

## بررسی حضور آنتی‌بادی ضد زونا پلوسیدا در سرم خون گاوهای شیری هلشتاین مبتلا به تکرر فحلی

امیر علی کاوه<sup>۱\*</sup>، حسین نیک‌نیاز<sup>۲</sup>

۱- دانشگاه آزاداسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، استادیار گروه علوم درمانگاهی، تبریز، ایران.  
 ۲- دانشگاه آزاداسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، تبریز، ایران.  
 \*نویسنده مسئول مکاتبات: dr.kaveh@iaut.ac.ir  
 (دریافت مقاله: ۹۳/۱/۱۷ پذیرش نهایی: ۹۳/۳/۴)

### چکیده

این مطالعه به منظور بررسی وجود آنتی‌بادی ضد زونا پلوسیدا در سرم گاوهای هلشتاین مبتلا به تکرر فحلی در ایستگاه سوم پرورش گاو شیری شرکت کشت و صنعت و دامپروری مغان صورت گرفت. تحقیق روی ۱۶۸ رأس گاو ماده غیر آبستن با تاریخچه ابتلا به تکرر فحلی (Repeat breeder) انجام گردید. دام‌های انتخاب شده از نظر سنی به دو گروه زیر سه شکم زایمانی و بالای سه شکم زایمانی انتخاب گردیدند. از هریک از دام‌ها ۱۰ میلی‌لیتر خون از ورید وداج اخذ شد و سرم آنها جدا گردید. وجود آنتی‌بادی‌های ضد ZP در سرم دام‌ها توسط کیت‌های تجاری آزمایش ELISA (بیوسرو دیاگنوستیکا، زونا پلوسیدا آنتی‌بادی ELISA-20-BS-20 20 آلمان) آزمایش گردید. از تعداد کل ۱۶۸ رأس دام مورد آزمایش ۱۳ رأس دارای آنتی‌بادی ضد زونا پلوسیدا (تیترا مثبت) و تعداد ۱۵۵ رأس فاقد آنتی‌بادی (تیترا منفی) بودند که به ترتیب ۷/۷۴ درصد دارای تیترا مثبت و ۹۲/۲۶ درصد بدون تیترا بودند. از لحاظ تقسیم‌بندی سنی، از تعداد کل ۱۶۸ رأس دام تحت مطالعه، ۱۰۹ رأس زیر سه شکم زایمان بوده و ۵۹ رأس بالای سه شکم زایمان بودند. از تعداد ۱۰۹ رأس دام زیر سه شکم ۵ رأس دارای آنتی‌بادی ضد زونا پلوسیدا (تیترا مثبت) و از تعداد ۵۹ رأس دام بالای سه شکم زایمان، ۸ رأس دارای آنتی‌بادی ضد زونا پلوسیدا (تیترا مثبت) بودند. نتایج نشان داد با احتمال ۹۹٪ تفاوت بسیار معنی‌داری بین دو گروه زیر شکم ۳ و بالای شکم ۳ وجود دارد ( $Z=2/07$ ) و این به معنای آن است که افزایش سن تاثیر معنی‌داری در میزان ظهور آنتی‌بادی ضد زونا پلوسیدا در سرم این دسته از دام‌ها دارد.

نشریه آسیب‌شناسی درمانگاهی دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۷، شماره ۴، پیاپی ۲۸، صفحات ۳۳۲-۳۳۹

کلیدواژه‌ها: آنتی‌بادی، زونا پلوسیدا، تکرر فحلی، هلشتاین

**مقدمه**

در صنعت دامپروری امروز میزان باروری و زاد و ولد دام‌ها بسیار حائز اهمیت است چراکه کاهش باروری هم در پرورش گاوهای شیری و هم در پرورش گوساله‌های گوشتی باعث زیان‌های اقتصادی فراوانی می‌شود و به‌طور کلی می‌توان گفت که میزان باروری از ارکان اصلی این صنعت می‌باشد.

امروزه برای شناخت دلایل ناباروری یا کم‌باروری مطالعات زیادی صورت گرفته است که اغلب هم به نتایج چشمگیری منتهی گردیده است. یکی از دلایل ناباروری اختلال در اتصال اسپرم‌ها به تخمک می‌باشد. لایه شفاف دور تخمک پستانداران یا زونا پلوسیدا (ZP) در این اتصال نقش مهمی دارد ( Barber and Lee, 2001).

