DOI: 10.22092/vj.2017.109696.1277 شماره ۱۱۷ زمستان ۱۳۹۶

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی استفاده از روش دات–الیزای سه‌گانه برای تشخیص هم‌زمان *نئوسپورا کانینوم*، BVD و IBR

• **صدف کامکار صالحی**
گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز
• **مهدی نام‌آوری (نویسنده مسئول)**
موسسه تحقیقات سرم و واکسن‌سازی رازی، شعبه شیراز،
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
تاریخ دریافت: ۰۲-۱۲-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۰۶-۰۳-۱۳۹۶
Email: namavari@yahoo.com

چکیده

سه عامل بیماری‌زای نئوسپورا کانینوم (*Neospora caninum*)، رینوتراکئیت گاوی (IBR) و اسهال ویروسی گاوی (BVD)، از مهم‌ترین عوامل عفونی بروز سقط جنین در گاو در جهان هستند. جهت تشخیص این عفونت‌ها از روش الیزا استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه طراحی تست تشخیصی بود که قادر به شناسایی راحت و هم‌زمان این عوامل عفونی باشد. بدین منظور نمونه‌های سرم از ۱۸۴ گاو با سابقه سقط در یک سال گذشته در مناطق شمال فارس جمع‌آوری گردید سپس نمونه‌ها با استفاده از کیت‌های تجاری الیزا و روش الیزای نقطه‌ای چندگانه ارزیابی گردید. نتایج بدست آمده از کیت تجاری نشان داد که میزان موارد مثبت برای سه عامل عفونی مورد مطالعه به ترتیب ۳۲ درصد برای نئوسپورا کانینوم، ۹۸,۲ درصد برای IBR و ۶۴,۱ درصد برای BVDV می‌باشد در حالی که نتایج مثبت با استفاده از روش الیزای نقطه‌ای برای همین سه مورد به ترتیب ۲۹,۳ درصد، ۹۳,۵ درصد و ۷۹,۳ درصد است. با استفاده از روش آماری کاپا توافق این دو روش برای تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم، ویروس IBR و ویروس BVDV در حد مناسب تا خیلی خوب ارزیابی گردید. همچنین نتایج آماری مک‌نمار نشان داد که بین دو روش برای هیچ‌کدام از عوامل مورد نظر در این پژوهش تفاوت معناداری وجود ندارد. با توجه به نتایج این مطالعه مشخص شد که کیت الیزای نقطه‌ای چندگانه، می‌تواند به عنوان روشی ساده و مقرون به صرفه جهت تشخیص هم‌زمان سه عامل مهم سقط در گاو مورد استفاده قرار گیرد. این مطالعه گامی نخست در طراحی یک کیت چندگانه برای تشخیص عوامل عفونتی سقط در گاو برای اولین بار در جهان می‌باشد و می‌تواند در آینده با انجام مطالعات تکمیلی به عنوان یک کیت تجاری معرفی گردد.

کلمات کلیدی: الیزای نقطه‌ای چندگانه، الیزا، نئوسپورا کانینوم، رینوتراکئیت گاوی، ویروس اسهال گاوی

● Veterinary Researches & Biological Products No 117 pp: 134-140.

Study of using the triple Dot-ELISA for simultaneous diagnosis of *Neospora caninum*, IBR and BVDV

By: Kamkar Salehi, S., Department of Biochemical Islamic Azad University, Branch Shiraz, Iran. and Namavari, M., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz , Iran.

Email: namavari@yahoo.com

Received: 2017-02-20 **Accepted: 2017-05-27**

The major agents cause abortion in cattle are *Neospora caninum*, Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), and Bovine Viral Diarrhea (BVD). These infection agents cause reproductive disorders which can lead in economic loss in dairy and beef herds. Serological test including ELISA are calculated as the best diagnostic ways for *Neospora caninum,* IBR, and BVD. The aim of this study was to develop a multiplex Dot-ELISA kit for simultaneous detecting of three abortion agents: *Neospora caninum*, IBR, and BVD. The blood samples were collected from 184 cows with a history of abortion in the northern of Fars province. Sera were analyzed by Multiplex Dot-ELISA and commercial ELISA kits, and the results were compared to each other. The commercial kit showed 32%, 98,9% and 64.1% positive results for *Neospora caninum,* IBR, and BVD, respectively. On the other hand, positive results for Multiplex Dot-ELISA showed 29.3%, 93.5% and 79.3% for these agents. Kappa agreement assessment demonstrated that appropriate agreement between multiplex Dot-ELISA results and ELISA kits, and McNemar test showed that both methods have the same efficacy for the identification of these abortion agents. The results of this study revealed that multiple Dot-ELISA kit, could be a simple and economical method for the simultaneous detection of three abortion agents in cattle. This experimentally kit is designed as the first step in designing a multiple kit for the diagnosis of infections in cows which could be introduced with complementary studies as a commercial kit in the future.

