JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره هشتم، شماره دوم، ۱۳۹۱، پیاپی ۲۵: ۱۰۰-۹۱

# مطالعه سرمی و مولکولی میزان شیوع ویروس نقصان ایمنی گاو (BIV) در گاوداری‌های استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری

**محمدرضا محزونیه[۱]، اعظم مختاری[۲]*، ژان پیر فروسارد[۳]**

*۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران*

*۲- دانشجوی دکترای ویروس شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*

*۳- کارشناس ارشد پژوهش گروه ویروس‌شناسی آژانس آزمایشگاهی دامپزشکی انگلستان (VLA)، ویبریج، انگلستان*

تاریخ دریافت: ۲۷ دی ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۲۱ اسفند ۱۳۹۱

## چکیده

*ویروس نقصان ایمنی گاو (Bovine Immunodeficiency Virus) از خانواده رتروویریده و یکی از مهمترین پاتوژن‌های ویروسی سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی گاو است. در سال‌های اخیر وجود گاوهای شیری و گاومیش‌های آلوده به BIV از مناطق مختلفی در سراسر جهان و از آن جمله ایران گزارش گردیده است. با وجودی که متوسط شیوع سرمی BIV در سراسر جهان در اغلب مطالعات در محدوده‌ی ۴٪ تا ۶٪ گزارش شده است، پژوهش‌های انجام گرفته در مورد شیوع این ویروس در ایران این مقدار را فراتر از این محدوده گزارش نموده‌اند. مطالعه ی حاضر به منظور تعیین شیوع دقیق این ویروس برای پایه‌ریزی مطالعات اپیدمیولوژیک آینده در نواحی مرکزی ایران و به طور اختصاصی دو استان اصفهان و چهارمحال و بختیاری انجام پذیرفت. در این مطالعه نمونه‌های خون ۲۲۹۰ گاو از این دو استان (۴۹۰ گاو از فارم‌های سنتی و ۱۸۰۰ گاو از فارم‌های صنعتی) اخذ شد و پس از آزمون نمونه‌های خون به دو روش الایزا و PCR میزان کلی آلودگی به ویروس BIV در این دو ناحیه ۱/۶۱٪ به دست آمد. میزان شیوع آلودگی در چهارمحال و بختیاری ۵/۷٪ و در اصفهان ۱/۱۲٪ محاسبه شد و میزان آلودگی در دامداری‌های سنتی و صنعتی در این دو ناحیه به ترتیب ۴/۵٪ و ۰/۸۳٪ گزارش گردید. نمونه‌های مثبت شده در آزمون PCR جهت شناسایی ژن pol در BIV و تعیین توالی به آژانس آزمایشگاهی انگلیس، ویبریج (VLA, Weybridge) ارسال شدند و نتایج حاکی از تشابه بیشتر جدایه‌های ایران به سویه ی استاندارد R29 (GenBank NC001413.1) بود.*

***کلمات کلیدی:*** *نقصان ایمنی گاو، شیوع ، PCR، الایزا*

* نویسنده مسئول: اعظم مختاری

آدرس: گروه ویروس‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، تلفن: ۰۳۸۱۴۴۲۴۴۲۷

پست الکترونیک: a.mokhtari@ut.ac.ir

## مقدمه

ویروس نقصان ایمنی گاو (Bovine immunodeficiency virus) از خانواده رتروویریده (Retroviridae) و جنس *لنتی ویروس* (*Lentivirus*) است. این ویروس اولین بار توسط Van der Maaten و همکاران در سال ۱۹۷۲ از یک گاو شیری ۸ ساله با علائم لنفوسیتوز پایدار، هایپرپلازی لنفوئیدی، انسفالوپاتی، ضعف پیشرونده، لنفادنوپاتی و لاغری جدا شد (۳۱). ویروس ابتدا ویروس شبه ویسنا (Visna Like) نام گرفت اما پس از کشف ویروس نقصان ایمنی انسان (HIV) و شناسایی شباهت‌های فراوان بین این دو ویروس، به عنوان ویروس نقصان ایمنی گاو نامگذاری شد (۸، ۲۶و۲۷). تاکنون وجود گاوهای شیری و گاومیش‌های دارای آنتی‌بادی علیه BIV در آمریکای شمالی (۱۸و۲۹)، آمریکای جنوبی (۱۰، ۱۱و ۲۱)، اروپا (۳، ۵، ۱۴- ۱۶، ۲۴، ۲۵و ۲۸) ، آسیا (۴، ۱۲، ۲۱، ۲۳و۳۵)، آفریقا (۱۹) و استرالیا (۲، ۷و۱۳) به اثبات رسیده است. اما متأسفانه در این زمینه پژوهش‌های محدودی در ایران انجام شده است. با وجودی که شیوع سرمی BIV در سراسر جهان بین ۱/۴٪ تا ۶۴٪ گزارش شده است، اما در اغلب مطالعات این میزان در محدوده ۴٪ تا ۶٪ می‌باشد (۱). ویروس‌شناسان در مورد بیماری‌زایی BIV در حیوانات هنوز به توافق نرسیده‌اند. انسفالیت (۲۹و۳۱)، نقص ایمنی (۹و۲۹) و کاهش شیر (۱۸) به این ویروس نسبت داده شده است اما در گوساله‌هایی که به طور تجربی آلوده شده‌اند، این علائم به سختی ایجاد می‌گردند (۳۵).