زونا پلوسیدا ماتریکس خارج سلولی است که اووسیت پستانداران را احاطه می‌نماید. در اغلب گونه‌های پستانداران این ماتریکس شامل سه گروه گلیکوپروتئینی است که احتمالاً تغییرات ثانویه‌ای را جهت کسب خصوصیات ایمونولوژیکی و بیوشیمیایی متفاوت، تحمل می‌کنند (Wassarman, 1999). زونا پلوسیدا در تشخیص و اتصال اسپرم به اووسیت دخالت دارد و به سبب نقش عمده آن در روند باروری (واکنش با اسپرم، القای واکنش آکروزوم، کنترل جمعیت اسپرم‌ها)، به عنوان یک آنتی‌ژن برای القای پاسخ ایمونولوژیکی برای باروری جنس ماده استفاده شده است. زونا پلوسیدا دیواره‌ای کروی حول اووسیت تشکیل می‌دهد که دارای ضخامت یکسان در هر گونه می‌باشد (دسته‌بندی  $10-5 \mu m$  در پستانداران). (Wassarman, 1999; Barber, 2001) این دیواره از ۳

پروتئین اصلی تشکیل شده است که در بسیاری از گونه‌ها مورد مطالعه قرار می‌گیرند: ZP<sub>1</sub>، ZP<sub>2</sub> و ZP<sub>3</sub>. ایمن کردن ماده‌ها با گلیکوپروتئین‌های ZP منجر به مهار باروری در بسیاری از مدل‌های حیوانی می‌گردد. مطالعات روی ایمنی‌زایی فعال با آنتی‌بادی‌های ضد ZP آشکار کرده است که در بیشتر گونه‌های حیوانی ایمن شده، ناباروری موقتی می‌تواند در طول افزایش تیتراهای آنتی‌بادی رخ دهد که همیشه با نارسایی تخمدان و تغییرات تخریبی در فولیکول‌های تخمدانی مرتبط می‌باشد. وقتی آنتی‌ژن‌های بومی از گونه‌های متفاوت و ناهمسان برای ایمنی‌زایی استفاده شوند، حیوانات ایمن اغلب ایجاد آنتی‌بادی‌های ضد ZP خودواکنشی می‌کنند و این وضعیت منجر به ناباروری می‌گردد ( Briggs et al., 1999; Garza et al., 1998; Hirsch et al., 1998; Kolle et al., 1998; Skinner et al., 2004; Topper et al., 2007).

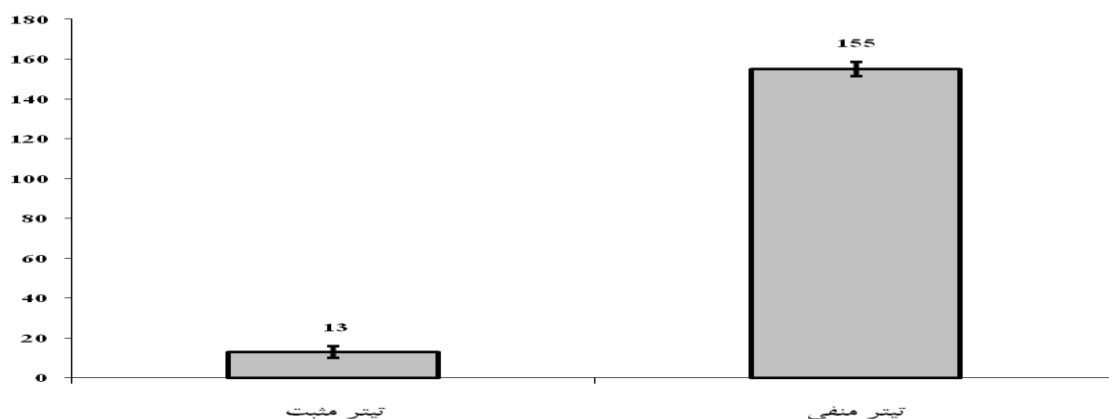
واضح است که ZP های اخذ شده از گونه‌های بسیاری از پستانداران به‌صورت نزدیکی شبیه به هم می‌باشند (۹۰-۴۰٪). این ZP ها از یک تعداد حیوانات جدا شده و شناسایی گردیدند و شباهت قابل توجهی در گونه‌های حیوانی در مطالعات گذشته وجود دارد. برای مثال، شباهت بین پروتئین‌های ZP گاوی و خوکی به ۸۳٪ می‌رسید (Wassarman, 1999).

