DOI: 10.22092/VJ.2020.352090.1776
شماره ۱۳۳ زمستان ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی سازگاری بین روش‌های الایزا و شاخص خنثی‌سازی ویروس در تشخیص آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری لامپی‌اسکین در گاو

• **محمدحسن ابراهیمی‌جم**
بخش پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
• **هادی کیوان‌فر (نویسنده مسئول)**
بخش پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
• **حمیدرضا ورشوی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **مسعودرضا صیفی‌آباد شاپوری**
بخش میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
• **محسن لطفی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۲-۰۷-۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: ۰۳-۰۸-۱۳۹۹
Emali: hkeyvanfar2013@gmail.com

چکیده

بیماری لامپی اسکین (LSD)، نوعی بیماری به شدت واگیر در گاو و گاومیش است که در مناطق اندمیک خسارات قابل توجهی را به صنعت دامپروری وارد می‌نماید. با وجود اینکه شاخص خنثی‌سازی ویروس (VNI:Virus Neutralization Index) به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص سرمی LSD در نظر گرفته می‌شود، اما به‌کارگیری این روش در مطالعات سرواپیدمیولوژی و پایش‌های سرمی، بسیار سخت و زمان‌بر است. از این رو، سیستم‌های الایزا برای تشخیص سرمی بیماری‌های ناشی از کاپری‌پاکس ویروس‌ها ایجاد شده است، اما کمبود اطلاعات در مورد عملکرد و کارایی این تست تشخیصی یکی از عوامل محدودکننده استفاده از آن است. در این مطالعه، سازگاری تشخیص سیستم الایزای طراحی شده بر مبنای پروتئین نوترکیب P32 در مقایسه با روش VNI با استفاده از ۹۵ نمونه سرمی شامل ۲۵ نمونه کنترل منفی، ۱۴ نمونه کنترل مثبت و ۵۶ نمونه تهیه شده از گاوهای مشکوک به بیماری لامپی اسکین در مقایسه با روش VNI ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تمامی نمونه‌های کنترل منفی در هر دو آزمایش VNI و الایزا هیچگونه تیتر آنتی‌بادی ضد ویروس لامپی اسکین نداشتند. در آزمایش VNI تیتر همه‌ی ۱۴ (۱۰۰٪) نمونه کنترل مثبت برابر یا بیشتر از ۱/۵ بود و مثبت ارزیابی شدند، اما آزمایش الایزا، ۱۳ نمونه (۹۳٪) را مثبت اعلام نمود. از بین ۵۶ نمونه اخذ شده از دام‌های مشکوک به بیماری لامپی اسکین، ۱۶ نمونه (۲۹٪) بوسیله آزمایش VNI مثبت ارزیابی شد، در حالی‌که در آزمایش الایزا تعداد ۱۳ نمونه (۲۳٪) مثبت تشخیص داده شد. در مجموع ۹۵ نمونه‌ی سرمی، درصد تشخیص نمونه‌های مثبت و یا منفی با دو روش تشخیصی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵) و سازگاری بین دو روش که با شاخص کاپا اندازه‌گیری شد، ۰/۷۱ بود. این نتایج نشان از سازگاری و عملکرد قابل قبول سیستم الایزای طراحی شده بر پایه پروتئین نوترکیب P32 در تشخیص آنتی بادی علیه ویروس LSD دارد.

کلمات کلیدی: الایزا، شاخص خنثی‌سازی ویروس، شاخص کاپا، کاپری‌پاکس، لامپی‌اسکین

Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 66-74

Evaluation of agreement between ELISA and virus neutralization index methods in the antibody detection against lumpy skin disease virus in cattle

By: Ebrahimi-Jam, M. H., Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Keyvanfar, H., (Corresponding Author) Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Varshovi, H. R., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Seyfi Abad Shapoori, M. R., Department of Microbiology Faculty of Veterinary medicine of Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. and Lotfi, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2020-10-03 **Accepted: 2020-10-24**

Emali: hkeyvanfar2013@gmail.com

Lumpy skin disease (LSD) is a highly contagious disease of cattle and buffaloes that cause considerable economic losses to the livestock industry in endemic regions. Although the virus neutralization index (VNI) is the gold standard test for the detection of LSD antibodies, the use of this test in seroepidemiology studies and serosurveillance is laborious and time-consuming. Accordingly, for serodiagnosis of capripox diseases, ELISA assay has been developed, but the lack of information about its performance and efficiency is one of the limiting factors in the use of this test in seroepidemiological studies. In this study, the diagnosis agreement between a recently developed ELISA based on P32 recombinant protein and the VNI method, as a gold standard for serological diagnosis of Capripox virus, was evaluated using 95 sera samples including 25 negative control, 14 positive control, and 56 suspected cattle sera. Result showed that all the negative control sera assessed by VNI and ELISA had no antibody titers against LSD. All the 14 (100%) positive control sera had VNI values ≥1.5 and were considered as the positive sera; however, by ELISA method, 13 samples (93%) were diagnosed as the positive. Among the 56 samples collected from LSD-suspected cattle, 16 samples (29%) were detected as the positive by VNI, whereas 13 samples (23%) were detected as the positive sera by ELISA method. There was no statistically significant difference between the percentages of negative or positive samples assessed by ELISA or VNI method (P>0.05), associated with the Kappa index value of 0.71 showing the substantial agreement. These findings indicating an acceptable agreement and performance of the developed ELISA system based on P32 recombinant protein in comparison to VNI method for diagnosing antibody against LSD virus in cattle.

