

بررسی سرم‌شناسی میزان شیوع آلودگی گاوها به BVDV با آزمون الیزا و مقایسه استفاده از الیزای شیر و سرم خون در ارومیه

دکتر احمد مرشدی^{۱*}، دکتر علیرضا محمودیان^۱، دکتر بهرام دلیرنقده^۲، دکتر جواد حاجی زاده^۳

دریافت مقاله: ۲۵ تیر ماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی: ۱۸ آذر ماه ۱۳۸۲

Serologic survey of cattle infected with BVD virus by indirect ELISA and compare the use of milk- ELISA and serum- ELISA in Urmia

Morshedi, A.,¹ Mahmoodian, A.L.,¹ Dalire Naghade, B.,² Hajizade, J.³

¹Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia - Iran. ²Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia - Iran. ³Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia - Iran.

Objective: Detecting of seropositive cattle to BVD virus by indirect ELISA using milk and serum samples from individual cows, comparing the use of milk instead of blood serum for determining the BVDV infection in cattle herds.

Design: Bovine viral diarrhoea seroprevalence survey in cattle using milk and serum ELISA by retrospective study.

Animals: One hundred and eighty eight milky cows and 45 calves 0.5-2 years old (Native and hybride) from 24 cattle herds in subord of Urmia.

Procedure: Preparing serum and skim milk for detection of anti-BVDV 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 equal or higher than 2.5 time OD of reference negative control serum and milk, considered as ELISA-positive. The data obtained from 188 matched sets of milk and serum were statistically compared with each other to determine the percentage of correlation between them.

Statistical analysis: Student's t and chi square tests.

Results: Out of 188 pairs milk and serum, 52 cases (27.65%) of milk and 59 (31.38%) of serum samples were ELISA positive. The data showed 96% correlation between the results of milk-ELISA and serum-ELISA.

Conclusion: The present study showed that milk-ELISA is well performed in compared with serum-ELISA test. However the output of milk-ELISA was 3.72% less than serum-ELISA in detection of animals infected with BVDV, but on significant differences was found between the results gained by milk-ELISA (27.65%) and serum-ELISA (31.38%) test by student's t-test. Therefore, the milk can be used instead of serum in ELISA for detection of infected herds as a screening test. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 59, 3: 227-231, 2004.*

Key words: Milk- ELISA, BVDV seroprevalence, Cattle.

Corresponding author's email:ahmad_morshedi@yahoo.com

هدف: تعیین میزان شیوع آلودگی گاوها به ویروس BVD و یافتن گله‌های سرم مثبت با الیزای غیرمستقیم با استفاده از نمونه‌های شیر و سرم، و ارزیابی استفاده از نمونه شیر به جای سرم خون.

طرح: مطالعه شیوع سرمی BVDV با استفاده از الیزای شیر و سرم خون به روش ارزیابی گذشته نگر.

حیوانات: صد و هشتاد و هشت رأس گاو شیری و ۴۵ رأس گوساله ۶ ماهه تا ۲ ساله از نژاد بومی و دورگ از ۲۴ گله در حومه ارومیه.

روش: فراهم کردن سرم خون و شیر به منظور جستجوی آنتی‌بادی ضد BVDV در شیر و سرم با آزمون الیزای غیرمستقیم. سرم‌ها به نسبت ۱:۲۵ در بافر رقیق شدند. ولی نمونه‌های شیر پس از سانتریفوژ در ۲۵۰۰ دور و جداسازی چربی آنها، بدون رقیق کردن در الیزا به کار رفتند. آن دسته از نمونه‌های سرم و شیر که OD آنها مساوی یا بزرگتر از ۲/۵ برابر OD مربوط به سرم و شیر کنترل منفی (شاهد منفی) بود به عنوان الیزا- مثبت در نظر گرفته شدند. داده‌های به دست آمده از ۱۸۸ جفت نمونه شیر و سرم به منظور تعیین درصد همخوانی بین آنها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمون استودنت تی و مربع کای.