کاهش باروری اصولاً به تداخل آنتی‌بادی با پیوند اسپرم - تخمک نسبت داده می‌شود که موجب عدم لقاح می‌گردد. با این حال، برخی از اختلالات تخمدانی، کاهش در وزن تخمدان و رشد فولیکولی و تفاوت فولیکولی غیرطبیعی نیز گزارش شده‌اند. همچنین مدارکی از آنتی‌بادی‌های ضد ZP پلی‌کلونال که ممکن است از نفوذ اسپرم به ZP ممانعت به عمل بیاورد ولی

تاریخچه دامها از نظر بروز سخت‌زایی و جفت‌ماندگی و سایر عفونت‌های رحمی مثل آندومتریت و متریت از قسمت ثبت مشخصات مجتمع جمع‌آوری گردید. از هریک از دامها ۱۰ میلی‌لیتر خون از ورید و داج گرفته شد و پس از انتقال نمونه‌ها در یخچال به آزمایشگاه، نمونه‌های خونی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در ثانیه سانتریفیوژ شده و سرم آنها جدا گردید. نمونه‌های سرمی به دست آمده تا زمان آزمایشات در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگه‌داری شد. وجود آنتی‌بادی‌های ضد ZP در سرم دامها توسط کیت تجاری آزمایش ELISA (بیوسرو دیاگنوستیکا، زونا پلوسیدا آنتی‌بادی ELISA، BS-20-20 آلمان) آزمایش گردید. جهت آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شد. فرضیه اول به صورت توصیفی بیان شد و برای فرضیه دوم از روش آماری آزمون نسبت‌ها استفاده گردید.

### یافته‌ها

از تعداد کل ۱۶۸ رأس دام مورد آزمایش ۱۳ رأس دارای آنتی‌بادی ضد زونا پلوسیدا (تیترا مثبت) و تعداد ۱۵۵ رأس فاقد آنتی‌بادی (تیترا منفی) بودند که به ترتیب ۷/۷۴٪ دارای تیترا مثبت و ۹۲/۲۶٪ بدون تیترا بودند.

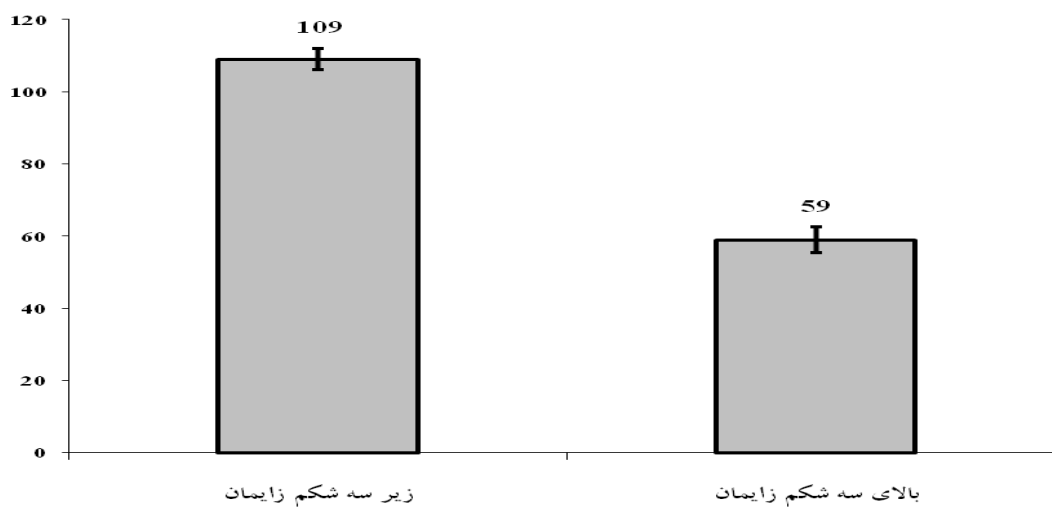


نمودار ۱- نمودار دام‌های تیترا مثبت و منفی آنتی‌بادی ضد زونا پلوسیدا

اثری روی اتصال اسپرم به ZP نداشته باشد، وجود دارد (Mahi-Brown, 2008; Hasegawa, 2002; Barber ) (and Fayerer-Hasken, 2000).