Keywords: ELISA, neutralization index, Kappa index, Capripox, Lumpy skin

مقدمه

بیماری لامپی اسکین (LSD)، بیماری کشنده با واگیری بالا در گاو و گاومیش است که ضایعات پوستی و مخاطی، بزرگ شدگی غدد لنفاوی، کاهش تولید شیر و مرگ از نشانه‌های اصلی آن است (۷, ۱۰). این بیماری به‌دلیل قدرت انتشار بالا و خسارات اقتصادی که به صنعت دامپروری وارد می‌آورد، توسط سازمان بهداشت جهانی دام (OIE) به‌عنوان یکی از بیماری‌های مهم، در گروه A بیماری‌های دامی قرار گرفته است (۲۲). عامل این بیماری، ویروس لامپی اسکین (LSDV) است که در خانواده پاکس ویریده (Poxviridea)، دون خانواده کوردوپاکس ویرینه (Chordopoxvirinae) و جنس کاپری‌پاکس ویروس (Capripoxvirus) قرار دارد (۱۴). افزون بر ویروس عامل بیماری لامپی‌اسکین، ویروس آبله گوسفندی و ویروس آبله بزی نیز در جنس کاپری‌پاکس ویروس قرار می‌گیرند. شباهت زیاد توالی نوکلئوتیدی ژنوم این سه ویروس (تا ۹۷٪) و خصوصیات آنتی‌ژنی موجب شده است که با روش‌های سرم‌شناسی نتوان آن‌ها را از یکدیگر تفریق نمود (۲۰, ۲۱). از طرفی این شباهت موجب شده است که در برخی کشورها از واکسن‌های آبله گوسفندی و آبله بزی برای پیشگیری از ابتلا به بیماری لامپی‌اسکین استفاده گردد.

بیماری‌لامپی اسکین بومی قاره آفریقا است و تا پیش از سال ۲۰۱۲، تنها به صورت تک‌گیری در منطقه خاورمیانه بروز می‌کرد (۲۳). در حال حاضر این بیماری در ایران نیز به عنوان یک بیماری بومی شناخته می‌شود که نخستین بار در سال ۱۳۹۳ گزارش شد. نخستین رخداد بیماری لامپی‌اسکین در ایران، در شش راس گاوهای شیری، در دو روستای غرب کشور گزارش شد. گمان بر این است که رعایت نکردن قوانین بهداشتی در جابه‌جایی دام‌های آلوده به ویروس ایجادکننده لامپی-اسکین، دلیل

شیوع این بیماری باشد (۱, ۱۸). در هر حال، تشخیص به‌هنگام این بیماری کمک شایانی به برنامه‌ریزی برای کنترل و اتخاذ راهبردهای پیشگیری از شیوع آن می‌نماید. روش‌های سرم‌شناسی تشخیص بیماری همچون آزمایش آگار ژل ایمنودیفیوژن، آزمایش ایمینوفلورسنت، وسترن بلات، الایزا و آزمایش خنثی‌سازی ویروس (VNT :Virus Neutralization Test) از روش‌هایی است که می‌تواند در تشخیص سرمی دام‌های بیمار و یا آلوده به ویروس استفاده شود. با این حال، هر یک از آن‌ها با وجود سودمندی‌های ویژه‌ی خود، ضعف‌هایی نیز دارند. برای نمونه، روش‌های آگار ژل ایمنو دیفیوژن و ایمینوفلورسانت در تشخیص آنتی‌بادی علیه بیماری‌های ناشی از ویروس‌های جنس کاپری‌پاکس اختصاصی عمل نکرده و نمی‌توان با استفاده از آن‌ها، به تشخیص تفریقی دست یافت. روش لکه‌گذاری وسترن، اختصاصیت و حساسیت بالایی در تشخیص سرمی بیماری لامپی‌اسکین دارد، اما انجام این آزمایش از نظر تکنیکی سخت و هزینه‌بر بوده و راه‌اندازی آن نیاز به امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی ویژه‌ای دارد (۱۳, ۱۷).

سازمان بهداشت جهانی دام (OIE)، آزمایش شاخص خنثی‌سازی ویروس (VNI :Virus Neutralization Index) را به‌عنوان استاندارد طلایی (gold standard) در تشخیص سرمی بیماری لامپی اسکین و به تبع آن تبیین سیاست‌های کنترلی این بیماری توصیه کرده است (۱۷). به‌کارگیری این روش نیز در پژوهش‌های سرواپیدمیولوژی و پایش‌های سرمی که نیازمند شمار بالایی نمونه است، بسیار سخت و زمان‌بر است. از این رو، راه‌اندازی روش‌هایی مانند الایزا که هزینه پایین‌تر، سرعت اجرای بالاتر و تعداد نمونه قابل آزمایش در هر نوبت تست بیشتری دارد، می‌تواند کمک شایانی به بهبود روندهای تشخیصی نماید (۱۲). از میان پروتئین‌های ایمونوژنیک کاپری‌پاکس ویروس‌ها، پروتئین P32 مهم‌ترین پروتئینِ ساختمانیِ حفاظت‌شده در این جنس از ویروس‌ها است. این پروتئین نقش بسیار کلیدی در تحریک سیستم ایمنی هومورال و سلولی دارد و می‌تواند آنتی‌بادی‌های ضد ویروس‌های جنس کاپری‌پاکس را از آنتی‌بادی‌های ضدویروس‌های جنس پاراپاکس تفکیک نماید (۶). ژن کدکننده پروتئین P32 در میانه ژنوم کاپری‌پاکس ویروس‌ها جای گرفته است و از دیدگاه ساختاری، در بین این ویروس‌ها به شدت محافظت شده است، به طوری‌که این ژن ۹۷ تا ۹۸ درصد شباهت نوکلئوتیدی را در بین سه ویروس جنس کاپری‌پاکس ویروس نشان می‌دهد. بر این اساس، اگرچه نمی‌توان از پروتئین P32 برای تفریق اختصاصی ویروس‌های جنس کاپری‌پاکس ویروس بهره گرفت (۶, ۲۰)، ولی با توجه به اینکه ویروس‌های جنس کاپری‌پاکس (ویروس آبله‌ی بزی، آبله‌ی گوسفندی و ویروس LSD) کاملاً مختص به گونه‌ی حیوان هستند، می‌توان با استفاده از این پروتئین، LSD را به‌طور اختصاصی در گاو تشخیص داد. در پژوهش‌های پیشین، عملکرد سیستم الایزای طراحی شده بر مبنای پروتئین P32 برای تشخیص آنتی بادی علیه آبله گوسفندی و آبله بزی در مقایسه با آزمایش خنثی‌سازی ویروس مطلوب ارزیابی شده است (۴, ۵, ۱۱, ۲۵). اگر چه تشخیص آنتی بادی در برابر ویروس لامپی‌اسکین بوسیله الایزای غیرمستقیم بر مبنای استفاده از ویروس خالص توسط بابیوک و همکاران نیز انجام شده بود (۳)، با این وجود، تا کنون اطلاعات زیادی در خصوص عملکرد سیستم الایزای طراحی شده برای تشخیص سرمی بیماری لامپی‌اسکین با استفاده از پروتئین نوترکیب P32 در دسترس نیست. از این رو، پژوهش کنونی با هدف ارزیابی سازگاری بین روش‌های الایزا بر پایه‌ی پروتئین P32 آبله بزی و VNI در تشخیص آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری لامپی‌اسکین در سرم گاو انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