نتایج: از ۱۸۸ جفت نمونه شیر و سرم مربوط به گاوهای ماده شیری، ۵۹ مورد (۳۱/۳۸ درصد) الیزا- مثبت از سرم و ۵۲ مورد (۲۷/۶۵ درصد) الیزا- مثبت از نمونه‌های شیر به دست آمد. همچنین از ۴۵ نمونه سرم گوساله ۰/۵ تا ۲ ساله ۲۰ درصد سرم مثبت در برابر BVDV مشاهده گردید. درصد فراوانی حیوانات سرم مثبت در گروهای سنی بزرگتر از ۲ تا ۵ سال ۲۷/۶۱ درصد و در بزرگتر از ۵ سال ۳۶/۱۴ درصد به دست آمد. در این مطالعه فراوانی گله‌های آلوده ۸۰ درصد برآورد شد. نتایج همچنین نشان داد که بین داده‌های الیزای شیر و سرم ۹۶ درصد همخوانی وجود دارد.

نتیجه گیری: با توجه به یافته‌های آزمون الیزای شیر و سرم خون، میانگین آلودگی به BVDV در سه گروه سنی مختلف ۲۹/۱۸ درصد به دست آمد. با توجه به اینکه ۸۰ درصد از گله‌ها دارای حیوان سرم مثبت بودند، می‌توان به گسترش چشمگیر آلودگی در ارومیه پی برد. هر چند بازده الیزای شیر در کشف حیوانات سرم مثبت ۳/۷۲ درصد کمتر از الیزای سرم بود، لکن اختلاف معنی‌دار آماری با سطح اطمینان ۹۵ درصد بین نتایج به دست آمده از الیزای شیر (۲۷/۶۵ درصد) و الیزای سرم (۳۱/۳۸ درصد) مشاهده نگردید. از این رو می‌توان از شیر به جای سرم خون برای یافتن گله‌های آلوده و تعیین درصد آلودگی گاوها به BVDV در آزمون الیزا به عنوان یک تست غربالی استفاده نمود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۹، شماره ۳، ۲۲۷-۲۳۱.

واژه‌های کلیدی: الیزای شیر، آلودگی به BVDV، گاو.

(۱) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - تهران.

(۲) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - تهران.

(۳) دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - تهران.

(* نویسنده مسؤول ahmad_morshedi@yahoo.com



در حومه ارومیه انجام شد، سرم آنها جدا و تا هنگام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می گردید.

نمونه شیر از هر گاو از یک کار تیه به میزان ۸-۷ میلی لیتر گرفته و پس از سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه و حذف چربی آنها در ۲۰- درجه سانتیگراد گذاشته می شد. پرسش نامه برای هر نمونه شامل: تاریخ، نام روستا و صاحب دام، سن حیوان، تعداد زایش، سابقه نواقص مادرزادی، سقط و ناباروری در گله، در هنگام نمونه برداری ثبت می شد. برای اندازه گیری پادتن ضد BVDV در سرم و شیر از کیت الایزای غیرمستقیم به نام Svanovir BVDV Kit ساخت Svanova Biotech, Sweden استفاده شد.

روش کار

۱۰۰ میکرولیتر از نمونه شیر و ۱۰۰ میکرولیتر نمونه سرم به رقت ۱:۲۵ به صورت Duplicate در دو حفره مجاور هم که یکی حاوی آنتی ژن BVDV و دیگری حاوی آنتی ژن کنترل (فاقد BVDV) بود، ریخته شد چهار حفره از آخرین ردیف پلیت جهت سرم منفی و مثبت رفرنس و چهار حفره نیز به شیر منفی و مثبت رفرنس اختصاص یافت. پس از یکساعت نگهداری در ۳۷ درجه و ۳ بار شستشو ۱۰۰ میکرولیتر از کنژوگه پراکسیداز به هر حفره ریخته و پس از یکساعت نگهداری در ۳۷ درجه و ۳ بار شستشو به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا ریخته و حدود ۱۵ دقیقه در حرارت اتاق گذاشته شد. پس از مشاهده تغییر رنگ بلافاصله ۵۰ میکرولیتر ماده متوقف کننده به هر حفره اضافه و OD آنها (Optical Density) در ۴۵۰ نانومتر خوانده و ثبت گردید. ارزش ΔOD نمونه‌ها و رفرنس‌ها با کسر OD حفره کنترل آنتی ژن از OD حفره حاوی آنتی ژن محاسبه گردید. در این تحقیق نمونه‌های شیر و سرم که ارزش ΔOD آنها مساوی یا بزرگتر از ۲/۵ برابر ΔOD سرم منفی رفرنس بود، مثبت در نظر گرفته شدند (۷).

