پس از تخمک‌گذاری این حساسیت بیشتر می‌شود، این آسیب ممکن است به طور مستقیم روی عملکرد جسم زرد تأثیر بگذارد و باعث کاهش تولید پروژسترن شود و در نتیجه بقای

جنین به خطر افتد. ویروس همچنین می‌تواند به وسیله تهاجم مستقیم به سلول‌ها باعث مرگ رویان شود (۵). Oliveira و همکاران در سال ۲۰۱۱ طی مطالعه خود ژنوم BHV-1 و BHV-5 را از نمونه‌های منی گاو به‌وسیله تکنیک species-specific nested polymerase chain reactions (nPCRs) شناسایی کردند. در آن مطالعه از ۵۳ نمونه منی تازه و ۲۳ نمونه منی منجمد گاوهای پرواری استفاده شد که در همه ۷۶ نمونه مایع منی DNA ویروس شناسایی شد. همه نمونه‌ها از نظر BHV-5 و ۳۴ مورد از نظر BHV-1 مثبت بودند (۱). Deka و همکاران در سال ۲۰۰۵، در ۲۴ نمونه منی ۱۲ گاو سرم منفی و ۱۲ گاو سرم مثبت حضور ویروس BHV1 مورد مطالعه قرار دادند. برای شناسایی DNA ویروس BHV1 از روش PCR و پرایمر ژن gI استفاده کردند. در گاوهای سرم مثبت ۵۰ درصد و در گاوهای سرم منفی ۶۶/۶۷ درصد نمونه‌ها مثبت شدند (۱۱).

Nandi و همکاران در سال ۲۰۰۸، ۱۰۳۸ نمونه منی گاو را از مزارع مختلف هند جمع‌آوری کردند و با استفاده از PCR و پرایمر اختصاصی ژن gI ویروس BHV1 را مورد مطالعه قرار دادند؛ که از این تعداد تنها ۳۰ نمونه برای ژنوم BHV1 مثبت شد. در این مطالعه مشخص شد که تکنیک PCR برخلاف روش جداسازی که حساسیت کمتر و زمان بیشتری نیاز دارد، بسیار حساس و سریع عمل می‌کند (۱۲).

در مطالعه Masri و همکاران در سال۱۹۹۶ تست PCR برای شناسایی ژنوم BHV-1 در مایع منی گاو با ایزولاسیون ویروس مقایسه شد. این روش‌ها برای شناسایی BHV1 در مایع منی ۴ گاوی که به‌صورت تجربی با ویروس آلوده شده بودند، به‌کاربرده شد. در همه گاوهای آلوده، التهاب سر قضیب در روز سوم و balanoposthitis شدید در روز چهارم پس از آلودگی مشاهده شد. ویروس در منی تازه با روش PCR و جداسازی ویروس در دومین روز از آلودگی قبل از رخداد بالینی، شناسایی شد. در روش جداسازی، تا روز ۷ پس از آلودگی در دو گاو و روز ۹ و ۱۱ در دو گاو دیگر، ویروس قابل شناسایی بود. در مقابل روش PCR توانست تا روز ۱۸-۱۴ پس از تلقیح آلودگی ژنوم ویروس را شناسایی کند. برای تشخیص انفرادی PCR، ویروس را حداقل ۱۰-۱ روز دیرتر از روش جداسازی، شناسایی می‌کند (۱).

با توجه به نتایج این مطالعات حضور ویروس و متعاقب آن شناسایی ژنوم آن توسط PCR به صورت مستمر نیست و به شکل متناوب اتفاق می‌افتد، پس امکان آلودگی ۱۳۹ نمونه دیگر در مطالعه حاضر منتفی نمی‌شود و با عنایت به مشاهده یک نمونه مثبت نیاز به بررسی‌های بیشتر روی خود گاوهای نر است.

در مطالعه انجام شده توسط Morán1 و همکاران در سال ۲۰۱۳ حضور ژنوم ویروس BHV-4, BHV-5, BHV-1 در مایع منی گاوها از مبدأ آرژانتین و مراکز بین‌المللی توسط تست PCR بررسی شد. مهم‌ترین یافته این مطالعه شناسایی ژنوم BHV-1 در مایع منی ۶ گاو از ۷۰ گاو (۸/۶ درصد) نگهداری شده در مراکز تلقیح مصنوعی بود (۲). نتایج این مطالعه نسبت به مطالعه حاضر آلودگی بیشتری را شناسایی نموده که علت آن می‌تواند بررسی بر روی انزال تازه گاوها باشد.