هدف کلی از انجام این تحقیق کسب اطلاعات اولیه‌ی دقیق در مورد میزان آلودگی با ویروس نقصان ایمنی گاو در مناطق اصفهان و چهارمحال و بختیاری بود و ارتباط فاکتورهای مختلف مثل منطقه، سن، و نوع فارم با میزان شیوع این ویروس مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش کار

### نمونه‌گیری

تعداد ۲۲۹۰ نمونه خون گاو از ۸۴ فارم گاو شیری در نواحی اصفهان (۴۶ فارم) و چهارمحال و بختیاری (۳۸ فارم) اخذ گردید و به وسیله‌ی سانتریفیوژ نمونه‌های سرم از خون کامل جدا شد. استخراج DNA ژنومی ویروس (پرووویروس) از خون با استفاده از کیت جداسازی DNA از خون کامل پستانداران (Roche Applied Science، آلمان) مطابق دستور کارخانه انجام شد. سرم و نمونه‌های DNA تا زمان انجام آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### انجام مطالعه سرمی

نمونه‌های سرم برای تعیین حضور آنتی بادی‌های ضد پروتئین خلال غشایی BIV با آزمون الایزا به روش Scobie و همکاران (۲۰۰۱) مورد آزمایش قرار گرفتند (۲۹). به طور خلاصه، میکروپلیت‌ها یک شب با TMA1 که یکی از پروتئین‌های خلال غشایی BIV است پوشش‌دهی شدند، سپس قالب‌گیری با پودر شیر خشک بدون چربی ۲٪ در TBS-T انجام شد. نمونه‌های سرم به نسبت ۱۰: ۱ در بافر شستشو دارای ۱٪ پودر شیرخشک بدون چربی رقیق شدند. دو تکرار به ازای هر نمونه سرم در نظر گرفته شد. تمام نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردیدند. در مرحله بعد انکوباسیون با آنتی بادی ثانویه کونژوگه موشی ضدIgG گاوی و متصل شده به بیوتین انجام شد و سپس برای تقویت واکنش از آلکالین فسفاتاز متصل به استرپتاویدین استفاده گردید. P- نیتروفنل فسفات به

عنوان کروموژن استفاده شد و جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید. نسبت نمونه به کنترل مثبت (S:P) برای هر نمونه محاسبه گردید.

## انجام روش PCR

حضور پرووویروس BIV در گلبول‌های سفید خون محیطی گاوهای سرم مثبت با آزمایش PCR اختصاصی برای ژن *gag* از این ویروس با استفاده از کیت ( Gene Pak DNA PCR، روسیه) بررسی شد. آزمایش مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و کنترل‌های مثبت و منفی فراهم شده در کیت در هر آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

به طور خلاصه، به هریک از میکروتیوب‌های کنترل مثبت و کنترل منفی حاوی مواد لیوفلیزه آماده برای استفاده و میکروتیوب‌های حاوی Master mix لیوفلیزه مخصوص نمونه‌ها ۱۰ میکرولیتر از محلول PCR diluent فراهم شده در کیت اضافه گردید. سپس به میکروتیوب‌های حاوی Master mix به میزان ۵ میکرولیتر DNA مورد آزمایش اضافه شد و در کنترل منفی و مثبت به جای DNA از آب مقطر استفاده گردید. محتویات میکروتیوب‌ها به وسیله‌ی ورتکس و تا زمان حل شدن کامل ماده‌ی رنگی مخلوط شد و سپس سانتریفوژ جزئی انجام گردید.

در مرحله‌ی بعد به تمام میکروتیوب‌ها ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی فراهم شده در کیت اضافه شد به طوری که روغن کاملاً سطح محلول واکنش را بپوشاند. سپس میکروتیوب‌ها در دستگاه ترمال سایکلر ( Corbett Research، استرالیا) قرار داده شدند و برنامه‌ی PCR مطابق برنامه‌ی پیشنهاد شده توسط سازنده‌ی کیت PCR انجام گردید: ۹۵° C به مدت ۲ دقیقه که با ۴۳ چرخه‌ی دمایی ۹۵° C به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۸° C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه دنبال می شد و در نهایت یک مرحله ی نهایی ۷۴° C به مدت۲ دقیقه.