نتایج

از ۱۸۸ نمونه سرم، ۵۹ مورد (۳۱/۳۸ درصد) و از نمونه شیر، ۵۲ مورد (۲۷/۶۵ درصد) الایزا مثبت به دست آمد. لکن تمام جفت نمونه‌های سرم - الایزا منفی در آزمون شیر - الایزا هم منفی شدند. با توجه به نتایج به دست آمده الایزای سرم توانست فقط ۳/۷۲ درصد بیش از الایزای شیر موارد پادتن مثبت را در گله پیدا نماید. از سوی دیگر از ۴۵ نمونه سرم گوساله ۹ مورد (۲۰ درصد) الایزا مثبت به دست آمد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در سه گروه سنی ۶ ماهه تا ۲ سال، ۲ تا ۵ سال و بالای ۵ سال درصد فراوانی حیوانات سرم مثبت را به ترتیب ۲۰ درصد، ۲۷/۶۱ درصد و ۳۶/۱۴ درصد (جدول ۲)، و به تفکیک فصل، در تابستان ۲۸/۱۵ درصد، در پاییز ۳۰ درصد و در زمستان نیز ۳۰ درصد (جدول ۳) نشان داد. همچنین درصد فراوانی آلودگی به BVDV در گله‌هایی که سابقه سقط جنین، نواقص مادرزادی و یا ناباروری داشتند ۳۲/۳۲ درصد و در گله‌هایی که نداشتند ۲۵ درصد (جدول ۴) به دست آمد.

اسهال ویروسی گاو ("Bovine viral Diarrhea "BVD") با دخالت یک بستی ویروس به نام BVDV ایجاد می شود. این بیماری گرچه دارای مرگ و میر پایین است، ولی خسارات اقتصادی فراوانی از جمله کاهش تولید شیر و کاهش رشد، سقط جنین و ناهنجاریهای مادرزادی و غیره به گله‌های آلوده وارد می سازد (۱۶). علاوه بر این گزارشهایی وجود دارند که آلودگی گوساله‌ها با این ویروس می تواند سبب سرکوب ایمنی شود و بیماریهای عفونی دیگر را گسترش دهد. با توجه به اینکه ویروس عامل BVD در سلولهای سیستم ایمنی بویژه لنفوسیت ها تکثیر و سبب تخریب آنها می شود، می توان نتیجه گرفت که ویروس قادر است سرکوب ایمنی را به دلیل کاهش لنفوتیدی و نوتروپنی باعث گردد (۱۵). براساس بررسیهای سرولوژیک متعددی که در کشورهای پیشرفته صورت گرفته ۸۰-۶۰ درصد گوساله‌های بالای یکسال از نظر آنتی بادی های خنثی کننده ویروس، مثبت بوده اند. ابتلای طبیعی و حیوانات ویرمیک دفع کننده ویروس، مسؤول ایجاد حیوانات سرم مثبت هستند (۴). از طرفی گاووان با عفونت پایدار ("PI" Persistent infection) و بدون علائم که یکی از عوامل مهم آلودگی جنین به ویروس BVD هستند، با دفع مقادیر زیادی ویروس از ترشحات خود به عنوان منشا اصلی ویروس در گله و انتقال عفونت به گوساله عمل می کنند (۱۱). در گاووان PI، ایمونوتولرنس نسبت به ویروس BVD غیر سایتوپاتیک ایجاد می شود، بنابراین در صورت آلودگی با ویروس سایتوپاتیک می توانند پاسخ ایمنی برقرار نمایند، بدین دلیل حیوانات PI می توانند در برابر BVDV سرم مثبت نیز باشند (۶،۸). تشخیص سرولوژیکی این نوع دامها به علت وجود مقادیر کم پادتن در سرم، که خود به دلیل ایجاد تحمل ایمنی در برابر ویروس غیر سایتوپاتیک می باشد، با آزمونهای سرولوژیک رایج در BVD، نظیر خنثی سازی ویروس، ثبوت کمپلمان و رسوب در ژل امکانپذیر نمی باشد. از این رو استفاده از آزمونهای غربالی سرولوژی با حساسیت بالا به منظور پی بردن به گله‌های آلوده و تعیین درصد دامهای سرم مثبت و منفی جهت کنترل و پیشگیری از این بیماری دارای اهمیت است. آزمون الایزای غیرمستقیم به طور وسیعی جهت تعیین موارد مثبت سرمی و اندازه گیری آنتی بادی ضد BVDV در سرم به منظور تعیین میزان آلودگی به ویروس BVD به کار رفته است (۴،۷،۹،۱۰). همچنین جستجوی آنتی بادی ضد BVDV در شیر گاووان با آزمون الایزا (Milk-ELISA) چه به صورت شیر انفرادی و چه به صورت شیر فله (Bulk tank milk) مورد استفاده قرار گرفته است (۵،۱۲،۱۴). هدف از مطالعه حاضر، بررسی میزان آلودگی به BVDV با استفاده از نمونه سرم و شیر انفرادی گاووا از گله‌های متعدد با آزمون الایزای غیرمستقیم و مقایسه نتایج حاصل از الایزای شیر و سرم و ارزیابی الایزای شیر بوده است.