برای انجام این مطالعه، تعداد ۵۶ نمونه سرمی از گاوهای دارای نشانه‌های پوستی بیماری لامپی‌اسکین از مناطق مختلف ایران اخذ شد. نمونه‌های سرمی پیش از اجرای برنامه واکسیناسیون گاوها علیه بیماری لامپی‌اسکین در ایران، در فاصله اوایل سال ۱۳۹۳ تا اوایل سال ۱۳۹۴ اخذ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه مرجع آبله گوسفندی و آبله بزی OIE موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی ارسال شد. نمونه‌های سرمی در شرایط استریل جداسازی و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین، تعداد ۲۵ نمونه سرمی از گاوهایی که هیچگونه سابقه واکسیناسیون و یا سابقه بیماری LSD نداشتند، به عنوان کنترل منفی و تعداد ۱۴ نمونه کنترل مثبت (۶ نمونه از بیماری طبیعی و ۸ نمونه از گاوهای واکسینه با واکسن آبله بزی یا آبله گوسفندی) که قبلاً جمع‌آوری شده بودند و در بانک سرمی آزمایشگاه وجود داشت، استفاده گردید. شایان ذکر است که ملاک انتخاب نمونه‌های سرمی به عنوان کنترل مثبت، داشتن تیتر آنتی‌بادی مثبت (تیتری با شاخص خنثی‌سازی ≤۱/۵) علیه کاپری‌پاکس ویروس‌ها بود. لذا نمونه‌های اخذ شده از دام‌های دارای علائم بالینی بیماری LSD و یا نمونه‌های اخذ شده از دام‌های واکسینه که در تست VNI تیتر بالای ۱/۵ داشتند، به عنوان کنترل مثبت انتخاب شدند (۱۷).

آزمایش شاخص خنثی‌سازی ویروس

در این مطالعه جهت انجام آزمایش شاخص خنثی‌سازی ویروس، از سلول ثانویه کلیه بره و ویروس واکسینال آبله بزی سویه گرگان استفاده گردید. ویروس آبله بزی (واکسینال) روی کشت سلول ثانویه بره عیار سنجی شد و عیار آن برابر با $10^{6/1}$ ml /$TCID_{50}$ محاسبه شد. آزمایش شاخص خنثی‌سازی ویروس طبق روش شرح داده شده در OIE (۲۰۱۷) به روش میکرو و در میکروپلیت کشت سلول ۹۶ خانه ای CELLSTAR ساخت شرکت Greiner، انجام شد. محیط کشت DMEM شرکت Sigma و سرم جنینی گاو شرکت Gibco در کشت سلول استفاده گردید. به‌طور خلاصه، ابتدا نمونه‌های سرمی شامل کنترل منفی، کنترل مثبت و نمونه‌های مورد آزمون به نسبت ۱:۵ در محیط کشت رقیق شد و در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه (سیستم کمپلمان) غیر فعال گردید. سپس میزان ۵۰ میکرولیتر از نمونه اول مورد آزمایش در ستون‌های ۱ و۲ از ردیف A تا H اضافه شد و به همین روش، نمونه دوم در ستون های ۳ و ۴، نمونه سوم در ستون‌های ۵ و ۶، نمونه کنترل مثبت در ستون‌های ۷ و ۸، نمونه کنترل منفی در ستون‌های ۹ و۱۰ و ستون‌های ۱۱ و۱۲ بدون اینکه سرم اضافه شود به جای آن محیط کشت سلول اضافه شد. از ویروس آبله بزی سویه گرگان رقت‌های مختلف با تیترهای 10^{4} $TCID_{50}$ ، $10^{3.5}$ $TCID_{50}$ ، 10^{3} $TCID_{50}$ ، $10^{2.5}$ $TCID_{50}$ ، 10^{2} $TCID_{50}$

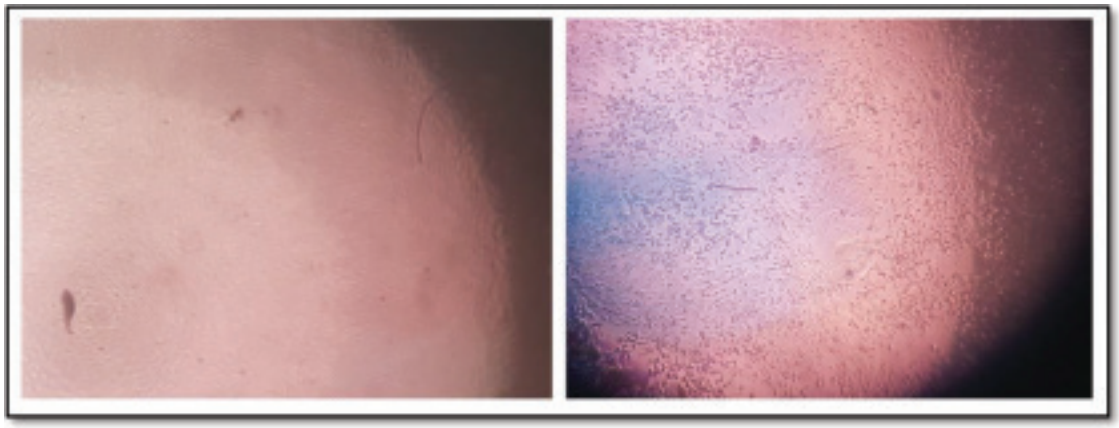
$TCID_{50}$، $10^{1,5}$ و 10^{1} در هر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس میزان ۵۰ میکرولیتر از ویروس به هر ردیف از چاهک‌های پلیت اضافه گردید به طوریکه بالاترین رقت ویروس، (10^{1} $TCID_{50}$) در ردیف G و پائین‌ترین رقت (10^{4} $TCID_{50}$) در ردیف A قرار گرفت و ردیف H بدون اضافه شدن ویروس به عنوان کنترل سرم در نظر گرفته شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انکوبه شد. در مرحله بعد، از فلاسک حاوی سلول ثانویه کلیه بره یک سوسپانسیون سلولی با ۳ درصد سرم جنین گاو (دارای ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر یک میلی لیتر) تهیه گردید و میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هرچاهک از ردیف H تا A اضافه شد. میکروپلیت ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با شرایط ۵ درصد CO_2 منتقل گردید و به مدت ۹ روز نگهداری شد (۱۷). پلیت‌ها به صورت روزانه مورد بررسی و مونیتورینگ قرار گرفت و آثار مخرب ویروس (CPE) روی کشت سلول در فرم های مخصوص ثبت شد (شکل ۱).