Key words: Multiplex Dot-ELISA, ELISA, *Neospora caninum*, IBR , BVD

مقدمه

سه عامل عفونی انگل نئوسپورا کانینوم[1] ویروس رینوتراکئیست گاوی[2](IBR) و ویروس ویروس اسهال گاوی[3] (BVD) از مهمترین عوامل سقط در گاوهای شیری و گوشتی می‌باشند (۱۶ ,۶،۱). نئوسپورا کانینوم موجب بیماری نئوسپوروزیس در گاو می‌شود که بیشتر در گله‌های شیری بیماری‌زاست ولی در گله‌های گوشتی نیز می‌تواند موجب آلودگی و سقط شود. این تک‌یاخته یکی از عوامل شایع سقط جنین در گاو در سراسر جهان می‌باشد (۶). عامل ویروسی اسهال گاو BVD از خانواده پستی ویروس است. BVD معمولا ایجاد بیماری‌های ملایمی در گله می‌کند ولی آلوده شدن جنین گاو می‌تواند منجر به مرگ و سقط جنین گردد (۳). آلودگی به IBR که هرپس ویروس است موجب بروز طوفان‌های سقط در گله‌های گاو می‌شود به طوری که در مواردی تا ۶۰ درصد از گزارشات سقط در گله‌ها با آلودگی به این ویروس مرتبط است (۲۶ , ۱۶).

روش الیزا به عنوان روشی حساس و دقیق برای بررسی سرولوژیک عفونت‌های نئوسپورا کانینوم IBR و BVD استفاده محسوب می‌گردد (۹,۱۴,۱۷,۱۸) با این وجود مشکلاتی مانند زمان‌بر بودن آزمایش، نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی مناسب و پرسنل فنی آموزش دیده، استفاده از این روش را محدود می‌کند. روش ایمونواسی رنگی یا دات الیزا روشی مقرون به صرفه، سریع و ساده است که نیاز به داشتن تجهیزات پیشرفته و پرسنل فنی آموزش دیده را مرتفع می‌سازد؛ علاوه بر این، مواد تشکیل‌دهنده این آزمایش نیازی به دمای یخچال نداشته و در بسیاری از موارد تشخیص میدانی بیماری‌های دام، دارای کاربرد فراوانی می‌باشد (۳,۴,۲۱) .

پیش از این روش الیزای نقطه‌ای برای تشخیص این سه عامل مهم سقط به صورت جداگانه استفاده شده است (۱۲,۲۰,۲۵)، اما تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از این روش برای تشخیص هم‌زمان این عوامل عفونی سقط منتشر نشده است. در این مطالعه، روش الیزای نقطه‌ای جهت طراحی کیت تشخیصی برای سه عامل بیماری‌زای سقط جنین گاوی، یعنی نئوسپورا کانینوم IBR و BVD به کار گرفته شد و از این روش به صورت چندگانه برای اولین بار در جهان به منظور شناسایی سه عامل ذکر شده در گاوهای سقط داده شده استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۸۴ نمونه خون از گاوداری‌های منطقه شمال استان فارس با سابقه سقط جنین اخذ گردید و پس از جدا سازی سرم تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

انجام الیزا

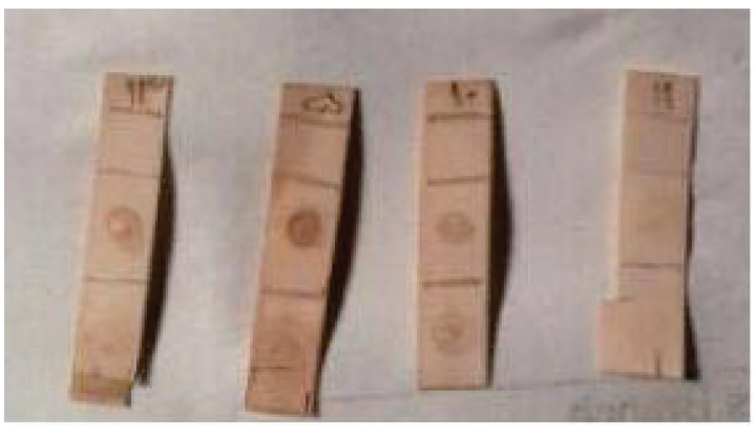
به این منظور، سه کیت الیزای تجاری شامل: کیت سنجش آنتی‌بادی علیه نئوسپورا کنینوم (Herdcheck, IDEXX's, USA)، کیت سنجش آنتی‌بادی بر علیه ویروس BVD (Svanova Biotech, Uppsala, Sweden)، کیت سنجش آنتی‌بادی بر علیه IBR (Svanova Biotech, Uppsala, Sweden)، مورد استفاده قرار گرفت و طبق دستورالعمل شرکت سازنده عمل شد.