## تعیین توالی DNA

برای دستیابی به دو مقصود تأیید نتایج PCR اولیه و نیز تعیین توالی نمونه های مثبت شده در دومین آزمون PCR، یک آزمون nested PCR این بار با هدف ازدیاد بخشی از ژن *pol* پرووویروس BIV انجام شد. طراحی پرایمرها برای بخش مشترک این ژن در بین سویه های استاندارد ویروس و پس از بلاست در بانک ژنی NCBI صورت پذیرفت.

هر واکنش به حجم ۵۰ میکرولیتر و محتوی ۲۰۰ µM از هر dNTP، بافر ۱X از Taq پلیمراز Promega محتوی ۵۰ KCl میلی مولار ،Tris-HCl ۱۰ میلی مولار با ۸/۸: pH، ۲/۵ MgCl2 میلی مولار، ۰/۱٪ Trtion X-100 ، ۲ µg/ml ژلاتین، ۰/۷۵ pM از هر پرایمر و ۰/۲۵واحد از DNA پلی مراز Taq (Promega) بود. شرایط دمایی سیکل اول یا سیکل خارجی nested PCR عبارت بود از: ۹۴ ° C به مدت ۲ دقیقه، ۵۳° C به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲° C به مدت ۲ دقیقه که با ۳۶ چرخه ی دمایی ۹۴° C به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۳° C به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲° C به مدت ۱ دقیقه دنبال شد و در نهایت یک مرحله‌ی نهایی ۷۲° C به مدت ۱۰ دقیقه وجود داشت.نام و توالی جفت پرایمرهای بیرونی عبارت بودند از: F:5′- GAA CGG GAA GAT GGA GGA TGT-3′ و R: 5′- GTT AAG GGG TAT AGA GGG ATT TTT-3′.

واکنش لانه گزین یا درونی نیز در حجم ۵۰ میکرولیتر با استفاده از یک میکرولیتر از محصول PCR چرخه ی اول به عنوان الگو، و ۲۰۰ µM از هر dNTP، بافر ۱X از Taqپلیمراز Promega محتوی ۵۰ KCl میلی مولار ،Tris-HCl ۱۰ میلی مولار با ۸/۸: pH، MgCl2 ۳ میلی مولار، ۰/۱٪ Trtion X-100، ۲ µg/ml ژلاتین، ۱ pM از هر پرایمر و ۰/۲۵واحد از DNA پلی مراز Taq (Promega) انجام شد. شرایط دمایی سیکل دوم PCR

عبارت بود از: ۹۴° C به مدت ۲ دقیقه، ۵۱° C به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲° C به مدت ۲ دقیقه که با ۳۶ چرخه ی دمایی ° C ۹۴ به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۱° C به مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲° C به مدت ۱ دقیقه دنبال می شد و در نهایت یک مرحله ی نهایی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه وجود داشت. نام و توالی جفت پرایمرهای درونی عبارت بود از:

F: 5′- ATG CTA ATG GAT TTT AGG GA-3′ و R:5′- CAT TTC TTG GGT GTG AGC TC-3′.

سپس محصولات اختصاصی PCR سیکل دوم به سایز تقریبی ۴۹۱ جفت باز در سیستم تعیین توالی دی داکسی فلورسنت اتوماتیک با استفاده از کیت تعیین توالی ABI Prism با به کارگیری جفت پرایمر درونی اولیه تعیین توالی شدند. داده ها، ویرایش شد و با نرم افزارهای SeqMan Pro version 8.0.2 و MegAlign (DNASTAR, Lasergene) version 8.0.2 ) مورد بررسی قرار گرفت.

## نتایج

### سرولوژی

نسبت‌های S:P بزرگتر از ۰/۱ در الایزا از نظر حضور آنتی‌بادی‌های ضد BIV مثبت در نظر گرفته شدند. چنانچه در جدول ۱ مشخص گردیده است از تعداد ۲۲۹۰ حیوان مورد آزمایش۱/۶۱٪ موارد مثبت بودند. نسبت‌های S:P نمونه‌های مثبت از ۰/۷تا ۱/۸۶ متغیر بود. میزان شیوع سرمی BIV در اصفهان ۱/۱۲٪ و در چهارمحال و بختیاری ۵/۷٪ محاسبه شد. در مجموع نواحی مورد مطالعه میزان شیوع آلودگی در فارم‌های سنتی ۴/۵٪ و در فارم‌های صنعتی ۰/۸۳٪ گزارش گردید. توزیع سنی آلودگی در فارم‌های سنتی (۴۹۰گاو) نیز مورد بررسی قرار گرفت و میزان شیوع در حیوانات زیر ۲ ، ۲-۴ ، ۴-۶ ، ۶-۸ سال به ترتیب ۱/۶، ۷/۵، ۵/۹، ۲/۶٪ به دست آمد. بیشترین میزان آلودگی از نظر سنی در گروه سنی ۲-۴ سال مشاهده شد (۷۷/۳٪). برای مشاهده نتایج مربوط به توزیع سنی به جدول۲ مراجعه کنید.