آزمایش الایزا

اندازه‌گیری‌های تیتر سرمی با روش الایزا با استفاده از سیستم راه‌اندازی شده الایزای غیر مستقیم با استفاده از پروتئین ایمونوژن P32 که پیشتر توسط گروه تحقیقاتی مطالعه حاضر گزارش شده است (۱۱)، انجام شد. حساسیت (۹۴٪) و اختصاصیت (۹۶٪) سیستم الایزای اندازه‌گیری شده در مقایسه با روش خنثی‌سازی ویروس مطلوب ارزیابی شد و آستانه تشخیص (cut-off) آن ۰/۳۹۷ گزارش شده است (۱۱). برای اندازه‌گیری نمونه‌ها با روش الایزا، ابتدا هر چاهک میکروپلیت الایزا بوسیله ۱۰۰ میکرولیتر آنتی ژن (۶۷۵ نانوگرم پروتئین P32 نوترکیب آبله بزی) پوشانده شد و میکروپلیت پوشیده شده از آنتی‌ژن به مدت یک شب تا صبح در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید (۱۱). در روز بعد این میکروپلیت از یخچال خارج شد و هر چاهک میکروپلیت بوسیله ۲۰۰ میکرولیتر بافر شستشو PBST (بافر PBS حاوی Tween 20 ۰،۰۵ ٪) به مدت ۲-۳ دقیقه و ۵ بار شستشو شد. سپس هر چاهک از میکروپلیت بوسیله ۲۰۰ میکرولیتر آلبومین سرم گاوی (BSA) پر شد و به مدت یک شب تا صبح و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت بلوکه شدن حفرات فاقد آنتی‌ژن نگهداری گردید. نمونه‌های سرمی در بافر رقت سازی (بافر PBST+ BSA ۰/۲۵٪) رقیق شد و پس از اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱:۱۰ نمونه‌های سرمی به هر چاهک، میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید، پس از یک ساعت میکروپلیت از انکوباسیون خارج شد و به همان روشی که در بالا اشاره شد مورد شستشو قرار گرفت. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت۱:۱۰۰۰ آنتی‌بادی کونژوگه ضد سرم گاو به هرکدام از چاهک‌های میکروپلیت اضافه گردید و به مدت یک ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس چاهک‌های میکروپلیت الایزا ۵ نوبت دیگر با همان روشی که قبلاً اشاره شد مورد شستشو قرار گرفت و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آماده مصرف ۳, ۳', ۵, ۵' تترا متیل بنزیدین به همراه آب اکسیژنه (هایفن فرانسه) به هر چاهک اضافه گردید و جهت تکمیل واکنش و ایجاد رنگ، میکروپلیت الایزا در یک مکان تاریک و در دمای آزمایشگاه به مدت ۷ تا ۱۰ دقیقه نگهداری شد. طبق پروتکل شرکت سازنده TMB، پس از گذشت زمان ذکر شده، ادامه واکنش با اضافه نمودن ۱۰۰ مایکرولیتر از اسیدسولفوریک ۰/۴۵ مولار متوقف گردید و جذب نوری (OD) هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش شد. نمونه‌های دارای جذب نوری بالای ۰/۳۹۷ به عنوان نمونه‌های مثبت و نمونه‌های با جذب نوری کمتر از این مقدار، منفی در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از آزمایش با نرم‌افزار آماری SAS ۹,۴ آنالیز شد. مقایسه درصد نمونه‌های مثبت و منفی سرمی با دو روش تشخیصی، با رویه‌ی آماری GENMOD به صورت داده‌های باینومیال و رگرسیون لجستیک



شکل ۱- مقایسه سلول سالم (تصویر چپ) و سلول داری آثار سایتوپاتیک (تصویر راست) به دنبال تکثیر ویروس آبله بزی.

انجام شد. شاخص سازگاری کاپا با رویه‌ی FREQ محاسبه شد. از سطح آماری P<۰/۰۵ برای بیان اختلاف‌های معنی‌دار استفاده شد. به طور کلی در این آزمایش شاخص کاپا کمتر یا برابر با صفر به عنوان عدم وجود سازگاری بین دو روش لحاظ گردید، شاخص کاپا بین ۰/۰۱ تا ۰/۲۰ به عنوان نبود سازگاری تا سازگاری بسیار کم در نظر گرفته شد، شاخص کاپا بین ۰/۲۱ تا ۰/۴۰ به عنوان وجود سازگاری ضعیف مد نظر قرار گرفت، شاخص کاپا بین ۰/۴۱ تا ۰/۶۰ به عنوان سازگاری قابل توجه و شاخص کاپا بین ۰/۸۱ تا ۱/۰۰ به عنوان سازگاری تقریباً کامل لحاظ شد.