روش انجام الیزا نقطه‌ای به صورت چندگانه (مولتیپلکس)

برای انجام این کار ابتدا آنتی‌ژن برای هر کدام از عوامل مورد نظر تهیه گردید. برای تهیه آنتی‌ژن تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم بر روی رده سلولی Vero از محیط کشت سلولی DMEM[۴] و۱۰ درصد سرم جنین گاو به همراه آنتی‌بیوتیک با مقادیر۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین و ضد قارچ آمفوتریسین ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. در مطالعه حاضر، ایزوله مورد استفاده برای آزمایش Nc-۱ بود که در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز موجود بود.

ویروس بذر BVD سویه NADL به همراه رده سلولی MDBK حساس به آن از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه گردید. با استفاده از محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله (Gibco, BVD antibody and antigen free)، سلول MDBK در فلاسک‌های کشت سلولی تکثیر شد. ویروس BVD با MOI۵ ۱ به ۱۰ به سلول‌ها اضافه شد و فلاسک‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۴۰ تا ۴۸ ساعت که اثرات سیتوپاتیک(CPE) در ۸۰ درصد کشت‌های سلولی مشاهده گردید، فلاسک‌های کشت سلول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز گردیدند. بعد از سه دوره ذوب و انجماد، محتویات فلاسک‌ها با دور ۳۰۰۰ RPM به مدت ۳۰ دقیقه در دمای زیر ۱۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ ۶۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه گردید. مایع رویی جمع‌آوری و پس از تقسیم در لوله‌های ۵ میلی‌لیتری، در دمای ۸۰- فریز شد. تیتر ویروس تکثیر یافته در واحد حجم با استفاده از روش رید و مونچ (۱۹۳۸)، بدست آمد. میزان محتوای پروتئینی با استفاده از روش برادفورد سنجش شد و میزان آنتی‌ژن با ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از پروتئین معادل سازی شد (۱۲). همچنین ویروس بذر IBR نیز از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه و مانند ویروس BVD روی رده سلولی MDBK تکثیر و فریز شد. با این تفاوت که جهت تکثیر ویروس IBR، سلول‌ها با MOI ۰/۰۱ از ویروس IBR تلقیح گردیدند (۱۱ , ۱۰).

پس از تهیه آنتی‌ژن‌ها آزمون الیزای نقطه‌ای به صورت چندگانه صورت گرفت. الیزای نقطه‌ای با بکارگیری مقادیر مختلف آنتی‌ژن و رقت‌های متفاوت سرم مثبت و منفی و همچنین رقت‌های متفاوت آنتی‌بادی کونژوگه در چندین مرحله برای هرکدام از سیستم‌های آنتی‌ژنی بررسی گردید و در نهایت روش کار با مقدار آنتی ژنی ۲ میکروگرم به ازاء هر نقطه برای آنتی‌ژن‌های ویروسی و ۲ میلیون تاکی‌زوایت برای نئوسپورا رقت ۱/۵۰ سرم و رقت ۱/۴۰۰۰ آنتی‌بادی کونژوگه تعیین گردید. انجام تست بدین صورت بود که ابتدا کاغذ نیتروسلولوز به صورت قطعات مربع دارای ابعاد ۰,۵ در ۱,۵ سانتی‌متر بریده شد. قطعات بریده شده را شماره‌گذاری کرده و به چهار قسمت مساوی که یک بخش برای کنترل و سه بخش دیگر برای آنتی‌ژن‌های مورد نظر منظور گردید. سپس کاغذها ده دقیقه در آب مقطر قرار گرفتند. بعد از آن قطعات بر روی یک ظرف تمیز عاری از هرگونه چربی یا پروتئین قرار داده شد زیرا هر گونه پروتئین و یا آلودگی موجب تداخل در کار می‌شود، سپس کاغذها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای خشک شدن قرار داده شدند. با استفاده از سمپلر مقدار ۱ میکرولیتر از آنتی‌ژن‌های سه گانه (با رقت‌های متفاوت آنتی‌ژن)، یعنی IBR،BVD و نئوسپورا کانینوم روی نقاط مشخص شده قرار گرفت. قطعات به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد تا محلول حاوی آنتی‌ژن خشک شده و فیکس شود این عمل تا سه مرتبه تکرار گردید تا پروتئین آنتی‌ژن به کاغذ نیتروسلولز متصل شود. برای بلوکه‌شدن، تمام قطعات به



شکل ۱- نمونه‌های مثبت منفی و منفی در آزمایش الیزای نقطه‌ای چندگانه. نقاط تیره نشان‌دهنده مثبت شدن نمونه می‌باشد.