### PCR

ژن *gag* پرورویروس BIV در ژنوم سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) ۳۷ حیوان سرم مثبت جستجو شد و محصولات PCR که باندی هم اندازه با باند کنترل مثبت (۲۹۸bp) داشتند مثبت در نظر گرفته شدند. تمام نمونه‌های سرمی مثبت در آزمون PCR نیز نتیجه مثبت نشان دادند و بین نتایج سرمی و مولکولی هماهنگی وجود داشت.

### تعیین توالی

توالی نوکلئوتیدی قطعه‌ی ۴۵۱ نوکلئوتیدی از ژن *pol* از ۶ نمونه از مواردی که در آزمون PCR نتیجه‌ی مثبت نشان داده بودند تعیین شد و با اطلاعات منتشر شده از سویه‌ها (GenBank NC001413.1) R29، (GenBank L06524.1) FL112 و FL491 (GenBank L06525.1) در بانک ژنی NCBI و نیز با یکدیگر مقایسه شدند. سکانس ۵ جدایه ایرانی مشابه با یکدیگر بود اما یکی از جدایه‌ها در ۳ جایگاه نوکلئوتیدی توالی متفاوتی نشان داد: (4-A/T,412- C/T, 430-C/G). ۵ جدایه ایرانی (۱، ۲، ۷، ۸ و۹) ۱۰۰ ٪ با جدایه (GenBank NC001413.1) R29، ۹۹,۳٪ با ششمین جدایه ایرانی (۶) و ۹۱,۱٪ با جدایه‌های FL112(L06524.1) و FL491 (L06525.1) مشابهت داشتند.

توالی آمینواسیدی ترجمه شده (۱۵۰ آمینواسید) نیز مورد بررسی قرار گرفت و ۲ جایگاه متفاوت در توالی جدایه ۶ در مقایسه با پنج جدایه دیگر درآمینواسید اول (فنیل آلانین به جای لوسین) و آمینواسید ۱۴۳ (آسپارژین به جای گلوتامین) مشاهده شد.

## بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه میزان آلودگی به BIV در مناطق چهارمحال و بختیاری و اصفهان از نظر سرمی و مولکولی بررسی گردید و فیلوژنی جدایه‌های ایرانی در مقایسه با سایر سویه‌های استاندارد این ویروس در جهان مورد بررسی قرار گرفت. تشابه جدایه‌های ایرانی با سویه استاندارد R29 (GenBank NC001413.1)، با مطالعه انجام شده توسط نیکبخت بروجنی و همکاران (۲۶) مطابقت داشت. میزان شیوع کلی BIV (۱/۶۱٪) و شیوع بر حسب منطقه‌ی مورد بررسی (در اصفهان و در چهارمحال و بختیاری به ترتیب۱/۱۲٪ و ۵/۷٪) با دامنه‌ی غالب شیوع آلودگی به BIV گزارش شده از سراسر جهان (۴-۶٪) انطباق داشت اما با میزان شیوع گزارش شده از ایران توسط نیکبخت بروجنی و همکاران (۲۰/۳٪) و تاجبخش و همکاران (۶۰٪) هماهنگی نشان نمی‌داد (۲۶، ۳۸-۳۴). دلایل این اختلاف را می‌توان به کوچک بودن حجم نمونه در مطالعات برشمرده شده، تفاوت آزمون‌های مورد استفاده برای شناسایی حضور آلودگی BIV و تفاوت-های اپیدمیولوژیک مناطق مورد بررسی نسبت داد.