### مواد و روش‌ها

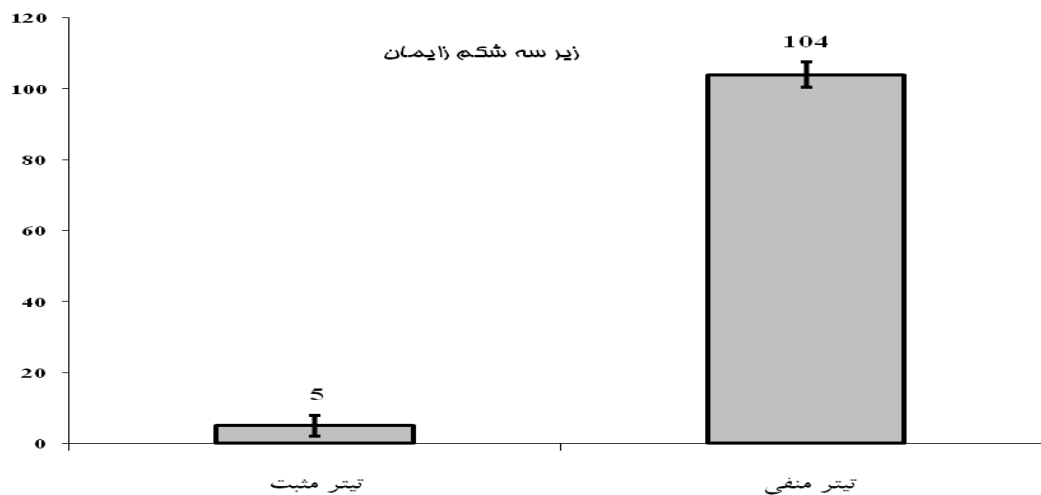
این مطالعه در ایستگاه سوم پرورش گاو شیری شرکت کشت و صنعت و دامپروری مغان صورت گرفت. تعداد ۲۰۰ رأس گاو ماده غیر آبستن هلشتاین به طور تصادفی و با تاریخچه ابتلا به تکرر فحلی (Repeat breeder) انتخاب گردیدند. ملاک ابتلا به تکرر فحلی تعداد تلقیح بیش از سه بار در دوره بعد از آخرین زایمان در نظر گرفته شد. ماده گاوهای انتخاب شده از نظر سنی از دو رده زیر سه شکم زایمانی و بالای سه شکم زایمانی انتخاب گردیدند. وضعیت تولید مثلی گاوها توسط روش اولتراسونوگرافی و راست روده‌ای مورد بررسی قرار گرفت. دامهای تحت مطالعه از نظر سایر بیماری‌ها مانند ورم پستان، لنگش، پنومونی، اختلالات دستگاه گوارش معاینه گشته و تعداد ۱۶۸ رأس از دامهای سالم انتخاب شدند. تمامی دامها از نظر بیماری‌هایی مثل تب‌برفکی، سل و بروسلوز واکسینه شده بودند.



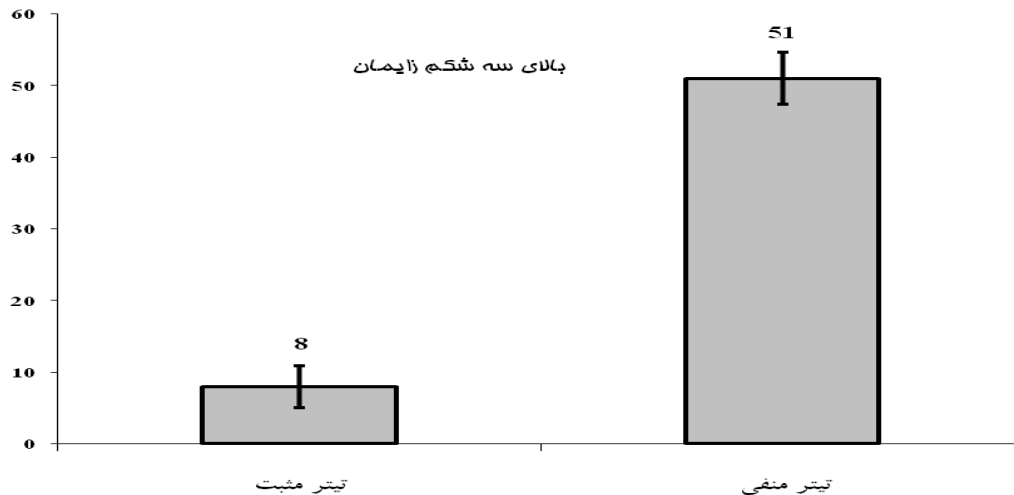
نمودار ۲- نمودار دام‌های تحت آزمایش از نظر تعداد شکم زایمان