صورت جداگانه در محلول ۱ درصد سرم گاو به مدت یک ساعت در دمای اتاق روی دستگاه تکان‌دهنده به صورت ته به سر قرار داده شدند. این عمل باعث بلوکه‌شدن قسمت‌های خالی کاغذ نیتروسلولز می‌شود. سپس قطعات برای سه مرتبه به مدت ۳ دقیقه با محلول فسفات بافر سالین (PBS) توئین، شسته می‌شوند تا پروتئین‌های اضافی و غیر متصل از سطح کاغذ شسته شوند. قطعات شسته شده به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق درون محلول سرم ۱/۵۰ رقیق شد.

هر نمونه درون دستگاه تکان دهنده قرار داده شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون به منظور حذف آنتی‌بادی‌های متصل نشده با آنتی‌ژن، قطعات کاغذ نیتروسلولز با استفاده از محلول PBS توئین سه مرتبه شست و شو داده شدند. پس از این مرحله قطعات کاغذ نیتروسلولز در آنتی آنتی‌گلوبولین g گاوی، کونژوگه با آنزیم پروکسیداز ۶ (رقیق شده با PBS توئین به میزان ۱/۴۰۰۰)، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند تا در صورت حضور آنتی‌بادی در محیط به آنتی‌بادی کونژوگه متصل شود. سپس برای حذف آنتی‌گلوبولین کونژوگه متصل نشده قطعات با محلول PBS توئین سه مرتبه شست و شو داده شدند (۱۴). در مرحله بعد قطعات در محلول حاوی DAB (دی آمینو بنزوبین، و آب اکسژنه) به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار داده شدند که پس از ظاهر شدن لکه رنگی روی قطعه کنترل مثبت، قطعات کاغذ نیتروسلولز از محلول سوبسترا و ماده رنگ‌زا خارج شده و با آب شسته شد تا واکنش متوقف گردد. بدیهی است که نمونه‌هایی که طی این زمان قهوه‌ای شده باشند مثبت قلمداد شده و نمونه‌هایی که رنگ را نشان ندهند منفی می‌باشند. (شکل ۱)

ارزیابی آماری

آنالیز نتایج الیزای نقطه‌ای به صورت چندگانه در مقایسه با کیت تجاری الیزا با استفاده از سایت آماری Graphpad و روش‌های آماری کاپا (Kappa Test) و مك نمار (McNemar) انجام گرفت.

نتایج

از تعداد ۱۸۴ نمونه آزمایش‌شده با کیت تجاری الیزا، تعداد ۵۹ نمونه از نظر وجود آنتی‌بادی بر علیه نئوسپورا کانینوم مثبت (۳۲ درصد) و ۱۲۵ نمونه منفی (۶۸ درصد) ارزیابی شدند در حالی که نتایج برای ویروس IBR، فقط تعداد ۲ نمونه از سرم‌های مورد بررسی منفی تشخیص داده شد (۱,۱ درصد) و مابقی نمونه‌ها یعنی ۱۸۲ نمونه مثبت (۹۸,۹ درصد) و برای ویروس BVDV، ۱۴۶ نمونه مثبت (۷۹,۳ درصد)، و ۳۸ نمونه منفی (۲۰,۷ درصد) ارزیابی شدند (جدول ۱). همچنین از تعداد ۱۸۴ نمونه آزمایش‌شده با الیزای نقطه‌ای چندگانه برای تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم تعداد ۵۴ رأس گاو از نظر آنتی‌بادی ضد نئوسپورا کانینوم مثبت (۲۹,۳ درصد)، و ۱۳۰ رأس نیز نمونه‌های (۷۰,۷ درصد) تشخیص داده شد. در مورد ویروس IBR از سرم‌های مورد مطالعه ۱۷۲ نمونه مثبت (۹۳,۵ درصد) و ۱۲ نمونه منفی (۶,۵ درصد) ارزیابی شدند. همچنین نتایج الیزای نقطه‌ای برای ویروس BVD به صورت ۱۱۸ نمونه مثبت (۶۴,۱ درصد) و ۶۶ نمونه منفی (۳۵,۹ درصد) تشخیص داده شد (جدول ۱).