**جدول ۱: موارد BIV سرم مثبت با استفاده از الایزا در اصفهان و چهارمحال و بختیاری**

| استان | فارم‌های غیر صنعتی | | فارم‌های صنعتی | | جمع کل | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | تعداد | موارد مثبت | تعداد | موارد مثبت | تعداد | موارد مثبت |
| اصفهان | ۲۴۸ | ۸ (٪۳/۳) | ۱۵ (٪۰/۸۳) | ۱۸۰۰ | ۲۰۴۸ | ۲۳ (٪۱/۱۲) |
| چهارمحال و بختیاری | ۲۴۲ | ۱۴ (٪۵/۷) | ۰ (٪۰) | ۰ | ۲۴۲ | ۱۴ (٪۵/۷) |
| جمع کل | ۴۹۰ | ۲۲ (٪۴,۵) | ۱۵ (٪۰/۸۳) | ۱۸۰۰ | ۲۲۹۰ | ۳۷ (٪۱/۶۱) |

**جدول ۲:توزیع سنی موارد سرمی مثبت در فارم‌های سنتی نواحی اصفهان و چهارمحال و بختیاری**

| سن (سال) | تعداد موارد مثبت در استان چهار محال و بختیاری | تعداد موارد مثبت در استان اصفهان | تعداد موارد سرم منفی | تعداد موارد سرم مثبت (درصد) |
|---|---|---|---|---|
| <۲ | ۲ | ۰ | ۱۲۱ | ۲(٪۱/۶) |
| ۲-۴ | ۵ | ۴ | ۱۲۰ | ۹(٪۷/۵) |
| ۴-۶ | ۴ | ۴ | ۱۳۵ | ۸ (٪۵/۹) |
| ۶-۸ | ۳ | ۰ | ۱۱۴ | ۳(٪۲/۶) |
| جمع کل | ۱۴ | ۸ | ۴۹۰ | ۲۲ (٪۴/۵) |

در مطالعه حاضر، برای غربال کردن نمونه‌ها از الایزا که ازحساس‌ترین روش‌های سرمی مورد تایید برای تشخیص BIV است، استفاده گردید و حساسیت آزمون با استفاده از میل ترکیبی بالای بیوتین و استرپتاویدین افزایش یافت. در بین اهداف آنتی ژنی بالقوه‌ای که برای پوشش‌دهی اولیه‌ی پلیت‌های الایزا مورد استفاده قرار گرفته‌اند پروتئین TM خصوصاً نوع حلقوی شده‌ی آن (۲۹) سریع‌ترین و قوی‌ترین پاسخ آنتی بادی را بر می‌انگیزد. به طور کلی پاسخ آنتی بادی ضد BIV-TM از ۲-۴ هفته پس از آلودگی شروع شده، در هفته ۱۰-۳۰ پس از عفونت به حداکثر مقدار خود می‌رسد و تا ۵۰ هفته پس از عفونت قابل تشخیص است. به همین دلیل امکان ردیابی آلودگی در طولانی مدت را فراهم می‌آورد. متاسفانه در زمان انجام این مطالعه کیت‌های تجاری الایزا بر مبنای پوشش‌دهی این پپتید در دسترس نبود. از سویی براساس گزارش McNab و همکاران (۲۰۱۰) DNA پرووِیروس در گلبول‌های سفید تک هسته‌ای خون محیطی از ۴ روز پس از عفونت تا ۶۵ روز پس از عفونت قابل تشخیص بوده و بعد از این مدت نیز این DNA پرووِیروس در PBMC به میزانی که اغلب غیر قابل تشخیص است وجود دارد. از سویی ادغام شدن ژنوم ویروس در ژنوم سلول امکان حضور همیشگی ویروس در بدن میزبان و بروز دوره‌های فعال شدن ویروس به دنبال مساعد شدن شرایط را فراهم می‌کند (۱۹). باتوجه به اینکه خونگیری از دام‌های سرم مثبت از نظر حضور آنتی بادی ضد BIV و انجام آزمون PCR برای تایید نتایج در فاصله زمانی کمتر از یک ماه از حصول نتایج سرمی انجام گردیده است هماهنگی نتایج این دو آزمون بعید نمی‌نماید. بدیهی است با استفاده همزمان از دو روش مولکولی و سرمی تایید شده برای تشخیص BIV حساسیت و ویژگی بالایی به دست می‌آید. در مطالعه‌ی حاضر دو روش مولکولی و سرمی به طور همزمان برای تعیین حضور ویروس استفاده شده است، چرا که با توجه به کوتاه بودن بازه‌ی زمانی تشخیص پرووِیروس BIV در PBMC به نظر نمی‌رسد صرف انجام آزمون PCR، ارزیابی دقیقی از میزان آلودگی به دست بیاید. در دو مطالعه‌ی قبلی انجام شده در مورد میزان شیوع BIV در ایران جستجوی پرووِیروس BIV به روش nested PCR انجام شده است و مقادیر نسبتاً بالایی برای میزان نمونه‌های BIV مثبت ارائه گردیده است و این مقدار بالای آلودگی در مطالعه‌ی نیکبخت بروجنی و همکاران (۳۴) با میزان آلودگی در کشورهای آسیایی و اروپایی همسایه ایران نظیر پاکستان (۲۳و۳۵)، کره (۴) و ترکیه (۲۴) نسبتاً هم خوانی دارد و با مشابهت‌های اپیدمیولوژیک این نواحی قابل توجیه است اما میزان بالای آلودگی BIV در گاوهای استان چهارمحال و بختیاری در مطالعه‌ی تاجبخش و همکاران (۲۶) به میزان شیوع سرمی در ایالت می‌سی‌سی‌پی آمریکا (۲۸) و در زمانی که نظارت دامپزشکی در این ایالت ضعیف بوده است نزدیک می‌باشد. این میزان آلودگی در محدوده‌ی میانگین شیوع جهانی BIV، شیوع در کشورهای آسیایی و میزان آلودگی به دست آمده در این مطالعه قرار ندارد. با استفاده از PCR برای پرویروس BIV آلودگی در مراحل بسیار اولیه (از ۴ روز پس از آلودگی) در گلبول‌های سفید خون محیطی قابل تشخیص است اما بازه‌ی حضور قابل تشخیص پرویروس کوتاه بوده و به نظر نمی‌رسد چنین میزان بالایی از آلودگی تنها به کمک آزمون تشخیصی PCR برای پرووِیروس قابل استحصال باشد. در مطالعه تاجبخش و همکاران از وضعیت نظارت دامپزشکی در نواحی اخذ نمونه و نوع فارم‌های مورد بررسی و میزان تراکم دام‌ها در فارم