از لحاظ تقسیم‌بندی سنی، از تعداد کل ۱۶۸ رأس دام تحت مطالعه، ۱۰۹ رأس زیر سه شکم زایمان بوده و ۵۹ رأس بالای سه شکم زایمان بودند.

از تعداد ۱۰۹ رأس دام زیر سه شکم ۵ رأس دارای آنتی‌بادی ضد زونا پلوسیدا (تیترا مثبت) و از تعداد ۵۹ رأس دام بالای سه شکم زایمان، ۸ رأس دارای آنتی‌بادی ضد زونا پلوسیدا (تیترا مثبت) بودند.



نمودار ۳- نمودار دام‌های تیترا مثبت و منفی در دام‌های زیر سه شکم زایمان



نمودار ۴- نمودار دامهای تیترا مثبت و منفی در دامهای بالای سه شکم زایمان

(آنتی بادی ضد ZP) ممکن است در پاتوژنز ناباروری ایدئوپاتیک در این حیوانات نقش بازی کند (Krickpatrick, 2002; Liu, 2005; turner, 2002). مطالعات روی ایمن سازی فعال با آنتی بادهای ضد ZP نشان داد که در بیشتر گونه های جانوری، نارسایی تخمدان اغلب با تغییرات مخرب در فولیکول های تخمدانی ارتباط دارد (Briggs et al., 1999; Hinsch et al., 1998; Skinner et al., 2004; Kollé et al., 2007).

هنگامی که آنتی ژن های بومی ZP از گونه های متفاوت برای ایمن سازی مورد استفاده قرار گرفت حیوانات واکنش غالباً به طور خودبه خود تولید آنتی بادی ZP می کنند و این وضعیت منجر به ناباروری می شوند. روشن است که زونا پلوسیدای طیف گسترده ای از پستانداران (۴۰ تا ۹۰ درصد) مشابه هستند که در تعدادی از حیوانات جداسازی و طبقه بندی شده و

بر اساس آنالیز آماری با روش آزمون نسبت ها، با احتمال ۹۹٪ تفاوت معنی داری بین دو گروه زیر سه شکم و بالای سه شکم وجود دارد ( $Z=2/07$ ) و این به معنای آن است که افزایش سن تاثیر معنی داری در میزان ظهور آنتی بادی ضد زونا پلوسیدا در سرم این دسته از دامها دارد.

### بحث و نتیجه گیری

با وجود پیشرفت در درک فیزیولوژی تولید مثل در ۳۰ تا ۴۰ درصد از حیوانات نابارور علت ناباروری آنها هنوز ناشناخته مانده است. زونا پلوسیدا خصوصیات ایمنی زایی قدرتمندی دارد و آنتی سرم را به صورت تاثیر گذاری جهت مهار باروری برمی انگیزاند. سطح بالای تیتراهای آنتی بادی ضد زونا پلوسیدا اغلب به خوبی با شیوع ناباروری مرتبط می باشند. مطالعات متعددی پیشنهاد کرده اند که آنتی بادی ضد زونا پلوسیدا

خالص‌سازی پروتئین‌های زونا پلوسیدای خوک و استفاده از آنها به عنوان واکسن در گونه‌های پستانداران وحشی و اهلی مختلف امکان‌پذیر باشد. بدین ترتیب، از نظریه‌ای که آنتی‌بادی‌های القا شده به ZP اووسیت‌های حیوانات درمان شده می‌چسبند و باروری را توسط جلوگیری از اتصال و نفوذ اسپرماتوزوا مهار می‌کنند، حمایت می‌نماید.

برای توضیح اختلالات تخمدان، برخی مطالعات نشان داده‌اند که وجود آپی‌توپ‌های سلول‌های T اوفریتوزن در ایمنی‌زایی می‌تواند منجر به پاسخ التهابی که با توسعه اووسیت‌ها که با آنتی‌بادی همراه است، شود (Skinner et al., 2004).

