JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

سال دوم، شماره دوم، بهار ۱۳۹۰
صفحات ۷۳-۶۸

تعیین میزان شیوع BVD در جنین های سقط شده گاوداری های استان تهران به روش واکنش زنجیره پلیمراز

آریا بدیعی[۱]، فرهاد موسی خانی[۲*]، علی ذوالفقاری[۳]، محسن ظفری[۳]، محمد ملکان[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، کرج، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، کرج، ایران

۳- دانش آموخته دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، کرج، ایران

** نویسنده مسئول: fmosakhani@kiau.ac.ir*

چکیده

ویروس بیماری اسهال ویروسی گاوها (BVDV) از خانواده ی فلاوی ویریده و از جنس پستی ویروس می باشد این بیماری قادر به ایجاد عوارض متفاوتی است و همواره به عنوان یکی از معضلات صنعت دامپروری مطرح می باشد. منبع اصلی عفونت حیوانات (Persistent infection) میباشد. عفونت می تواند از طریق جفت، ترشحات دستگاه تولید مثلی و حیوان PI انتقا ل یابد. این ویروس قادر به ایجاد عوارض تولید مثلی از جمله سقط، مرده زایی، ناقص الخلقه زایی و ناباروری بوده که می تواند ضررهای اقتصادی فراوانی را به همراه داشته باشد. از آنجایی که از لحاظ بالینی تشخیص این بیماری دشوار است بکارگیری روش های آزمایشگاهی متفاوتی از جمله تست واکنش زنجیره ای پلیمراز (RT-PCR) به منظور تشخیص دقیق الزامی است. با توجه به اهمیت ویژه ی سقط جنین و لزوم شناسایی عوامل مسبب آنبه منظور کنترل خسارات اقتصادی ناشی از آنتحقیق حاضر صورت پذیرفت. در این تحقیق ۲۵۱ نمونه جنین سقط شده ارجاعی از گاوداری های صنعتی استان تهران به آزمایشگاه به مدت یک سال موردبررسی قرار گرفت نمونه های مورد آزمایش شامل بافت های کبد،کلیه،قلب و طحال جنین بود.بر اساس نتایج به دست آمده شیوع تقریبی سقط جنین ناشی از BVD در استان تهران ۲۵/۲٪ و بر اساس فصل به ترتیب بهار۳۳/۳٪، تابستان ۱۸٪، پاییز ۳۴/۲٪، زمستان ۲۳/۷٪ بود، در نتیجه اقدام جهت کنترل و ریشه کنی این بیماری با توجه به خسارات اقتصادی سنگین، بسیار ضروری است.

واژه های کلیدی: BVD، سقط جنین در گاو، واکنش زنجیره ای پلیمراز، گاو

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 2(2)68-73, 2011

Prevalence of BVD in bovine aborted fetuses of dairy cattle herds by RT- PCR in Tehran province

Badii, A.[1] , Mousakhani, F.[2*] , Zolfaghari, A.[3], Zafari, M.[3] Malekan, M.[3]

1. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine , karaj Branch, Islamic Azad University, karaj, Iran

2-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine , Karaj Branch, Islamic Azad University, karaj, Iran

3-Graduated from Faculty of Veterinary Medicine , Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

**** Corresponding author:** fmosakhani@kiau.ac.ir*

Bovine viral diarrhea disease virus (BVDV) from flaviviridae family and pestiviruses can cause reproductive complications including abortion, stillbirth, infertility, congenital defects and many other economic losses. Because of difficult clinical diagnosis, many laboratory methods including reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) can be used to exact diagnosis.

In this study, 251 samples of aborted fetuses were referred from industrial dairy farms of Tehran province and evaluated in a reference laboratory during one year. samples tested were tissues, including liver, kidney, spleen and heart were the fetus.

Based on the results, the estimated prevalence of abortion due to BVD in Tehran province was 25.2% and based on the season, respectively, spring 33.3%, summer 18%, atom 34.2%, winter 23.7%.

In order to reduce the prevalence of BVD abortions the following points should be noted: identification and elimination PIs, vaccination, application of bio-security principles and etc.