اطلاعاتی در دست نیست و به نظر می‌رسد بررسی بیشتری در مورد میزان بالای آلودگی در سال ۲۰۰۹ میلادی در استان چهارمحال و بختیاری باید انجام پذیرد.

با توجه به اهمیت این ویروس در کاهش بازده تولید حیوان و افزایش خطر ابتلای دام آلوده به BIV به سایر عفونت‌های فرصت طلب و با مقایسه‌ی نتایج متفاوت بررسی‌های انجام شده در مورد شیوع BIV در ایران، به نظر می‌رسد، انجام مطالعات دقیق‌تر و دربرگیرنده‌ی تعداد بیشتری از دام‌ها از انواع فارم‌های متداول در ایران و در دامنه‌ی وسیع‌تری از نواحی کشور برای به دست آوردن اطلاعات دقیق در مورد میزان شیوع و چگونگی توزیع آلودگی به ویروس BIV ضروری است.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله حاضر ازحمایت‌های مالی و اجرایی دانشگاه شهرکرد صمیمانه سپاسگزاری می نمایند.

## منابع

1. Belloc, C., Polack, B., Schwartz-Cornil, I., Brownlie, J., Levy, D. (1996). Bovine immunodeficiency virus: facts and questions. *Veterinary Research* **27**: 395-402.
2. Burkala, E.J., Ellis, T.M., Voigt, V., Wilcox, G.E. (1999). Serological evidence of an Australian bovine lentivirus. *Veterinary Microbiology* **68**: 171-7.
3. Cavirani, S., Donofrio, G., Chiocco, D., Foni, E., Martelli, P., Allegri, G., Cabassi, C.S., De Iaco, B., Flammini, C.F. (1998). Seroprevalence to bovine immunodeficiency virus and lack of association with leukocyte counts in Italian dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine* **37**: 147-57.
4. Cho, K.O., Meas, S., Park, N.Y., Kim, Y.H., Lim, Y.K., Endoh, D., Lee, S.I., Ohashi, K., Sugimoto, C., Onuma, M. (1999). Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus in dairy and beef cattle herds in Korea. *The Journal of Veterinary Medical Science* **61**: 549-51.
5. Clayton, J. (1994). Spectre of AIDS haunts reports of sick cows. *Nature* **367**: 585.
6. Flaming, K., Van der Maaten, M., Whetstone, C., Carpenter, S., Frank, D., Roth, J. (1993). Effect of bovine immunodeficiency-like virus infection on immune function in experimentally infected cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **36**: 91-105.
7. Forman, A.J., Gibson, C.A., Rodwell, B.J. (1992). Serological evidence for the presence of bovine lentivirus infection in cattle in Australia. *Australian Veterinary Journal* **69**: 337.
8. Gonda, M.A., Braun, M.J., Carter, S.G., Kost, T.A., Bess, J.W. Jr, Arthur, L.O., Van der Maaten, M.J. (1987). Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. *Nature* **330**: 388-91.
9. Gonda, M.A., Luther, D.G., Fong, S.E., Tobin, G.J. (1994). Bovine immunodeficiency virus: molecular biology and virus-host interactions. *Virus Research* **32**: 155-81.
10. González, E.T., Licursi, M., Vila Roza, V., Bonzo, E., Mortola, E., Frossard, J.P., Venables, C. (2008). Evidence of bovine immunodeficiency virus (BIV) infection: serological survey in Argentina. *Research in Veterinary Science* **85**: 353-8.
11. Hidalgo, G., Flores, M., Bonilla, J.A. (1995). Detection and isolation of bovine immunodeficiency-like virus (BIV) in dairy herds of Costa Rica. *Zentralbl Veterinarmed* **42**: 155-61.
12. Hirai, N., Kabeya, H., Ohashi, K., Sugimoto, C., Onuma, M. (1996). Detection of antibodies against bovine