بر اساس روش آماری آزمون کاپا دو روش الیزای غیرمستقیم و الیزای نقطه‌ای به صورت چندگانه دارای توافق بسیار خوب در تشخیص آنتی‌بادی بر علیه تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم بودند، در مورد ویروس IBR، این توافق نسبتا خوب و برای ویروس BVD به صورت خوب نشان داده شد. در ضمن در آزمون مك‌نمار نیز دو روش فوق‌الذکر در تشخیص آنتی‌بادی سرمی ضد سه عامل عفونی تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند (دامنه اطمینان ۹۵ درصد و $p > ۰/۰۵$).

حساسیت و ویژگی نسبی برای هر دو روش ارزیابی گردید (جدول ۲، جدول ۳ و جدول ۴). نتایج برای تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم نشان‌دهنده توافق در ۵۵ مورد مثبت و ۱۱۹ مورد منفی بود. در ۴ نمونه مورد آزمایش، الیزای غیرمستقیم مثبت شد در صورتی که الیزای نقطه‌ای منفی بدست آمد، از طرفی برای ۶ نمونه الیزای غیرمستقیم منفی بدست آمد در حالی‌که الیزای نقطه‌ای برای آن‌ها مثبت بدست آمده بود.

در مورد ویروس IBR نیز توافق مثبت دو روش الیزای غیرمستقیم و الیزای نقطه‌ای به روش مولتیپلکس در ۱۷۲ مورد دیده شد و توافق منفی در ۲ مورد ثبت گردید. همچنین در ۱۰ مورد الیزای غیرمستقیم مثبت شد و الیزای نقطه‌ای منفی در حالی که هیچ موردی مشاهده نشد که در الیزای غیرمستقیم منفی بوده و نتیجه آزمایش الیزای نقطه‌ای آن مثبت شود.

و در آخر در مورد ویروس BVDV، دو روش الیزای غیرمستقیم و الیزای نقطه‌ای در ۱۱۲ مورد دارای توافق مثبت بوده و ۴۰ مورد دارای توافق منفی بود. همچنین در ۳۲ مورد الیزای غیرمستقیم مثبت شد در حالی‌که آزمون الیزای نقطه‌ای منفی نشان داد همچنین هیچ موردی مشاهده نشد که در الیزای غیرمستقیم منفی بوده و نتیجه آزمایش الیزای نقطه‌ای آن مثبت شود.

بر این اساس حساسیت و ویژگی الیزای نقطه‌ای چندگانه در مقایسه با الیزای غیرمستقیم به ترتیب برای تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم ۹۰,۲ درصد و ۹۶,۷ درصد، برای ویروس IBR ۱۰۰درصد و ۱۶,۷ درصد و برای ویروس BVDV ۱۰۰ درصد و ۵۵,۵ درصد ارزیابی گردید

بحث و نتیجه‌گیری

همواره به منظور مطالعه پاسخ سرمي تعداد زيادي از دام‌ها در برابر عوامل عفونی نیاز به ارائه روش‌هايي است که هم سريع باشند وهم ارزان قيمت. علاقه روزافزوني در جهت تشخيص سرولوژيك بيماری‌های انگلي و ميكروبي توسط روش‌های سريع، ساده و ارزان به وجود آمده است. روش‌های سرولوژيك موجود چون آگلوتيناسيون غيرمستقيم، الیزا و روش آنتي‌بادي درخشان غيرمستقيم هر يك كم و بيش دارای اشكالاتي مانند پرزحمت‌بودن روش آزمايش، مشكل استانداردكردن، دشوار بودن تفسير نتايج، مصرف زياد مواد و آنتي‌ژن، نياز به پرسنل متبحر و دستگاه‌های گران‌قيمت مانند ميكروسكوپ فلئورسانس و عدم امكان انجام آن‌ها در فيلد هستند (۸)، لذا استفاده از روش‌های ساده‌تر و مقرون‌به صرفه‌تر مانند الیزای نقطه‌ای براستفاده ازكيت‌های الیزا ترجيح دارد.

با توجه به اینکه در حال حاضر هیچ روشی برای تشخیص همزمان سه عامل عفونی ذکر شده وجود ندارد و با نظر به طبیعت هر سه عامل در ایجاد مقاومت در برابر سیستم ایمنی و همچنین ایجاد گوساله‌های مبتلا و آلودکننده، اهمیت تشخیص سرولوژیک بیماری‌های عفونی منجر

به سقط جنین در گله‌های گاو در مقیاس‌های وسیع در جهان بیش از پیش احساس می‌شود (۷). این نکته قابل توجه است که هر سه عامل عفونی نئوسپورا کانینوم، IBR و BVDV در ایران دارای شیوع بالایی هستند و در مطالعات انجام گرفته در گاوهای جنوب غرب ایران، میزان شیوع برای آن‌ها به ترتیب ۳۳ درصد، ۳۹ درصد و ۵۱ درصد گزارش شده است (۱۹).