Isakov و همکاران در سال ۲۰۱۶، ۴۵۰ نمونه اسپرم منجمد را در مناطق مختلف اوکراین برای یک دوره بین سال‌های ۲۰۱۳ تا ۲۰۱۶ از نظر حضور گونه‌های پاتوژن کلامیدیا، مایکوپلاسما و BHV1 مورد مطالعه قرار دادند. نمونه‌ها از ۱۰ مزرعه در سراسر اوکراین جمع‌آوری شده و توسط تست PCR تشخیصی با پروتکل استاندارد NSC (national scientific center) مورد آزمایش قرار گرفتند. با توجه به آنالیز محصولات حاصل از PCR ۲ مورد از بین ۵۸ نمونه (۳/۵ درصد) از منطقه Poltava از نظر BHV1 مثبت شدند و با توجه به نتایج به دست آمده، تست PCR دائم و منظم روی اسپرم گاوهای نر را ضروری دانستند (۱۵). در مطالعه حاضر نیز میزان آلودگی ۰/۷۱ درصد بود که بسیار پایین‌تر از نتایج مطالعه فوق است. Vanessa Lopes و همکاران در سال ۲۰۲۰، به منظور ردیابی BHV1، ۶۰ نمونه خون و ارگان‌های تناسلی از ۶۰ گاو نر که واکسینه نشده بودند را مورد ارزیابی قرار دادند. قطعاتی از بیضه و اپی دیدیم به روش nested PCR و ایمونوفلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. BHV1 در روش ایمونوفلورسانس در ۹۵/۹ درصد بافت بیضه و ۱۰۰ درصد بافت اپی دیدیم مشاهده شد. در روش nested PCR، نوکلییک اسید ویروس در ۵۹/۲ درصد بافت بیضه و ۷۵/۵ در اپی دیدیم شناسایی شد. بر اساس این تشخیص BHV1 در بیضه‌ها و اپی دیدم گاوهای نر آلوده نشان دهنده منابع عفونت ویروسی برای مایع منی می‌باشند (۱۶).

Henzel و همکاران در سال ۲۰۱۹ با هدف مطالعه و بررسی آنتی بادی‌های خنثی کننده BHV1-5 در نمونه‌های سرم و شناسایی DNA ویروس در مایع منی گاوهای نر در مزارع، ۳۷۲ نمونه سرم و منی را از ۱۸ مزرعه جمع آوری کردند. نمونه‌های سرم به روش VN (virus neutralization) و نمونه‌های منی با روش PCR بررسی شدند. در روش VN آنتی بادی BHV1-5 در ۶۶/۷ درصد گاوهای نر شناسایی شد. ۲۷۸ گاو برای BHV1 و ۲۳۴ گاو برای BHV5 مثبت شدند. ۴۳ گاو نر واکسینه شده ۷۲/۱ درصد از نظر سرولوژی منفی

بودند. BHV1 DNA در منی ۳ گاو نر تشخیص داده شد. تمام موارد مثبت حیواناتی بودند که هنگام نمونه‌گیری التهاب بیضه و سایر ضایعات تناسلی را نشان دادند. در حضور ضایعات بالینی مشهود در دستگاه تناسلی هر دو ویروس ممکن است در مایعات منی یافت شود. بر اساس نتایج شیوع بالای آنتی بادی‌های ویروس در گاو نر در مزارع در حال گردش می‌باشد (۱۷).

Rania و همکاران در سال ۲۰۲۰ برای بررسی تأثیر عفونت ویروسی بر کیفیت مایع منی در گاوهای نر آلوده، مایع منی ۴۰ گاو نر را به منظور جداسازی BHV1 و BVDV جمع آوری و با روش فلورسنت آنتی بادی و real time PCR مورد ارزیابی قرار دادند و ۸ نمونه مثبت برای BHV1 ثبت شد. تحلیل آماری پارامترهای ارزیابی منی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه آلوده به ویروس و گروه شاهد وجود دارد که نشان دهنده افزایش ناهنجاری‌های اسپرم و کاهش تحرک و قابلیت زنده‌مانی و غلظت اسپرم است. با توجه به این مطالعه گاوهای نر آلوده کیفیت مایع منی بسیار پایینی دارند و روش PCR یک روش آزمایشگاهی ایده‌ال برای تشخیص هر دو ویروس در مایع منی است (۱۸).