نتایج

نتایج تشخیص آنتی‌بادی ضدویروس لامپی اسکین بر روی ۵۶ نمونه سرمی اخذ شده از دام‌های دارای ندول‌های پوستی (نمونه‌های مجهول)، ۲۵ نمونه کنترل منفی و ۱۴ نمونه سرمی کنترل مثبت در جدول (۱) آورده شده است. نتایج آزمایش شاخص خنثی‌سازی نشان داد که نمونه‌های کنترل مثبت (دارای تیتر سرمی ≤ ۱/۵ در آزمایش VNI) دارای شاخص خنثی‌سازی بزرگتر یا مساوی با ۱/۵ بودند (NI≥۱/۵). مطابق انتظار، ۲۵ نمونه‌ی سرمی که از گوساله‌های سالم و فاقد سابقه واکسیناسیون جمع آوری شده بودند (کنترل منفی)، هیچگونه تیتر آنتی‌بادی علیه بیماری لامپی اسکین نشان ندادند. در آزمایش الایزا، از ۱۴ نمونه‌ی کنترل مثبت، تعداد ۱۳ نمونه دارای جذب نوری بالای ۰/۳۹۷ بود و به عنوان نمونه‌های مثبت ثبت شد. همچنین، همه‌ی ۲۵ نمونه سرمی کنترل منفی، فاقد تیتر آنتی‌بادی الایزا تشخیص داده شد.

از بین ۵۶ نمونه سرمی جمع‌آوری شده از دام‌های دارای ندول‌های پوستی (مشکوک به بیماری LSD)، تنها ۱۶ نمونه (۲۸/۵۷ درصد) شاخص خنثی‌سازی بالاتر یا مساوی با ۱/۵ را نشان دادند، در حالی که نتایج الایزا در غربالگری، ۱۳ نمونه (۲۳/۲۱ درصد) را دارای تیتر آنتی‌بادی مثبت تشخیص داد. از بین نمونه‌های مشکوک به بیماری LSD ارزیابی شده در این مطالعه، تعداد ۴۰ (۷۱/۴۳ درصد) و ۴۳ (۷۶/۷۹ درصد) نمونه به ترتیب با روش VNI و الایزا منفی تشخیص داده شد (جدول ۱). در شکل (۱) مقایسه آماری بین کل نمونه‌های مثبت و یا منفی تشخیص داده شده با هر دو روش را نشان می‌دهد. به طور کلی، از مجموع ۹۵ نمونه سرمی آزمایش شده، تعداد ۳۰ نمونه سرمی (۳۱/۵۸٪) در آزمایش شاخص خنثی‌سازی ویروس مثبت اعلام شد؛ در حالی‌که ۲۶ نمونه (۲۷/۳۷٪) در الایزا به عنوان نمونه سرمی مثبت تشخیص داده شدند. همچنین پایش سرمی با روش VNI، تعداد نمونه‌های منفی را ۶۵ مورد از بین ۹۵ نمونه ارزیابی شده تشخیص داد (۶۸/۴۲ درصد) در حالی‌که روش الایزا ۶۹ مورد (۷۲/۶۳ درصد) را به عنوان نمونه منفی تشخیص داد. درصد تشخیص نمونه‌های مثبت و یا منفی با دو روش از نظر آماری نداشتند (P>۰/۰۵).

سازگاری تشخیصی روش الایزا با شاخص خنثی‌سازی ویروس

جدول (۲) نتایج سازگاری به دست آمده توسط روش VNI و الایزا را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج، از بین ۹۵ نمونه، تعداد نمونه‌های مثبت تشخیص داده شده با هر دو روش، ۲۲ مورد و تعداد نمونه‌های منفی تشخیص داده شده با هر دو روش ۶۱ مورد بود. همچنین ۱۲ مورد ناسازگاری بین تشخیص‌های دو روش وجود داشت. شاخص سازگاری کاپا بین دو روش ۰/۷۱ ارزیابی شد. همچنین، نتایج نشان داد که در بین نمونه‌های منفی ۸۸ درصد سازگاری مطلق و در بین نمونه‌های مثبت ۷۳ درصد سازگاری مطلق وجود داشت (شکل ۲).

بحث

برای کنترل و ریشه‌کنی مؤثر LSD در مناطقی که بیماری اندمیک است، در کنار واکسیناسیون، باید به طور مداوم به ارزیابی تیتر آنتی‌بادی

جدول ۱- نتایج تشخیص آنتی بادی ضد ویروس لامپی اسکین بوسیله آزمایش شاخص خنثی سازی ویروس با روش VNI و الایزا.

الف) نتایج تشخیصی								
نمونه	تعداد	VNI				ELISA		
		تعداد مثبت	N.I value	تعداد منفی	N.I value	تعداد مثبت	OD	تعداد منفی	OD
نمونه های کنترل مثبت*	۱۴	۱۴	۱/۵-۲/۷	۰	-	۱۳	۰/۴۹۷-۰/۹۳۱	۱	۰/۳۵۳
نمونه های کنترل منفی**	۲۵	۰	-	۲۵	۰	۰	-	۲۵	۰/۰۸۰-۰/۱۸۷
نمونه¬های مجهول***	۵۶	۱۶	۱/۵-۲/۵	۴۰	۰-۱/۲	۱۳	۰/۵۸۳-۰/۳۹۹	۴۳	۰/۰۳۹-۰/۳۴۳
کل	۹۵	۳۰		۶۵		۲۶		۶۹	

* اخذ شده از دام‌های بیمار یا واکسینه

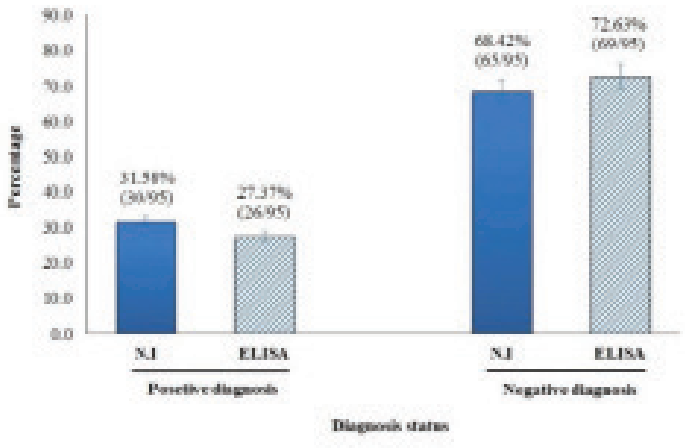
** اخذ شده از گوساله‌هایی که هیچگونه سابقه‌ای از بیماری و یا دریافت واکسن را نداشتند