در پژوهش حاضر، برای بررسی سرولوژیک آنتی‌بادی بر علیه سه عامل عفونی نئوسپورا کانینوم، IBR و BVD از روش راحت و ارزان قیمت الیزای نقطه‌ای استفاده شد و نتایج با کیت تجاری الیزا مقایسه گردید که با استفاده از روش آماری مک‌نمار مشخص شد بین روش الیزای نقطه‌ای به صورت چندگانه و الیزای تجاری برای هر سه عامل نئوسپورا کانینوم، IBR و BVD تفاوت معناداری وجود ندارد.

روش الیزای نقطه‌ای به عنوان روش ساده شده الیزا، در مطالعات متعددی به کار رفته است (۱۵، ۲۲، ۲۷). پیش از این نیز الیزای نقطه‌ای برای تشخیص تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم، ویروس IBR و BVD انجام گرفته است. در مورد تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم مطالعات موفقی انجام گرفته از جمله نعمت‌اللهی و همکاران (۲۰۱۱)، که حساسیت و ویژگی را به ترتیب ۷۱ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش نمود، حمیدی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۳)، بلانکو و همکاران (۲۰۱۴)، که با استفاده از پروتئین نوترکیب به عنوان آنتی‌ژن از الیزای نقطه‌ای استفاده کردند. برای ویروس IBR و BVD نیز مطالعات در این زمینه انجام شده از جمله همت‌زاده (۱۳۸۲)، ژائو و همکاران (۲۰۰۹)، شیروانی و همکاران (۲۰۱۱). این مطالعه برای بررسی توانایی روش الیزای نقطه‌ای به صورت چندگانه برای تشخیص سرولوژیک این عوامل یاد شده انجام گرفت. از آنجا که سه عامل نئوسپورا کانینوم، IBR و BVD می‌توانند اثر یکدیگر را در سقط جنین گاو تقویت نمایند، در مطالعه حاضر روش الیزای نقطه‌ای چندگانه برای تشخیص تیتر سرمی علیه هر سه عامل سقط جنین در گاو طراحی گردید که نتایج قابل قبولی نیز ارائه نمود.

روش الیزای نقطه‌ای به صورت چندگانه نسبت به کیت‌های تجاری الیزا از سادگی بیشتری برخوردار بوده و به امکانات وسیعی نیاز ندارد و اگر به صورت بسته‌بندی مطلوب و راحت ارائه شود حتی برای به‌کارگیری در سطح دامداری‌هایی با امکانات اولیه نیز مناسب خواهد بود، زیرا یکی از مشکلات دامداری‌ها دور بودن آنها از مراکز شهر و عدم دسترسی سریع به آزمایشگاه‌های تشخیصی می‌باشد، که با استفاده از این روش که قابل اجراء در سطح دامداری‌ها فیلد می‌باشد تاحدودی این مشکل مرتفع خواهد شد.

مطالعه نعمت اللهی و همکاران (۲۰۱۱)، حساسیت ۷۱ درصدی روش الیزای نقطه‌ای را برای نئوسپورا کانینوم گزارش دادند؛ با توجه به اینکه حساسیت این روش به صورت چندگانه برای نئوسپورا کانینوم ۹۰,۲ درصد بدست آمد می‌توان اینگونه بیان کرد که روش الیزای نقطه‌ای چندگانه نشان داد حساسیت بالاتری نسبت به روش الیزای نقطه‌ای به صورت تک دارد. حساسیت برای هر دو عامل ویروسی نیز ۱۰۰ درصد بدست آمد و همچنین اختصاصیت این روش برای تک‌یاخته نئوسپورا کانینوم ۹۶,۷ درصد برای ویروس IBR ۱۶,۷ درصد و برای ویروس BVD از میزان ۵۵,۵ درصد برخوردار بود؛ و می‌توان این‌چنین نتیجه‌گیری کرد که استفاده از روش الیزای نقطه‌ای به صورت چندگانه، قادر به کاهش نتایج مثبت اشتباه می‌باشد.

علاوه بر این نتایج آماری آزمون کاپا نشان‌دهنده توافق قابل قبولی برای هر سه عامل در مقایسه با کیت تجاری الیزا می‌باشد. با توجه به بالا بودن حساسیت این روش برای هر سه عامل عفونی می‌توان این‌گونه بیان داشت که استفاده از الیزای نقطه‌ای به صورت چندگانه می‌تواند به عنوان روشی مناسب و مقرون به صرفه برای بررسی چند عامل عفونی بروز سقط جنین در گاو به کار رود.