در مطالعه حاضر اندازه‌گیری میزان آنتی‌بادی ضد ZP گاوهای شیری هلشتاین مبتلا به تکرر فحلی، در سنین مختلف بر اساس تعداد زایمان صورت گرفت. سایر دانشمندان نشان دادند بر اساس وضعیت آبستنی نیز، میزان آنتی‌بادی‌های مثبت ممکن است متفاوت باشد. در مطالعه حاضر، اختلاف معنی‌داری در وجود تیتراژ مثبت و تیتراژ منفی در بین حیوانات ماده نابارور از لحاظ سنی، وجود دارد. با این حال، برخی از دانشمندان گزارش کردند که آنتی‌بادی‌های ضد ZP ممکن است در تیتراژهای مشخصی در حیوانات آبستن نیز یافت شوند (Bradley, 2004; Boyles and Ahmadzadeh, 2005; Harris et al., 2004).

در مطالعات دیگر اختلاف معنی‌داری بین گروه‌هایی که نتایج آنها بر اساس نژاد انجام شده، وجود داشت (Del los reyes and Barros, 2003; Bliril and Wassarman, 2001; Asbuy and leyle, 2003). در تحقیق دیگری گزارش گردید که بر اساس وضعیت آبستنی نیز، میزان آنتی‌بادی‌های مثبت ممکن است

همسانی قابل توجهی در گونه‌های پستانداران تا کنون گزارش شده است. به عنوان مثال، همسانی پروتئین زونا پلوسیدا در گاو و خوک به ۸۳٪ می‌رسد (Zhu et al., 1999; Wassarman et al., 1999). کاهش باروری عمدتاً به اختلال در اتصال اسپرم به تخمک نسبت داده می‌شود تا عدم تخمک‌گذاری و سیکل‌های غیرطبیعی با این حال برخی از اختلالات تخمدان مثل کاهش وزن تخمدان و تمایز غیرطبیعی فولیکولی نیز گزارش شده است. همچنین مدارکی وجود دارند که آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد ZP ممکن است از نفوذ اسپرم به ZP جلوگیری کند، اما هیچ تاثیری بر اتصال اسپرم به ZP ندارد (Fayrer et al., 2001; Hosken et al., 2000; Hasegawa et al., 2002; Mahi-Brown et al., 2002). در حال حاضر، پروتئین‌های ZP به‌خاطر ظرفیت آنتی‌ژنیکی خود به‌عنوان جایگزین‌هایی اصلی برای تولید واکسن‌های ضدباروری در نظر گرفته می‌شوند. به‌علاوه آنتی‌ژن‌های ZP برای دستگاه تولید مثلی خاص می‌باشند و به جریان خون نمی‌رسند. بدین ترتیب، احتمال مشاهده توسعه مجموعه‌های ایمنی و تغییرات در سایر بافت‌ها وجود ندارد. به هر حال، مشاهده شده است که پاسخ ایمنی القا شده می‌تواند متغیر باشد و به ساختار ایمونوژنیک استفاده شده در گونه‌های ایمن بستگی داشته باشد. در اثر اینکه گلیکوپروتئین‌های ZP خاصیت آنتی‌ژنی ضعیفی دارند، ایمنی‌زایی حیوانات با استفاده از زونا پلوسیدای سایر گونه‌ها انجام می‌شود. بدین ترتیب، آنتی‌بادی‌ها علیه پروتئین‌های زونا پلوسیدای خوک واکشنش متقاطع را با گلیکوپروتئین‌های زونا پلوسیدای سایر گونه‌های نشان دادند. این حالت باعث گردیده که جداسازی و

توجه و تأمل در مطالعه حاضر این است که با افزایش سن دامها میزان موارد مثبت تیترا آنتی-بادی به طور معنی داری افزایش می یابد. شاید این امر به این دلیل باشد که با افزایش سن، توانایی و کفایت تولید مثلی کاهش یافته و به صورت اختلالات تولید مثلی بروز می نماید. شاید بتوان گفت که اتفاقات مختلفی نظیر کمبودهای تغذیه ای، استرس ناشی از تولید، اختلالات تخمدانی و دستگاه تناسلی که با افزایش سن احتمال وقوع آنها نیز بیشتر می شود، می توانند نقشی در افزایش میزان این آنتی-بادی در بدن دام داشته باشند که البته تحقیق در مورد تاثیر هر کدام از این موارد نیازمند مطالعات تکمیلی بیشتری است. احتمالاً فاکتورهای اضافی، نظیر تیترا یا سایر خصوصیات آنتی-بادی ها در این بین نیز نقش داشته و از این طریق می توانند دارای اثرات سوئی بر باروری باشند. نقش دقیقی که این آنتی-بادی ها در ارتباط با باروری بازی می کنند، نیازمند مطالعات بیشتر می باشد.