مواد و روش کار

در این مطالعه نمونه برداری از گاو و گوساله در طول فصول تابستان، پاییز و زمستان سال ۱۳۸۰ انجام گرفت. خونگیری از گاووان بالای ۲ سال و نیز از گوساله‌های ۵/۰ تا ۲ ساله بومی و دورگ به روش تصادفی از ۲۴ گله



جدول ۱- میزان فراوانی جفت نمونه‌های شیر و سرم الیزا مثبت بر حسب میزان آنتی‌بادی (OD) آنها در ۵۹ نمونه سرم مثبت

تعداد نمونه (درصد فراوانی)	میانگین ΔOD سرم - الیزا	میانگین ΔOD شیر - الیزا	نتایج سرم - الیزا	نتایج شیر - الیزا
۱۲ (۲۰/۳۳)	۱/۴۵۰	۰/۹۱۵	+	+
۸ (۱۳/۳۵)	۱/۱۲۵	۰/۸۲۵	+	+
۱۵ (۲۵/۴۲)	۰/۹۲۵	۰/۶۷۵	+	+
۵ (۸/۴۷)	۰/۸۴۰	۰/۶۱۵	+	+
۱۲ (۲۰/۳۳)	۰/۶۱۵	۰/۵۱۲	+	+
۷ (۱۱/۸۶)	۰/۴۹۵	۰/۳۴۰	+	+

جدول ۲- درصد فراوانی آلودگی گاوها به ویروس BVD به تفکیک گروه سنی در ارومیه

گروه سنی به سال	تعداد نمونه	تعداد الیزا مثبت	درصد فراوانی سرم مثبت
۰/۵-۲	۴۵	۹	۲۰
> ۲-۵	۱۰۵	۲۹	۲۷/۶۱
> ۵	۸۳	۳۰	۳۶/۱۴
جمع کل	۲۳۳	۶۸	۲۹/۱۸ میانگین

کارگر مؤخر و همکاران در سال ۱۳۴۷ در یک بررسی در اطراف تهران میزان آلودگی به BVDV را در گاوهای کشتارگاه، به روش VNT حدود ۵۸ درصد و در گله‌های صنعتی که درگیر با بیماری در یک همه‌گیری بودند وجود پادتن را در ۱۰۰ درصد حیوانات یافتند (۲).

در مطالعه حاضر با استفاده از الیزای غیرمستقیم جمعاً ۲۳۳ نمونه سرم گاو و گوساله و ۱۸۸ نمونه شیر جهت پی بردن به میزان آلودگی به BVDV مورد آزمایش قرار گرفت و میانگین شیوع سرمی ۲۹/۱۸ درصد در ارومیه به دست آمد (جدول ۲). با توجه به اینکه حدود ۸۰ درصد از گله‌ها آلودگی را نشان دادند می‌توان به گسترش چشمگیر آلودگی پی برد. همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده، فراوانترین درصد آلودگی (۳۶/۱۴ درصد) در گروه سنی بزرگتر از ۵ سال و کمترین میزان آلودگی (۲۰ درصد) مربوط به گروه سنی ۶ ماهه تا ۲ سال می‌باشد. تجزیه و تحلیل آماری به روش مربع کای ارتباط معنی‌داری بین بالا رفتن سن و افزایش میزان آلودگی در گله نشان داد. در این مطالعه گوساله‌های بالاتر از شش ماه مورد آزمایش سرمی قرار گرفتند تا اینکه پادتن‌های مادری منتقله از آغوز از بین بروند. از این رو درصد کمی از آلودگی که مربوط به جمعیت گوساله‌های زیر شش ماه بود ناچاراً در مطالعه منظور نشده است. همچنین نظر به اینکه در این تحقیق فقط از گاوان ماده نمونه‌برداری انجام شد (جهت مقایسه شیر و سرم) درصدی از آلودگی که مربوط به جمعیت گاوهای نر بود نیز خودبه‌خود حذف گردید. بنابراین فراوانی شیوع سرمی به دست آمده در این مطالعه مربوط به جمعیت گاوهای شیری و گوساله‌های نر و ماده بالای شش ماه می‌باشد.