نتیجه‌گیری نهایی

این پژوهش برای اولین بار از روش الیزای نقطه‌ای چندگانه برای بررسی عوامل عفونی سقط جنین در گاو استفاده نمود و می‌تواند از جنبه تجاری نیز مورد توجه قرار گرفته و به عنوان ایده‌ای مناسب و ابتکاری برای کارهای مطالعاتی آینده در زمینه تهیه کیت‌های دیسپرس و کیت‌های سریع رنگی در فیلد و بدون نیاز به تخصص خاصی مورد استفاده قرار گیرد و پتانسیل تبدیل شدن به کیت تجاری را نیز دارا می‌باشد.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این مطالعه توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ۲-۸۴-۱۸-۹۱۱۱۶ تامین گردیده است و در آزمایشگاه ملی نئوسپورا مراحل اجرایی ان انجام گرفته است.

پاورقی‌ها

1- *Neospora caninum*

2- Infectious Bovine Rhinotracheitis

3- Bovine Virus Diarrhea

4- Dulbeco's modified Eaggle medium

5- Multiplicity of infection

6- Anti-Bovine IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in rabbit (A8917 SIGMA)

منابع مورد استفاده

1. Alenius, S., Lindberg, A., Larsson, B. 1997. A national approach to the control of bovine viral diarrhoea virus. Proc. of the third ESVV symposium on the control of pestivirus infections, Lelystad. The Netherlands, 162-169.

2. Bashir, S., Rashmi, Singh, R., Sharma, B., Sharad, K., Yadav, AK. 2011. Development of a sandwich ELISA for the detection of bovine herpesvirus type 1. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine,* 4: 363-366.

3. Baszler, T., Adams, S., Vander-Schalie, J., Mathison, B., Kostovic, M. 2001. Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3851-3857.

4. Bjorkman, C., Uggla, A. 1999. Serological diagnosis of *Neos-*

17. Juntti, N., Larsson., and Fossum, C. 1987. The Use of Monoclonal Antibodies in Enzyme Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to Bovine Viral Diarrhoea Virus. J*ournal of Veterinary Medicine,* Series B, 34: 356-363.

18. Marques, F.A.C., Headley, A.S., Figueredo-Pereira, V., Taroda, A., Barros, L.D., Cunha, I.A.L., Munhoz, K., Bugni, F.M., Zulpo, D.L., Igarashi, M., Vidotto, O., Junior, J.S., Garcia, J.L. 2011. *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). *Parasitology Research*, 108:1015–1019.

19. Namavari M, Hosseini MH, Mansourian M, Shams Z, Amrabadi O, Tahamtan Y, Moazeni-Jula F. 2012. Screening for causative infectious agents of abortion in Iran, *Online Journal of Veterinary Research.*, 16 :147-153.

20. Nematollahi A., Jaafari Jozani R., Zaboli N. 2011. Adaptation of Dot-Elisa for Serodiagnosis of *Neospora caninum* Infestation in Aborted Cows. *Global Veterinaria,* 7: 149-152.

21. Packham, A., Sverlow, K., Conrad, PA., Loomis, EF., Rowe, JD., Anderson, ML., Marsh, AE., Cray, C., Barr, BC. 1998. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: Development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Diagnosis of Laboratory Immunology*, 5: 467-473.

22. Pappas MG, Hajkowski R, Hockmeyer WT. 1983. Dot enzyme-linked munosorbent assay (dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Immunol Methods.*64:205–214.

23. Rakhi Biswas; S.C. Parija; S.K. Narayan. 2004. Dot-ELISA for the diagnosis of neurocysticercosis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 46:249-252

24. Reed, L.J., Muench, H. 1938. A simple method of estimating 50% endpoints. *American Journal of Hygenic,* 27: 493-497.

25. Shirvani, E., Lotfi, M., kamalzadeh, M. 2011. Dot-Blot Enzyme Immunoassay for the Detection of Bovine Herpes Virus-1(BHV-1) Antibodies. *World Applied Sciences Journal,* 15:781-784

26. Vanroose, G. 1994. Interactions of bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus with bovine gametes and in vitro-produced embryo. Dissertation University of Ghen, 1–229.

27. Wang Z., Yu D., Li X., Zeng M., Chen Z., Bi L., Liu J., Jin L., Hu D., Yang S., and Song B..2012. The Development and Application of a Dot-ELISA Assay for Diagnosis of Southern Rice Black-Streaked Dwarf Disease in the Field. *Viruses*. 4: 167–183.

28. Zhao, Y., Zuo, Y., Zhang, L., Fan, J., Yang, H., Qin, J. 2009. Development of a sandwich Dot-ELISA for detecting bovine viral diarrhea virus antigen with E2 recombinant protein. Frontiers Agriculture in China, 3: 325.

pora caninum infection. *International Journal of Parasitology*, 29: 1497-1507.