Key words: BVD, Abortion, Polymerase chain reaction, Cattle, Infertility

مقدمه

بیماری اسهال ویروسی گاوها (BVD) یکی از مهمترین بیماری های موجود در بین جمعیت های گاوها در کشورهای مختلف به شمار می رود که منجر به بروز خسارات زیادی به گاوداران می شود. ویروس بیماری اسهال ویروسی گاوها (BVDV) از خانواده ی فلاوی ویریده و از جنس پستی ویروس می باشد (۲) این بیماری قادر به ایجاد عوارض متفاوتی است و همواره به عنوان یکی از معضلات صنعت دامپروری مطرح می باشد. منبع اصلی عفونت حیوانات (Persistent infection) میباشد. عفونت می تواند از طریق جفت، ترشحات دستگاه تولید مثلی و حیوان PI انتقا ل یابد (۱۲و۲و۳). BVDV قادر به ایجاد عوارض تولید مثلی از جمله سقط، مرده زایی، ناقص الخلقه زایی و ناباروری بوده که می تواند ضررهای اقتصادی فراوانی را به همراه داشته باشد(۱۱). اولین مورد وقوع بیماری در سال ۱۹۴۶ توسط الافسون و همکارانش در یکی از نواحی ایالت نیویورک در کشور آمریکا گزارش گردید (۱۱) و اکنون بیش از نیم قرن است که مورد توجه جدی کانون های علمی دامپزشکی و دامپروری در سطح جهان قرار گرفته و تحقیق در زمینه شناسایی هرچه بیشتر بیماری و مبارزه با آن همچنان ادامه دارد. اهمیت ویژه این بیماری در ایجاد عوارض تولیدمثلی از جمله سقط، مرده زایی، ناقص الخلقه زایی، ناباروری و حتی کاهش تولید و مرگ می باشد که می تواند ضررهای اقتصادی زیادی را به همراه داشته باشد (۱۲). تشخیص بالینی این بیماری بسیار دشوار است. به منظور تشخیص این بیماری می توان از تست های ایمنوهیستوشیمی و مونوکلونال آنتی بادی (Capture- ELISA) استفاده نمود. از زمان مطرح شدن واکنش زنجیره پلیمراز (RT-PCR) به عنوان یک روش تشخیص سریع و دقیق، مقالات متعددی به منظور استفاده از این روش در تشخیص BVDV به چاپ رسیده است (۱و۴و۶ و۷). دریکسل و همکاران در سال ۲۰۰۶ تست های مورد استفاده در آزمایشگاه های مختلف در ایالات متحده آمریکا در سالهای ۲۰۰۴ و۲۰۰۵ را مورد مطالعه و بررسی قرار دادند آنها اعلام نمودند که (RT-PCR) reverse transcriptase-polymerase chain reaction بمنظور تشخیص حیوان PI بسیار مناسب است (۱). کیم و همکاران در سال ۲۰۰۳ طی یک بررسی RT-PCR را تستی حساس و اختصاصی و به صرفه جهت نشان دادن ویروس BVD در نمونه های مختلف معرفی نمودند (۷).در تحقیق حاضر به دلیل اهمیت سقط جنین و شناسایی عوامل سعی برآن شده است که با استفاده از روش R T-PCR میزان شیوع BVD در جنینهای سقط شده گاوداری های استان تهران مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

در این تحقیق تعداد ۲۵۱ نمونه از جنین های سقط شده ارجاعی به آزمایشگاه در طول یک سال، مورد بررسی قرار گرفت. پس از کالبد گشایی جنین ها، بخشی از طحال، غدد لنفی، ریه ها و کبد آنها جدا شده و بمنظور استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت.