ویروس BVD به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده نواقص مادرزادی و سقط جنین و ناباروری نیز به حساب آمده (۶). در این بررسی طرح یافتن یک رابطه علیتی بین سابقه سقط جنین و یا ناباروری در گله و فراوانی آلودگی به BVDV ریخته شد و همان طور که نتایج آن در جدول ۴ نشان می‌دهد، درصد فراوانی آلودگی در گله‌هایی که سابقه سقط جنین و یا ناباروری داشتند به طور چشمگیری بیش از گله‌هایی که فاقد سابقه موارد فوق بودند (۳۲/۳۲ درصد در برابر ۲۵ درصد) مشاهده گردید.

در تجزیه و تحلیل آماری با به کار بردن آزمون استودنت تی با سطح اطمینان ۹۵ درصد، اختلاف معنی‌دار بین سابقه سقط یا ناباروری و فراوانی آلودگی در گله وجود داشت. اگر چه در برخی متون دامپزشکی به افزایش محسوس این بیماری در فصل زمستان اشاره شده است (۴)، لکن در مطالعه حاضر همان طور که نتایج در جدول ۲ آمده، با استفاده از آزمون مربع کای، بین درصد آلودگی و فصل اختلاف چشمگیر آماری مشاهده نگردید.

در این تحقیق ΔOD شیر رفرنس منفی ۰/۱۵۰ و ΔOD سرم منفی رفرنس ۰/۱۷۰ به دست آمد. بر این اساس نمونه‌های شیر که ΔOD آنها مساوی یا بزرگتر از ۰/۳۷۵ و نمونه‌های سرم که ΔOD آنها مساوی یا بزرگتر از ۰/۴۲۵ بود، مثبت به حساب آمدند. مقایسه داده‌های به دست آمده از الیزای شیر با الیزای سرم، ۹۶ درصد همخوانی بین نتایج را نشان داد. همچنین بررسی نتایج داده‌ها در مورد ۵۲ جفت نمونه سرم و شیر که هم در سرم الیزا و هم در شیر الیزا مثبت بودند، نشان داد که عیار پادتن در نمونه‌های شیر پایینتر از سرم هم‌ارز خود بود. به طوری که ΔOD های به دست آمده از سرم‌های الیزا مثبت بین ۰/۴۳۰ تا ۱/۵۵۰ و ΔOD های به دست آمده از نمونه‌های شیر الیزا مثبت بین ۰/۳۷۵ تا ۰/۹۲۵ متغیر بودند. فراوانترین تیتراژ پادتن ضد BVDV با ΔOD برابر ۰/۹۲۵ بود که ۱۵ نمونه دارای این عیار بودند (جدول ۱). همچنین میزان گله‌های آلوده به BVDV، ۸۰ درصد تخمین زده شد.

بحث

بررسی آلودگی با ویروس BVD در گاوها به علت پنهان بودن چهره بالینی بیماری و ظاهر شدن آن به صورت تحت بالینی بیشتر متکی به روش‌های سرم‌شناسی نظیر آزمون خنثی‌سازی ویروس، روش ایمونوفلورسنس، روش ایمونوپراکسیداز و بالاخره الیزای غیرمستقیم برای جستجوی پادتن در شیر و سرم، و نیز الیزای جذبی (Capture ELISA) جهت جستجوی آنتی‌ژن ویروس در بافی کوت بویژه برای یافتن حیوانات PI می‌باشد.