Hammad Rehman و همکاران در سال ۲۰۲۰ نمونه‌های خون گاوهای نر جمع‌آوری شده از مناطق مختلف لاهور در پاکستان را مورد ارزیابی قرار دادند. از بین ۱۰۰ نمونه خون، در ۶۹ نمونه با استفاده از روش الایزا مثبت تشخیص داده شد. همچنین ژن گلیکو پروتئین g B با استفاده از روش PCR شناسایی شد. بر این اساس می‌توان گفت که BHV1 در پاکستان به شکل فعال وجود دارد (۱۹).

نتیجه گیری نهایی: با توجه به نتایج مطالعه حاضر وجود یک نمونه مثبت در بین ۱۴۰ مورد زنگ خطری برای گسترش بیماری از این طریق است و در بین ۱۳۹ نمونه دیگر نیز با توجه به ورود دوره‌ای ویروس به منی باید بررسی‌های دقیق‌تری انجام شود. بهتر است از گاوهای سرم منفی در مراکز تلقیح مصنوعی استفاده شود و به منظور تست‌های سرولوژیکی بیشتر از گاوها خون گرفته شود و به توصیه OIE ۲۱ روز بعد مایع منی جمع‌آوری شود. مطالعه حاضر نشان داد وجود یک آزمایشگاه مرجع برای کنترل و پایش مداوم اسپرم‌های منجمد تولید داخل و وارداتی و بررسی گاوهای تولید کننده اسپرم در ایران بسیار حائز اهمیت می‌باشد تا از گسترش بیماری‌ها به این طریق جلوگیری شود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت تأمین بودجه انجام این طرح با کد ۳/۴۳۱۸۷ قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Tri Untari YPK, Asmarani K. Detection of bovine herpesvirus 1 from semen by real-time pcr to prevent the spread of infectious bovine rhinotracheitis infection. World Vet J. 2021; 4: 709-12. doi: 10.54203/scil.2021.wvj89
2. Yu Z, Zhao Z, Chen L, Yan H, Cui Q, Ju X, et al. Development of a droplet digital PCR assay to detect bovine alphaherpesvirus 1 in bovine semen. BMC Vet Res. 2022; 18: 1-10. doi: 10.1186/s12917-022-03235-2
3. Waldeck HF, van Duijn L, Mars MH, Santman-Berends IM, Biesheuvel MM, van Schaik G. Risk factors for introduction of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) into cattle herds: A systematic european literature review. Front Vet Sci. 2021; 8: 1-10. doi: 10.3389/fvets.2021.688935 PMID: 34778424
4. Graham DA. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle–a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. Ir Vet J. 2013; 66(1): 1-12. doi: 10.1186%2F2046-0481-66-15 PMID: 23916092
5. Nettleton P, Russell G. Update on infectious bovine rhinotracheitis. In Practice. 2017; 39(6): 255-72. doi: 10.1136/inp.j2226
6. Nadri S, Zamani P, Sadeghi-Sefidmazgi A, Abdoli R, Ghazi Khani Shad A. Genetic predisposition to abortions is increasing in Iranian holstein cows. Iran J Appl Anim Sci. 2021; 11(1): 79-85. doi: 20.1001.1.2251628.2021.11.1.9.1
7. Yaeger Mj, Holler Ld. Bacterial causes of bovine infertility and abortion. In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology. 2nd ed. Elsevier Colombia, USA; 2007; p. 389-399.
8. Escamilla HP, Martínez MJJ, Medina CM, Morales SE. Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico. Can J Vet Res. 2007; 71(4): 314-317. PMID: 17955907
9. Noakes D, Parkinson T, England G. Veterinary Reproduction and Obstetrics. 10th ed. Saunders Ltd. Philadelphia, USA; 2018; p. 457-460.
10. Oliveira M, Campos F, Dias M, Velho F, Freneau G, Brito W, et al. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. Theriogenology. 2011; 75(6): 1139-45. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.025 PMID: 21247624
11. Deka D, Maiti N, Oberoi M. Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. Rev Sci Tech. 2005; 24: 1085-94. 10.20506/RST.24.3.1637 PMID: 16642777
12. Nandi S, Manohar M, Pandey A, Chauhan R. Sensitive detection of genomic DNA of BHV-1 in semen samples of