متفاوت باشد (Barber and Fayrer-Hosken, 2003). ایشان در نژادهای مختلفی مثل براون سویس میزان تیترا مثبت آنتی-بادی ضد زونا پلوسیدا را ۱/۲۲ درصد و در نژاد هلشتاین ۳/۱۳ درصد و در نژادهای مختلط ۳/۰۳ درصد گزارش نمودند. در همین مطالعه درصد دامهای نژاد سمیتال دارای تیترا مثبت آنتی-بادی صفر گزارش گردید. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می دهد که در نژاد هلشتاین موجود در منطقه شمال غرب ایران، میزان وجود این آنتی-بادی ۷/۷۴٪ است. نتایج حاصل از مطالعه صورت گرفته توسط نگارندگان نشان می دهد که در نژاد بومی و دو رگ منطقه کردستان به طور کلی ۱۷ درصد دامهای غیر آبستن نابارور دارای تیترا مثبت این آنتی-بادی می باشند که نتایج حاصل در این مطالعه با تحقیق مذکور چندان مطابقتی ندارد. ولی، سایر محققین گزارش کردند که آنتی-بادی های ضد ZP ممکن است در تیتراهای مشخصی در حیوانات آبستن نیز یافت شوند (Asbuy and Lyle, 2003). نکته قابل

#### منابع

- Asbuy, A.C. and Lyle, S.K. (2003). Infectious causes of infertility In Equine Reproduction. In: Equine reproduction. A.O., McKinnon, J.L. editors. 6<sup>th</sup> ed., Philadelphia, pp: 381-391.
- Barber, M., Lee, S., Steffens, W., Ard, M. and Fayrer- Hosken, R. (2001). Immunolocalization of zona pellucid antigen in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. Theriogenology, 55: 1705-1717.
- Barber, M.R. and Fayrer-Hosken, R.A. (2000). Possible mechanisms of mammalian immunocontraception. Journal of Reproductive Immunology, 46: 103-124.
- Bleil, J. and Wassarman, P. (2001). Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zona pellucidiae possessing receptor activity for sperm cell, Nature Cell Biology, 20: 287-882.
- Byles, S. and Ahmadzadeh, A. (2005). Immunocontraception to help control feral cat populations. In: Consultation in Feline Internal Medicin. Philadelphia: Saunders, pp: 577-582.
- Bradley, M. (2004). Experimental strategies for the development of an immunocontraceptive vaccine for European red fox, Journal of Reproduction and. Fertility., 6: 307-317.
- Briggs, D., Mille, D. and Gosden, R., (1999). Molecular biology of female Gametogenesis. In: Molecular Biology in Reproductive Medicine. New York: Parthenon Publishing, pp: 251-270.