وجود این بیماری در اکثر استانهای کشور در سالهای اخیر توسط محققین با روش‌های سرم‌شناسی و جدا کردن ویروس از غدد لنفاوی گزارش شده است. در بررسی صدیقی‌نژاد در سال ۱۳۷۵ بالاترین میزان آلودگی در استان چهارمحال و بختیاری (با حدود ۹۰ درصد آلودگی) و پایینترین آن در بوشهر با ۲۲ درصد سرم مثبت به روش الیزا گزارش شده است. در همین بررسی میزان آلودگی گاوها در استان آذربایجان غربی را حدود ۶۸ درصد اعلام کردند (۱). در تحقیق دیگری که توسط همت‌زاده و همکاران در سال ۱۳۷۸ در چهارمحال و بختیاری با آزمون Virus neutralization test (VNT) انجام شد، متوسط آلودگی را حدود ۲۳ درصد به دست آوردند. آنها همچنین در تحقیق خود نشان دادند که ارتباط معنی‌داری بین افزایش سن و افزایش میزان آلودگی وجود دارد، لکن اختلاف معنی‌داری بین سابقه واکسن زدن علیه بیماریهای معمول و شیوع آلودگی به BVDV نیافتند (۳).



جدول ۳- درصد فراوانی آلودگی به BVDV به تفکیک فصل در ارومیه

فصل	تعداد نمونه	تعداد الیزا مثبت	درصد فراوانی سرم مثبت
تابستان	۱۰۳	۲۹	۲۸/۱۵
پاییز	۸۰	۲۴	۳۰
زمستان	۵۰	۱۵	۳۰
جمع کل	۲۳۳	۶۸	۲۹/۱۸ میانگین

جدول ۴- درصد فراوانی آلودگی گاوان به BVDV در گله‌هایی که سابقه سقط جنین و یا نابرووری داشته‌اند در مقایسه با گله‌هایی که چنین سابقه‌ای نداشته‌اند.

سابقه سقط جنین و یا نابرووری در گله	تعداد گله	تعداد نمونه	تعداد الیزا مثبت	درصد الیزا مثبت
وجود داشته	۱۰	۱۰۵	۳۶	۳۴/۲۸
وجود نداشته	۱۴	۱۲۸	۳۲	۲۴/۴۲
جمع کل	۲۴	۲۳۳	۶۸	۲۹/۱۸ میانگین

References

۱. صدیقی‌نژاد، س. (۱۳۷۵): بررسی اسهال ویروسی گاو/ بیماری مخاطی در ایران، پژوهش و سازندگی شماره ۳۰، صفحه: ۱۳۱-۱۲۸.
۲. کارگر مؤخر، ر.، اهورایی، پ.، حسامی، م.، تقی پوربازرگانی، ت.، غلامی، م.، خدمتی، ک.، قابوسی، ب. و جهانگیری، م. (۱۳۷۴): گزارش وجود میزان شیوع بیماری BVD/MD در گاو‌داریهای اطراف تهران. پژوهش و سازندگی، شماره ۲۸، صفحه: ۱۱۶-۱۱۲.
۳. همت‌زاده، ف.، کجوری، غ.، کارگر مؤخر، ر. و روحانی، م. (۱۳۸۰): بررسی سرمی بیماری اسهال ویروسی گاوان در استان چهارمحال و بختیاری، مجله دانشکده دامپزشکی تهران، دوره ۵۶، شماره ۳، صفحه: ۹۲-۸۵.
4. Baker, J.C. (1995): The clinical manifestation of Bovine Viral Diarrhea infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11: 425-446.
5. Beaudreau, F., Belloce, C., Seegers, H., Assie, S., pourguier, P. and Joly, A. (2001): Informative value of an indirect ELISA for the detection of BVDV antibodies in milk. *J. Vet. Med.* B48: 705-712.
6. Bradford, P. Smith. (2002): *Large Animal Internal Medicine*, 3rd ed. Mosby. Inc. London. PP: 707-714.
7. Durham, P.J.K. and Hassard, L.E. (1990): An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 22:1-10.
8. Houe, H., Baker, J.C. and Maes, R.K. (1995): Prevalence of cattle persistently infection with BVDV in 20 dairy herds in two parties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody- positive cattle among herds with different infection and vaccination status. *J. Vet. Diag. Invest.* 7: 321-326.
9. Justewics, D.M., Magar, R., Marsolais, G. and Locomte, J. (1987): Bovine viral diarrhoea virus infected MDBK monolayer as antigen in ELISA for the measurement of antibodies in bovine sera, *Vet. Immunol. Immuno pathol.* 14: 377-384.
10. Kramps, J.A., Van Maanm, C., Vande wetering, G., Quak, S., Brinkof, J. and Nylin, B. (1999): A simple, rapid and reliable ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus specific antibody in cattle serum, plasma and bulk milk. *Vet. Microbiol.* 64: 135-144.