immunodeficiency-like virus in daily cattle in Hokkaido. *The Journal of Veterinary Medical Science* **58**: 455-7.

13. Horner, G.W. (1991). Serologic evidence of bovine immunodeficiency-like virus and bovine syncytial virus in New Zealand. *Surveillance* **18**: 9.
14. Horzinek, M., Keldermans, L., Stuurman, T., Black, J., Herrewegh, A., Sillekens, P., Koolen, M. (1991). Bovine immunodeficiency virus: immunochemical characterization and serological survey. *Journal of General Virology* **72**: 2923-8.
15. Kolotvin, V.V., Grinenko, N.F., Piskareva, L.M., Pashvykina, G.V., Shaikhaev, G.O., Al'tshtein, A.D., Valikhov, A.F. (2007) Distribution of bovine immunodeficiency virus in herds of Moscow region and Stavropol krai. *Russian Agricultural Sciences* **1**: 54-6.
16. Madic, J., BiukRudan, N., Scobie, L., Venables, C., Cac, Z., Lojkic, M., Cvetnic, S. (2001). Serologic evidence for bovine immunodeficiency virus infection in Croatia. *Periodicum Biologorum* **103** (2): 191-2.
17. Martin, S.J., O'Neill, T.P., Bilello, J.A., Eiseman, J.L. (1991). Lymphocyte transformation abnormalities in bovine immunodeficiency-like virus infected calves. *Immunology Letters* **27**, 81-4.
18. McNab, W.B., Jacobs, R.M., Smith, H.E. (1994). A serological survey for bovine immunodeficiency-like virus in Ontario dairy cattle and associations between test results, production records and management practices. *Canadian Journal of Veterinary Research* **58**: 36-41.
19. McNab, T.J., (2010) An Analysis of Bovine immunodeficiency virus and Jembrana disease virus Infections in Bos javanicus. *Thesis for the degree of Doctor of Philosophy*, 75-89.
20. Meas, S., Nakayama, M., Usui, T., Nakazato, Y., Yasuda, J., Ohashi, K., Onuma, M. (2004). Evidence for bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Zambia. *The Japanese Journal of Veterinary Research* **52**: 3-8.
21. Meas, S., Ohashi, K., Tum, S., Chhin, M., Te, K., Miura, K., Sugimoto, C., Onuma, M. (2000). Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *The Journal of Veterinary Medical Science* **62**: 779-81.
22. Meas, S., Ruas, J., Farias, N.A., Usui, T., Teraoka, Y., Mulenga, A., Chang, K.S., Masuda, A., Madruga, C.R., Ohashi, K., Onuma, M. (2002). Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle. *Japanese Journal of Veterinary Research* **50**: 9-16.
23. Meas, S., Seto, J., Sugimoto, C., Bakhsh, M., Riaz, M., Sato, T., Naeem, K., Ohashi, K., Onuma, M. (2000). Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *The Journal of Veterinary Medical Science* **62**: 329-31.
24. Meas, S., Yilmaz, Z., Usui, T., Torun, S., Yesilbag, K., Ohashi, K., Onuma, M. (2003). Evidence of bovine immunodeficiency virus in cattle in Turkey. *Japanese Journal of Veterinary Research* **51**: 3-8.
25. Muluneh, A. (1994). Seroprevalence of bovine immunodeficiency-virus (BIV) antibodies in the cattle population in Germany. *Zentralbl Veterinarmed* **41**: 679-84.
26. Nikbakht Borujeni, G., Taghi Poorbazargani, T., Nadin-Davis, S., Tolooie, M., Barjesteh, N. (2010). Bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus and their mixed infection in Iranian Holstein cattle. *Journal of Infection in Developing Countries* **9**: 576-9.
27. Onuma, M., Koomoto, E., Furuyama, H., Yasutomi, Y., Taniyama, H., Iwai, H., Kawakami, Y. (1992). Infection and dysfunction of monocytes induced by