- Del losReyes, M. and Barros, C. (2000). Immunolocalization of procin/Acrosin in bovines and bovine sperm penetration through the zona pellucida. *Animal Reproduction Sciences*, 58: 215-228.
- Fayrer-Hosken, R., Dookwah, H., Brandon, C. (2000). Immunocontrol in dogs *Animal Reproduction Sciences*, 60-61: 365-373.
- Garza, K.M., Lou, Y.H. and Tung, K.S. (1998). Mechanism of ovarian autoimmunity, *Journal of Reproductive Immunology*, 39(2): 391-413.
- Harris, J., Hibler, D., Fontenot, G., Hsu, K., Yuresvjch, E. and Sacco, A. (2004). Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB and ZPC gene families DNA Sequence, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 4: 361-393.
- Hasegawa, A., Koyama, K., Inoue, M., Takemura, T. and Isojima, S. (2002). Antifertility effect of active immunization with zp4 glycoprotein family of porcine zona pellucida in hamsters. *Journal of Reproduction and Fertility*, 22: 97-210.
- Hinsch, E., Hagele, W., Bohie, R.M., Schill, W.B. and Hinsch, K.D. (1998). Evaluation of zp2 domains of functional importance with antisera against synthetic zp2 peptides. *Journal of Reproduction and Fertility*, 114: 245-251.
- Kolle, S., Sinowatz, F., Boie, G. and Palma, G. (1998). Differential expression of zpc in the bovine ovary, oocyte and embryo. *Molecular Reproduction and Development*, 49: 435-443.
- Kirkpatrick, J.F., Liu, I.M., Turner, J.W., Naugle, R. and Keiper, R. (2002). Long-term effects of porcine zona pellucida immunoneutralization on ovarian function in feral horses (*Equus caballus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 94: 437-444.
- Liu, I.K., Turner, J.W., Van Leeuwen, E.M., Flanagan, D.R., Hedrick, J.L., Mmrata, K., *et al.* (2005). Persistence of anti-zona pellucida antibodies following a single inoculation of porcine zona pellucida in the domestic equine. *Reproduction*, 129: 181-190.
- Mahi-Brown, C.A., Huang, T.T. and Yanagimachi, R. (2002). Infertility in bitches induced by active immunization with porcine zona pellucida. *Journal of Experimental Zoology*, 20: 89-95.
- Mahi-Brown, C.A., Yanagimachi, R., Hoffman, J.C. and Huang, T.T. (2005). Fertility control in the bitch by active immunization with porcine zona pellucida: Use of different adjuvant and patterns of estradiol and progesterone levels in estrous cycles. *Biology of Reproduction*, 32: 761-772.
- Mahi-Brown, C.A., Yanagimachi, R., Nelson, M.L., Yanagimachi, H. and Palumbo, N. (2008). Ovarian histopathology of bitches immunized with porcine zona pellucida. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, 18: 94-103.
- Skinner, S.M., Mills, T., Kirchick, H.J. and Dunbar, B.S. (2004). Immunization with zona pellucida proteins results in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. *Endocrinology*, 115: 2418-2432.
- Topper, E.K., Kruijt, L., Calvete, J., Mann, K., Topfer-Peteren, E. and Woelders H. (2007). Identification of bovine zona pellucida glycoprotein's. *Molecular Reproduction and Development*, 46: 344-350.
- Turner, J.W., Liu, I.K., Flanagan, D.R., Bynum, K.S. and Rrtberg, A.T. (2002). Porcine zona pellucida (PZP) immunoneutralization of wild horses (*Equus caballus*) in Nevada: a 10 year study. *Reproduction*, 60: 177-186.
- Wassarman, P., Chen, J., Cohen, N., Litscher, E., Liu, C. and Williams, Z. (1999). Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *Journal of Experimental Zoology*, 15: 251-258.
- Zhu, X. and Naz, R.K. (1999). Comparison of zp3 protein sequences among vertebrate species: to obtain a consensus sequence for immunoneutralization. *Frontiers of Bioscience*, 4: 212-215.



## **Evaluation of the presence of anti zona pellucida Antibodies in the serum of repeat breeder Holstein dairy cattle**

**Kaveh, A.A.<sup>1\*</sup>, Nickniyaz, H.<sup>2</sup>**

1- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

2- Graduate of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

\*Corresponding author: dr.kaveh@iaut.ac.ir

(Received: 2014/4/6 Accepted: 2014/6/24)

### **Abstract**

This study was conducted to evaluate the presence of anti zona pellucida antibodies in the serum of repeat breeder Holstein cows in Third station Dairy Cattle Husbandry Agro Industry in Moghan. The study was conducted on 168 non-pregnant cows with a history of Repeat breeder. Animals were selected in two age groups , more than three times calving or less. Ten ml of blood were obtained from Animals from the jugular vein and serum was separated. The presence of anti-ZP antibodies in animal sera were tested by commercial test kits for ELISA (Bioserve Diagnostic, Zona pellucida antibody ELISA, BS-20-20, Germany). From a total of 168 tested animals, 13 animals tested positive (7.74%) and 155 animals were negative (92.26%). Five of 109 cattle with less than three calving were positive and 8 of 59 animals with more than three calving were positive. The results showed highly significant differences between the two groups ( $Z=2/07$ ) and this means that increasing age has a significant effect on the rate of appearance of anti zona pellucida antibodies in the serum of these animals.

**Key words:** Antibodies, Zona pellucida, Repeat Breeder, Holstein.