5. Blanco, Rafael D., Cintia, F., Fidelis, Leandro, S., Araujo, Adriana, M., Henao, Jose, A., Cardona, and etal. 2014. Development and standardization of Dot-ELISA using recombinant peptides for serological diagnosis of *Neospora caninum*. *Pesquisa Veterinary Brasilia,* 34: 8.

6. Dubey, J.P., and Schares, G. 2006. Diagnosis of Bovine Neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 140: 1-34.

7. Graham, D.A., Mawhinney, K.A., McShane, J., Conno,r J.A., Adair, B.M., Merza, M. 1997. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for quantitative estimation of antibodies specific for infectious bovine rhinotracheitis virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and bovine viral diarrhea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 9: 24-31.

8. Crowther, J.R. 2000. The ELISA Guidebook: Methods on Molecular biology. Second edition. Human press, Totowa, Jersey, 85-140.

9. Hamidinejat, H., Haji hajikolaei, M., Ghorbanpoor, M., Namavari, M., and Mohamad Ali Gol, S. 2013. Development and Standardization of Dot – ELISA for Detection of *Neospora caninum* Antibodies in Cattle and Comparison with Standard Indirect ELISA and Direct Agglutination Test (DAT). *Iran Journal of Parasitology,* 8:634–640.

10. Hemat Zadeh, Farhid. 2001. Development of an immunofluorescent kit for IBR serodiagnosis. *Iranian Journal of Veterinary Medicine* 56, no. 2 (In persian).

11. Hemat Zadeh, Farhid. 2003. Development of a dot Elisa kit for IBR serodiagnosis in cattle. *Iranian Journal of Veterinary Medicine, 56*, no. 6 (In Persian)

12. Hemmatzadeh, F., Amini, F. 2009. Dot-blot enzyme immunoassay for the detection of bovine viral diarrhea virus antibodies. *Veterinarski Arhiv*, 79: 343–350

13. Hoar, B.R., McQuarry, A.C., Hietala, S.K. 2007. Prevalence of *Neospora caninum* and persistent infection with bovine viral diarrhea virus in dairy-breed steers in a feedlot. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 230: 1038–1043.

14. Hudson, l., Hay, FC. 1989. Practical immunology, 3th edition. Blackwell scientific publication, 15-42

15. Itoh M1, Sato S.1990. Multi-dot enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of trematodiasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 21:471-4.

16. Jones, C., Newby, TJ., Holt, T., Doster, A., Stone, M., Ciacci-Zanella, J., Webster, JC., Jackwood, MW. 2000. Analysis of latency in cattle after inoculation with a temperature sensitive mutant of bovine herpesvirus 1 (RLB106), *Vaccine*, 18: 3185–3195.

جدول ۱- توزیع نتایج دو آزمون الیزا و الیزای نقطه‌ای چندگانه

عامل عفونی / روش آزمون	نئوسپورا کانینوم	ویروس IBR	ویروس BVD
الیزا مثبت (درصد)	۳۲	۹۸/۹	۶۴/۱
الیزا منفی (درصد)	۶۸	۱/۱	۳۵/۹
الیزای نقطه‌ای (درصد)	۲۹/۳	۹۳/۵	۷۹/۳
الیزای نقطه‌ای (درصد)	۷۰/۷	۶/۵	۲۰/۷

جدول ۲- داده‌های مورد استفاده در تعیین حساسیت و ویژگی نسبی الایزای غیرمستقیم در مقایسه با الیزای نقطه‌ای برای تک یاخته نئوسپورا کانینوم

الیزای غیرمستقیم	الیزای نقطه‌ای			
		+	+	
+	a =۳۵	b =۴	a+b =۵۹	
-	c=۶	d =۱۱۹	c+d =۱۲۵	
	a+c =۶۱	b+d =۱۲۳	a+b+c+d =۱۸۴	

$$\text{حساسیت } (\text{درصد}) = \frac{a}{a+c} \times 100 = \frac{55}{61} \times 100 = 90.2\%$$

$$\text{ویژگی } (\text{درصد}) = \frac{d}{b+d} \times 100 = \frac{119}{123} \times 100 = 96.7\%$$

جدول ۳- داده‌های مورد استفاده در تعیین حساسیت و ویژگی نسبی الایزای غیرمستقیم در مقایسه با الیزای نقطه‌ای برای ویروس BVD V

الیزای غیرمستقیم	الیزای نقطه‌ای			
		+	+	
+	a =۱۱۲	b =۳۲	a+b =۱۴۴	
-	c=۰	d =۴۰	c+d =۴۰	
	a+c =۱۱۲	b+d = ۷۲	a+b+c+d =۱۸۴	