*** نمونه‌های موجود در بانک سرمی آزمایشگاه (در سال۱۳۹۳ و با بروز بیماری LSD از گاوهای دارای ندول‌های پوستی اخذ شده بود).

در سطح گله نیز پرداخته شود (۱۳, ۲۳). علیرغم این که مصونیت به کاپری‌پاکس ویروس‌ها عمدتاً از نوع ایمنی بواسطه سلولی است، اما سطح مناسبی از تیتر آنتی‌بادی اختصاصی می‌تواند عملکرد مطلوبی را برای محافظت در برابر بیماری داشته باشد (۱۶ و ۲۳)، در نتیجه استفاده از روش‌های سرم‌شناسی می‌تواند در انجام مراقبت‌های سرمی بسیار مهم باشد. در مطالعات گذشته از روش الایزای غیرمستقیم بر پایه استفاده از پروتئین نوترکیب P32 برای تشخیص سرمی ویروس‌های کاپری‌پاکس استفاده شده است (۲۵، ۵)، اما اطلاعاتی در خصوص سازگاری این روش تشخیصی با استاندارد طلایی که همان VNI است، در دسترس نمی‌باشد. بر اساس هدفی که در این پژوهش دنبال می‌شد، یک گروه از نمونه‌ها از گاوهای دارای سابقه بیماری و یا واکسینه شده، اخذ شد؛ گروه دوم، نمونه‌هایی بودند که از جمعیت دام‌هایی فاقد سابقه‌ی بیماری یا علایم بالینی، اما در معرض عفونت، به عنوان نمونه‌های مجهول گرفته شد و گروه سوم نمونه‌ها از گوساله‌هایی که سابقه‌ای از بیماری و یا مواجه با ویروس را نداشتند، به عنوان شاهد منفی تهیه شد. این رویکرد تا حد قابل توجهی باعث شد تا کارایی الایزا در تشخیص آنتی‌بادی ضد ویروس لامپی‌اسکین جهت استفاده در مراقبت‌های سرمی و مطالعات سرواپیدمیولوژیک مورد ارزیابی قرار گیرد.

اعضای جنس کاپری‌پاکس ویروس از نظر آنتی‌ژنیکی بسیار به هم شبیه هستند به طوری‌که با آزمایشات سرم شناسی نمی‌توان آنها را از یکدیگر تفریق نمود (۹, ۱۵). با این حال، این ویروس‌ها مختص به جنس می‌باشند و تا کنون هیچ موردی از وقوع بیماری بواسطه ویروس‌های آبله گوسفندی و یا آبله بزی در گاو گزارش نشده است (۱۲). لذا در صورتی که با استفاده سیستم الایزا بر پایه پروتئین P32 به عنوان پروتئین مشترک ویروس‌های جنس کاپری‌پاکس ویروس‌ها، در هر یک از گونه‌های گاو، بز و یا گوسفند نمونه‌ای را مثبت اعلام شود، به طور غیر مستقیم می‌توان به وجود آنتی‌بادی اختصاصی به ترتیب علیه ویروس LSD، آبله‌ی بزی و آبله‌ی گوسفندی نسبت داد. در ایران که بیماری آبله گوسفندی و آبله بزی بومی است، تا پیش از سال ۱۳۹۳، هیچ موردی از بیماری لامپی اسکین گزارش نشده است (۱۷, ۱۸). لذا برای انجام این مطالعه واکنش متقاطع با سایر ویروس‌های کاپری‌پاکس و البته ایمنی قبلی در نمونه های مورد مطالعه مورد توجه قرار گرفت. بر این اساس، نمونه‌های مورد استفاده در سال ۱۳۹۳ و قبل از اجرای برنامه واکسیناسیون از دام‌های دارای علایم بالینی اخذ شده بود، استفاده گردید. از این رو، نتایج بدست آمده از آزمایش الایزا و آزمایش شاخص خنثی سازی می تواند تا حدود زیادی کارایی آزمایش الایزا را در تشخیص آنتی‌بادی علیه LSD را نشان دهد.

درصد نمونه‌های دارای آنتی‌بادی‌های ضد ویروس لامپی اسکین در نمونه‌های کنترل مثبت با استفاده از روش تشخیصی VNI و آزمایش الایزا به ترتیب ۱۰۰ و ۹۳ بود. با این حال، در نمونه‌های کنترل منفی، با هر دو روش، هیچ نمونه‌ی سرمی دارای آنتی‌بادی تشخیص داده نشد. این نتیجه با یافته‌های بدست آمده در تعیین حساسیت و ویژگی (به ترتیب ۹۴ و ۹۶ درصد) الایزای مورد استفاده که پیشتر برای این سیستم الایزا گزارش شده بود هم‌خوانی داشت (۱۱). در این راستا، تشخیص آنتی‌بادی در برابر ویروس لامپی‌اسکین بوسیله الایزای غیرمستقیم بر مبنای استفاده از ویروس خالص توسط بابیوک و همکاران نیز انجام شده بود (۳). این محققین نشان دادند علی‌رغم اینکه الایزای راه‌اندازی شده در مقایسه با آزمایش خنثی سازی ویروس (VNI) از حساسیت کمتری در تشخیص برخوردار است ولی به طور کلی نتایج مقایسه این دو تست در تشخیص آنتی‌بادی ضد ویروس لامپی اسکین قابل قبول می‌باشد. بررسی سازگاری

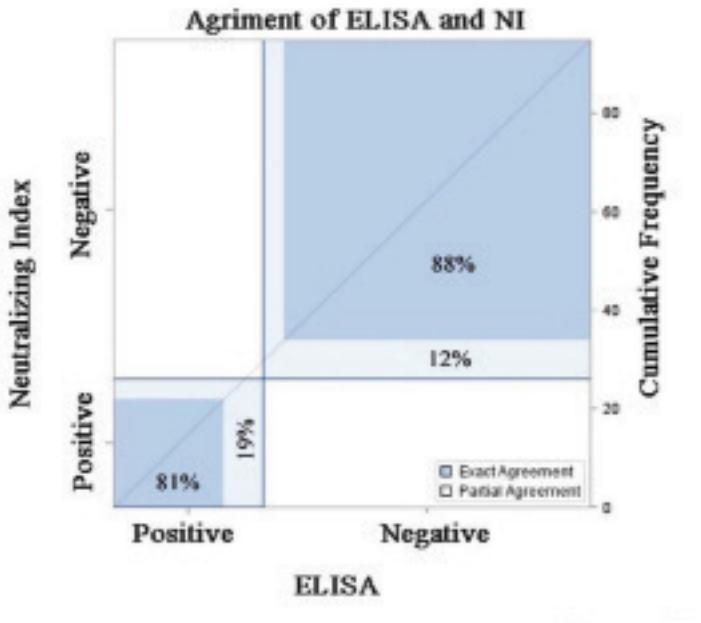


شکل ۲- مقایسه تشخیص نمونه‌های مثبت و منفی بیماری لمپی‌اسکین (LSD) با دو روش اندازه‌گیری شاخص خنثی‌سازی ویروس (VNI) و روش الایزا بر پایه پروتئین نوترکیب P32.