*African Journal of Microbiology Research* **12**: 1199-202.
35. Usui, T., Meas, S., Konnai, S., Ohashi, K., Onuma, M. (2003). Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in dairy and beef cattle in hokkaido. *The Journal of Veterinary Medical Science* **65**: 287-9.
36. Van der Maaten, M.J., Boothe, A.D., Seger, C.L. (1972). Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis. *Journal of the National Cancer Institute* **49**: 1649-57.
37. Yesilbag, K., Yilmaz, Z., Gungor, B. (2008). Prevalence of antibodies to bovine respiratory viruses in cattle infected with bovine immunodeficiency virus. *The Veterinary Record* **162**: 660-1.
38. Zhang, S., Wood, C., Xue, W., Krukenberg, S.M., Chen, Q., Minocha, H.C. (1997). Immune suppression in calves with bovine immunodeficiency virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **4**: 232-5.

experimental inoculation of calves with bovine immunodeficiency-like virus. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **5**: 1009-15.
28. Rola-Łuszczak, M., Kozaczyńska, B., Kuźmak, J. (2011). Serological survey for bovine immunodeficiency virus in dairy cattle from Poland. *Poland Journal of Veterinary Scienc* **14**: 579-83.
29. Scobie, L., Venables, C., Sayers, A.R., Weightman, S., Jarrett, O. (2001). Prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Great Britain. *The Veterinary Record* **149**: 459-60
30. Snider, T.G., Luther, D.G., Jenny, B.F., Hoyt, P.G., Battles, J.K., Ennis, W.H., Balady, J., Blas-Machado, U., Lemarchand, T.X., Gonda, M.A. (1996). Encephalitis, lymphoid tissue depletion and secondary diseases associated with bovine immunodeficiency virus in a dairy herd. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* **19**: 117-31.
31. Snider, T.G., Coats, K.S., Storts, R.W., Graves, K.F., Cooper, C.R., Hoyt, P.G., Luther, D.G., Jenny, B.F. (2003). Natural bovine lentivirus type 1 infection in Holstein dairy cattle. II. Lymphoid tissue lesions. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* **26**: 1-15.
32. Stcyr Coats, K., Pruett, S.B., Nash, J.W., Cooper, C.R. (1994). Bovine immunodeficiency virus: incidence of infection in Mississippi dairy cattle. *Veterinary Microbiology* **42**: 181-9.
33. Suarez, D.L., VanDerMaaten, M.J., Wood, C., Whetstone, C.A. (1993). Isolation and characterization of new wild-type isolates of bovine lentivirus. *Journal of Virology* **67**: 5051-5.
34. Tajbakhsh, E., Nikbakht Borujeni, G., Momtazan, H., Amirmozafari, N. (2010). Molecular prevalence for bovine immunodeficiency virus infection in Iranian cattle population.

*Journal of Veterinary Microbiology, Volume 8, Issue 2, 2012*

# Serologic and Molecular Studies on Prevalence of Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) Infection in Cattle in Chahrmahal va Bakhtiari and Isfahan Provinces

***Mahzounieh, M.[1*], Mokhtari, A.[2], Pierre Frossard, J.[3]***

*1- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran*
*2- Ph.D. student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
*3- Research Officer, Veterinary Laboratory Agency (VLA), Weybridge, UK*

*Received Date: 16 Jan 2013* *Accepted Date: 11 Mar 2013*

***Abstract***

*Bovine immunodeficiency virus (BIV) is a virus of Retroviridae family and one of the most important immunosuppressive viral pathogens of cattle. In the recent years, BIV infected cattle and buffalo have been found around the world and also in Iran. Although most of global BIV sero-prevalence rates were reported in the range of 4% to 6%, the studies conducted in Iran report higher rates (20.3% and 60%) than worldwide rates. This study was conducted to identify the prevalence of BIV in the central areas of Iran, particularly Isfahan and Charmahal va Bakhtiari provinces for the foundation of future epidemiological studies. In this study a total of 2290 blood samples were collected from dairy farms in these provinces (490 and 1800 cattle of non- industrial and industrial farms respectively). By using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) test, the overall rate of BIV infection was 1.61%. For the Charmahal va Bakhtiari and Isfahan areas BIV prevalence was 5.7% and 1.12% respectively. The prevalence of BIV positive cattle in non-industrial and industrial dairy farms was 4.5% and 0.83%, respectively. The positive samples for the presence of proviral BIV pol gene were sent to Veterinary Laboratories Agency (VLA) to be sequenced. The results showed Iranian isolates were 100% similar to standard R29 strain (GenBank NC001413.1).*

***Keywords:*** *BIV, Prevalence, PCR, ELISA*

**Corresponding author: Mokhtari, A.*
*Address: Ph.D. student of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Tel : 0381-44244270*
*Email: a.mokhtari@ut.ac.ir*