Niscanen و همکاران در سال ۱۹۸۹ ارتباط خوبی بین نتایج الیزای سرم و الیزای شیر یافتند. لکن نشان دادند که عیار آنتی‌بادی در شیر پایبتر از سرم خون می‌باشد. با استفاده از الیزای شیر به صورت انفرادی و گله‌ای (Bulk milk) در غرب فرانسه، حساسیت الیزا را در مقایسه با VNT ۹۵ درصد و ویژگی آنرا ۹۷/۷ درصد گزارش کردند (۵). در انگلستان و ولز با بررسی نمونه شیر ۳۴۱ گله غیرواکسینه به روش الیزا میزان آلودگی گله‌ها را ۹۵ درصد برآورد کردند (۱۴). همچنین در سوئد میزان آلودگی گله‌ها به BVDV با استفاده از شیر فله به روش الیزا ۸۳ درصد گزارش شد (۱۳).

در تحقیق حاضر، با توجه به اینکه الیزای شیر فقط ۳/۷۲ درصد کمتر از الیزای سرم توانست موارد مثبت را پیدا کند، ولی با استفاده از آزمونهای آماری استودنت تی و مربع کای با سطح اطمینان ۹۵ درصد اختلاف معنی دار آماری بین درصد موارد الیزا مثبت شیر (۲۷/۶۵ درصد) و سرم خون (۳۱/۳۸ درصد) مشاهده نگردید و از طرفی بین نتایج به دست آمده از سرم- الیزا و شیر- الیزا ۹۶ درصد همخوانی وجود داشت. از اینرو نشان داده شد که به راحتی می‌توان نمونه‌های شیر را به جای سرم خون در آزمون الیزا جهت تعیین وضعیت آلودگی گله به BVDV، به کار برد. تنها نکته قابل گفتن آن است که گرچه تیتراژ آنتی‌بادی در شیر در اکثر نمونه‌ها پایبتر از سرم بود، ولی مقدار آنتی‌بادی در نمونه‌های مثبت به آن اندازه بود که OD به دست آمده از آن مساوی یا بزرگتر از ۲/۵ برابر OD شیر رفرنس منفی باشد. از طرف دیگر نظر به اینکه حدود ۱۰ درصد از گاوان سرم مثبت، حیوانات PI هستند و شیوع گاوان PI در گله‌های آلوده بین ۱ تا ۴ درصد گزارش شده است (۱۷). به احتمال زیاد در تحقیق حاضر نیز ۷ نمونه شیر الیزا منفی که سرم- الیزا مثبت بودند، به علت پایبند بودن آنتی‌بادی در شیر گاوهای PI بوده است. با توجه به نتایج مطالعات ذکر شده می‌توان گفت که الیزای شیر با آزمون VNT، که تست استاندارد است برابری دارد (۷) و نتیجه‌گیری می‌شود که الیزای شیر می‌تواند به عنوان یک تست غربالی در تعیین آلودگی گله به BVDV به کار رود و دیگر اینکه در بررسیهای شیوع سرمی در مقیاس بالا نسبت به سرم خون ارجحیت داشته، زیرا نمونه‌برداری آن آسانتر است.



11. Moenning, V., Leder, L., Grieser-wilke, I., Fray, H.R. and Liess, B. (1991): A new enzyme immunoassay for the detection of antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *Tierarztliche paraxis*. 19: 35-38.
12. Niskanen, R., Alenius, S., Larsson, B. and Juntti, N. (1989): Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in milk. *J. Vet. Med. B* 36: 113-118.
13. Niskanen, R. (1993): Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Record*. 133: 341-344.
14. Paton, D.J., Christiansen, K.H., Alenius, S., Cranwell, M.P. and Derw, T.W. (1998): Pervallence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk in England & Wales. *Vet. Record*. 142: 385-391.
15. Potfieter, L.N.D. (1995): Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11 (3): 501-520.
16. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Blood, D.C. and Hinchcliff, K.W. (2000): *Veterinary Medicine*, 9th ed. W.B. Saunders Co. London. PP: 1085-1105.
17. Salikim, J.T., Juchzermier, R. and Dubovi, E. J. (2000): Evaluation of a new sandwich ELISA kit using serum for detection of cattle persistently infected with BVD virus. *Annual NY Academic Science*. 916: 358-363.