bulls by polymerase chain reaction. J Immunol Immunopathol. 2008; 10(2): 132-6.
13. Masri S, Olson W, Nguyen P, Prins S, Deregt D. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. Can J Vet Res. 1996; 60(2): 100. PMID: 8785714
14. Morán P, Favier P, Lomónaco M, Catena M, Chiapparrone ML, Odeon AC, et al. Search for the genome of bovine herpesvirus types 1, 4 and 5 in bovine semen. Open Vet J. 2013; 3(2): 126-30. PMID: 26623325
15. Isakov MM, Solodiankin OS, Bolotin VI, Gerilovych AP, Potkonjak A. PCR detection of genital infections in bull semen from different regions of ukraine, 2013-2016. Arch Vet Sci. 2016; 9(2): 63-70. doi: 10.46784/e-avm.v9i2.90
16. Queiroz-Castro VLD, Santos MR, de Azevedo-Júnior MA, da Costa EP, Alves SVP, Silva LMN, et al. Bovine alphaherpesvirus 1 (BHV1) infection in testes and epididymis from bulls from a slaughterhouse. Theriogenology. 2021; 159: 1-6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.10.001
17. Henzel A, Salla P, Mascitti A, Demoliner M, Solyman M, Lunge V, et al. Bovine alphaherpesvirus 1 and 5 in semen from bulls presenting genital lesions under field conditions in Brazil. Arq Bras Med Vet Zootec. 2019; 71: 197-203. doi: 10.1590/1678-4162-10310
18. El-Mohamady RS, Behour TS, Rawash Z. Concurrent detection of bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1 in bulls' semen and their effect on semen quality. Int J Vet Sci Med. 2020; 8(1): 106-14. doi: 10.1080/23144599.2020.1850197 PMID: 33426047
19. Rehman HU, Rabbani M, Ghafoor A, Riaz A, Awan FN, Raza S. First isolation and genetic characterization of bovine herpesvirus 1 from cattle in Pakistan. Pak Vet J. 2021; 41: 163-5. doi: 10.29261/pakvetj/2020.092

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 4, 2023
Homepage: jvr.ut.ac.ir
Online ISSN: 2251-6190
University of Tehran Press
Original Article

Search for Bovine Herpes Virus I in Iranian Frozen Semen

Fateme Arabkhaleghi[1]✉, Pezhman Mirshokraei[2,3]✉, Hesamoddin Seifi[2,3]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Mashhad, Mashhad, Iran*
[2] *Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran*
[3] *Center of Excellence in Ruminant Abortion and Neonatal Mortality, Mashhad, Iran*

10.22059/jvr.2022.345709.3284
Received: *17 October 2022,* ***Accepted:*** *19 December 2022*

Abstract

BACKGROUND: *Bovine Herpes Virus*-1 (BHV-1) belongs to the Alpha herpesviral family. The virus is the cause of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) and Bovine Abortion. In the initial infection, the virus proliferates excessively. Moreover, shedding the virus leads to conditions in the latent phase of the disease. Infectious Bovine Vulvovaginit (IPV) is the genital form of the disease that represents a genital infection and transmits via pustules and mucopurulent secretions. Exposure to the virus in genital mucosa leads to IPV infection through mating or artificial insemination and the diseases that can be transmitted to healthy livestock by frozen sperm during artificial insemination.

OBJECTIVES: Viral contamination of the semen is one of the routes to spread the disease among dairy cattle. Therefore, we investigated the presence of the virus in domestic and frozen imported semen consumed in industrial dairy cattle farms.

METHODS: In the present study, 140 frozen straws were collected. After melting each straw, 200 µl of obtained semen was used for DNA extraction, which was done directly on the semen samples and via a Genome Extraction Kit. Subsequently, to ensure the accuracy of the extraction, the PCR technique was done using PRM-1 gene primer. Tracking the viral genome was done using the PCR technique and known primers.

RESULTS: In total, one out of 140 samples was found to be virally contaminated, and IBR contamination was confirmed by repeating all the steps and determining the gene sequence.

CONCLUSIONS: It is necessary to further investigate the possibility that contamination can be transmitted via frozen semen, given that even one out of 140 samples is contaminated, and the importance of the disease.

Keywords: Bovine, Herpes 1, PCR, Sperm, Virus

Copyright © 2023. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author: Pezhman Mirshokraei, Tel/Fax: 051-38803777

How to cite this article:

Arabkhalegh F, Mirshokraei P, Seifi H. Search for Bovine Herpes Virus I in Iranian Frozen Semen. J Vet Res, 2023; 77(4): 247-254. doi: 10.22059/jvr.2022.345709.3284

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Information about primers.
Figure 1. Electrophoresis of PRM1 gene PCR product.
Figure 2. Electrophoresis of the PCR product of herpes virus type 1.