جدول ۲- سازگاری آزمایش خنثی‌سازی ویروس با آزمایش الایزا برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ضدویروس لامپی اسکینو.

پارامتر	مقدار
تعداد نمونه‌های مثبت تشخیص داده شده با هر دو روش	۲۲
تعداد نمونه‌های منفی تشخیص داده شده با هر دو روش	۶۱
تعداد نمونه‌های مثبت تشخیص داده شده با روش VNI و منفی تشخیص داده شده با روش الایزا	۸
تعداد نمونه‌های مثبت تشخیص داده شده با روش الایزا و منفی تشخیص داده شده با روش VNI	۴
شاخص سازگاری کاپا (Kappa)	۰/۷۱
Lower Conf Limit 95%	۰/۵۴
Upper Conf Limit 95%	۰/۸۶

توجـه: شاخص کاپا کمتر یا برابر با صفر نشان دهنده‌ی عدم وجود سازگاری بین دو روش است؛ شاخص کاپا بین ۰/۰۱ تا ۰/۲۰ نشان دهنده‌ی نبود سازگاری تا سازگاری بسیار کم است؛ شاخص کاپا بین ۰/۲۱ تا ۰/۴۰ نشان دهنده‌ی وجود سازگاری ضعیف می‌باشد؛ شاخص خنثی‌سازی بین ۰/۴۱ تا ۰/۶۰ نشان‌دهنده‌ی شاخص خنثی‌سازی قابل توجه است؛ شاخص خنثی‌سازی بین ۰/۸۱ تا ۱/۰۰ نشان دهنده‌ی سازگاری تقریباً کامل است.



شکل ۳- فراوانی تجمعی سازگاری بین شاخص خنثی‌سازی ویروس (VNI) و الایزا بر پایه پروتئین نوترکیب P32 در تشخیص بیماری لامپی‌اسکین (تعداد نمونه = ۹۵).

نتایج حاصل از آزمایش خنثی‌سازی ویروس با نتایج آزمایش الایزا برای تشخیص آنتی‌بادی ضد ویروس لامپی‌اسکین که توأم با حصول شاخص کاپا برابر با ۰/۷۱ بود، نشان از سازگاری مطلوب بین آزمایش الایزا و روش VNI در تشخیص بود.

نتایج آزمایش بر روی نمونه‌های مجهول نشان داد که تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد ویروس لامپی‌اسکین در نمونه‌های سرمی جمع‌آوری شده از گاوهای دارای ندول‌های پوستی (مشکوک به بیماری LSD)، در آزمایش‌های شاخص خنثی‌سازی و الایزا به ترتیب برابر با ۲۸ و ۲۲ درصد بود. همچنین ۸۱ درصد (۱۳ نمونه از ۱۶ نمونه) از نمونه‌های مثبت تشخیص داده شده توسط روش VNI با روش الایزا نیز مثبت تشخیص داده شد که نشان از سازگاری نسبتاً خوب بین این دو روش بود. این در حالی است که بین نمونه‌های کنترل مثبت ۹۳ درصد (۱۳ مورد از ۱۴ مورد) از نمونه‌های مثبت تشخیص داده شده با روش VNI توسط سیستم الایزا نیز مثبت تشخیص داده شد. این اختلاف بین نمونه‌های مجهول و کنترل مثبت در تشخیص با دو روش، احتمالاً مربوط به حساسیت تشخیصی دو روش باشد. از طرفی با توجه به اینکه نمونه‌های مجهول از حیوانات دارای نشانه‌های بالینی بیماری LSD اخذ شده بود، پایین بودن درصد حیوانات مثبت تشخیص داده شده با هر دو روش، کمی چالش برانگیز می‌باشد. این میزان کم شناسایی آنتی‌بادی احتمالاً به زمان خون‌گیری و اخذ نمونه‌های سرمی از گاوهای بیمار بستگی دارد. توپورانین و همکاران (۲۴) نشان دادند که تیترهای آنتی‌بادی در گاوهای تحت تزریق ویروس حاد، در بین روزهای ۱۳ و ۱۹ پس از تزریق به سطح قابل تشخیص می‌رسد. از این رو، احتمالاً نمونه‌برداری در زمان زودتر از این، ممکن است بر نتایج روش تشخیصی اثرگذار باشد. افزون بر این، موافق با یافته‌های پژوهش حاضر، ولید و همکاران (۲) درصد شناسایی آنتی‌بادی ضدویروس لامپی‌اسکین بوسیله الایزای غیرمستقیم بر مبنای استفاده از سوسپانسیون ویروسی که از ۲۵ راس گاو بیمار دارای علایم بالینی و ۲۱ راس گاو تب دار اخذ شده بود را به ترتیب ۵۶ و ۱۱ درصد گزارش کردند. همچنین در مطالعه ای دیگر، ساموئلویک و همکاران (۱۹) نشان دادند که آنتی‌بادی ناشی از واکسیناسیون ضد ویروس لامپی اسکین در ۲۱ روز بعد از واکسیناسیون قابل تشخیص است و بیشترین سطح آنتی‌بادی در ۳۵ روز پس از واکسیناسیون حاصل می‌شود. بنابراین، سطح آنتی‌بادی به زمان نمونه‌برداری از شروع عفونت وابسته است که تشخیص دقیق این زمان در موارد عفونت‌های طبیعی کمی سخت است (۸) و می‌تواند بر نتایج اثر گذار باشد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به مقدار ۰/۷۱ بدست آمده برای کاپا، نتایج الایزای راه‌اندازی شده با پروتئین نوترکیب P32 در تشخیص آنتی‌بادی ضدویروس لامپی اسکین در مقایسه با روش VNI به عنوان آزمایش استاندارد طلایی، از انطباق قابل قبولی برخوردار بود. از این رو، سیستم الایزای راه‌اندازی شده با استفاده از پروتئین نوترکیب P32 ویروس آبله بزی می‌تواند برای تشخیص آنتی‌بادی ضد ویروس لامپی اسکین مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، حساسیت تشخیصی سیستم الایزای مورد استفاده در این مطالعه باید طی فواصل مختلف پس از ایجاد عفونت یا واکسیناسیون ارزیابی شود.

منابع مورد استفاده

1- Al-Salihi. 2014. Lumpy skin disease: Review of literature. *Mirror of research in veterinary sciences animals* 3: 6-23.

2- Awad, W. S., A. K. Ibrahim, K. Mahran, K. M. Fararh and M. I. A. Moniem. 2010. Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of lumpy skin disease in cows. *Tropical animal health production* 42: 777-783.

3- Babiuk, S., D. Wallace, S. Smith, T. Bowden, B. Dalman, G. Parkyn, J. Copps and D. Boyle. 2009. Detection of antibodies against capripoxviruses using an inactivated sheeppox virus ELISA. *Transboundary emerging Disease* 56: 132-141.

4- Bhanot, V., V. Balamurugan, V. Bhanuprakash, G. Venkatesan, A. Sen, V. Yadav, R. Yogisharadhya and R. Singh. 2009. Expression of P32 protein of goatpox virus in Pichia pastoris and its potential use as a diagnostic antigen in ELISA. *Journal of virological methods* 162: 251-257.

5- Bowden, T. R., B. E. Coupar, S. L. Babiuk, J. R. White, V. Boyd, C. J. Duch, B. J. Shiell, N. Ueda, G. R. Parkyn and J. S. Copps. 2009. Detection of antibodies specific for sheeppox and goatpox viruses using recombinant capripoxvirus antigens in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of virological methods* 161: 19-29.

6- Chand, P., R. Kitching and D. Black. 1994. Western blot analysis of virus-specific antibody responses for capripox and contagious pustular dermatitis viral infections in sheep. *Epidemiology Infection* 113: 377-385.

7- Davies, F. 1991. Lumpy skin disease, an African capripox virus disease of cattle. British Veterinary Journal 147: 489-503.

8- Davies, F., H. Krauss, J. Lund and M. Taylor. 1971. The laboratory diagnosis of lumpy skin disease. *Research in Veterinary Science* 12: 123-128.

9- Davies, F. and C. Otema. 1981. Relationships of capripox viruses found in Kenya with two Middle Eastern strains and some orthopox viruses. Research in veterinary science 31: 253-255.

10- Diallo, A. and G. J. Viljoen. Section. 2007. Genus capripoxvirus. 167-181. Poxviruses. Springer;

11- Ebrahimi-Jam, M., H. Keyvanfar, H. Varshovi, M. Seyfi Abad Shapoori and M. Lotfi. 2020. Development and Evaluation of an Indirect Capripox Virus ELISA Based on Truncated P32 Protein expressed in E. coli. *Archives of Razi Institute.*

12- Gari, G., F. Biteau-Coroller, C. LeGoff, P. Caufour and F. Roger. 2008. Evaluation of indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the diagnosis and screening of lumpy skin disease using Bayes-

ian method. *Veterinary microbiology* 129: 269-280.

13- Haegeman, A., A. De Vleeschauwer, I. De Leeuw, D. Vidanović, M. Šekler, T. Petrović, C. Demarez, D. Lefebvre and K. De Clercq. 2019. Overview of diagnostic tools for Capripox virus infections. *Preventive veterinary medicine*: 104704.

14- King, A., M. Adams, E. Carstens and E. Lefkowitz. 2012. International Committee on Taxonomy of Viruses: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.

15- Kitching, R., J. Hammond and D. Black. 1986. Studies on the major common precipitating antigen of capripoxvirus. *Journal of general virology* 67: 139-148.

16- Madhavan, A., G. Venkatesan and A. Kumar. 2016. Capripoxviruses of small ruminants: current updates and future perspectives. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 11: 757-770.

17- OIE. 2017. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals,. Paris, OIE.

18- Sameea Yousefi, P., K. Mardani, B. Dalir-Naghadeh and G. Jalilzadeh-Amin. 2017. Epidemiological study of lumpy skin disease outbreaks in North-western Iran. *Transboundary emerging diseases* 64: 1782-1789.

19- Samojlović, M., V. Polaček, V. Gurjanov, D. Lupulović, G. Lazić, T. Petrović and S. Lazić. 2019. Detection of antibodies against Lumpy skin disease virus by Virus neutralization test and ELISA methods. *Acta Veterinaria* 69: 47-60.

20- Tulman, E., C. Afonso, Z. Lu, L. Zsak, G. Kutish and D. Rock. 2001. Genome of lumpy skin disease virus. *Journal of virology* 75: 7122-7130.

21- Tulman, E., C. Afonso, Z. Lu, L. Zsak, J.-H. Sur, N. Sandybaev, U. Kerembekova, V. Zaitsev, G. Kutish and D. Rock. 2002. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *Journal of virology* 76: 6054-6061.

22- Tuppurainen, E. and C. Oura. 2012. lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transboundary emerging diseases* 59: 40-48.

23- Tuppurainen, E., E. H. Venter, J. Shisler, G. Gari, G. Mekonnen, N. Juleff, N. Lyons, K. De Clercq, C. Upton and T. Bowden. 2017. Capripoxvirus diseases: current status and opportunities for control. *Transboundary emerging diseases* 64: 729-745.

24- Tuppurainen, E. S., E. Venter and J. Coetzer. 2005. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. Onderstepoort *Journal of Veterinary Research* 72: 153-164.

25- Venkatesan, G., M. K. Teli, M. Sankar, A. Kumar, M. Dashprakash, S. Arya, A. Madhavan, M. A. Ramakrisnan and A. B. Pandey. 2018. Expression and evaluation of recombinant P32 protein based ELISA for sero-diagnostic potential of capripox in sheep and goats. *Molecular cellular probes* 37: 48-54.