RNA ویروس ها توسط روش فنل/ کلروفرم/ پروتئیناز K استخراج گردید. ابتدا سوسپانسیون بافتی تهیه شد و در ادامه به سوسپانسیون ویروس، محلول پروتئیناز K اضافه شد و سپس در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. به محلول فوق فنل (phenol) افزوده و به خوبی مخلوط شده، فاز مایع و آلی توسط سانتریفیوژ از یکدیگر جدا گردید(۱۱). فاز مایع مجدداً توسط مخلوط فنل و کلروفرم (به نسبت۱:۱) و سپس توسط کلروفرم استخراج گردید. پس از سانتریفیوژ و استخراج مایع آبکی رویی حاوی RNA، محلول استات سدیم ۳ مولار افزوده وبه خوبی مخلوط شده، سپس اتانول ۱۰۰٪ به آن افزوده شد و یک شب در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. رسوب حاصل از سانتریفیوژ با الکل۷۰٪ شستشو وخشک گردید(۷).

RT-PCR:

در ایـن روش تهـیه ی CDNA (DNA مکـمل) از RNA ژنـوم ویـروس هـا توسـط آنـزیم رونویـسی معکـوس (Reverse trans criptase) و تکـثیر آن تـوسط PCR، تلفیق شـده در یـک لوله ی آزمایـش و طـی یک مرحله انـجام می شود.

جدول۱- پرایمرهای مورد استفاده در طرح

Forward:	5›-TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC3›
Reverse:	5›-ACTCCATGTGCCATGTACAGC-3›

واکنش RT-PCR در حجم ۱۰۰µL و با افزودن مواد زیر انجام می شود.

بافر PCR (بافر ۱۰ X حاویtris-HCL 100mM,KCl 500mM,15mMMgcl2، با PH=8.3) DTT 0/25mM (Dithiothreitol) و 0/2mM از هر یک از دزوکسی نوکلئوتیدها (dGTP, dATP, dCTP, dTTP)، 0/5µL از هر یک از پرایمرها، ۲/۵ واحد آنزیم RT (ترانس کریپتاز معکوس)، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA poly Merase. پس از مخلوط کردن کامل مواد 50µL روغن معدنی روی مخلوط ریخته شد. مخلوط واکنش بدست آمده در دستگاه ترموسیکلر قرار داده شد (جدول۲).

جدول ۲- شرح برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر

مراحل	دما (درجه سانتیگراد)	زمان
انکوباسیون مخلوط	۴۲	۴۵ دقیقه
Denaturing	۹۴	۱ دقیقه
Annealing	۵۰	۱ دقیقه
Extention	۷۲	۱ دقیقه
Final extention	۷۲	۱ دقیقه

الکتروفورز و قرائت نتایج

در این مرحله نمونه ها به تانک الکتروفورز منتقل شده و در معرض جریان برق ۱۱۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند در انتها با استفاده از اشعه فرا بنفش محصولات بدست آمده نمایان شدند. باندهایی که دارای bp331 بودند به عنوان مثبت قلمداد شدند (۸).

نتایج

در مطالعه حاضر (از ۳۱ خرداد ۱۳۸۸ تا تاریخ ۱ تیرماه ۱۳۸۹) از ۲۵۱ نمونه جنین سقط شده مورد آزمایش تعداد ۶۳ نمونه BVD مثبت بودند. شیوع سقط جنین ناشی از BVD درکل سال ۲۵/۲% بوده است و درصد شیوع در فصل بهار ۳۳/۳%، تابستان ۱۸%، پاییز ۳۴/۲% و در زمستان ۲۳/۷% بوده است.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به اینکه دانشمندان BVD را بیماری سیستم گاوداری های مدرن و صنعتی می دانند، لذا چنین به نظر می رسد که این بیماری از کشورهای دیگر به ایران وارد شده است. مطالعه صدیقی نژاد و همکاران در سال ۱۳۷۵ با استفاده از روش بررسی سرولوژیکی، آلودگی گاوهای شیری ایران را به بیماری BVD به میزان ۶۲ درصد نشان می دهد. بر اساس گزارش همایون پارسانکو در سال۱۳۸۱ با استفاده از روش بررسی سرولوژیکی بیماری BVD در گاوداری های منطقه شهریار، ۵۶/۷۷ درصد تعیین گردید. طبق گزارش ریفناچت و همکاران در سال۲۰۰۱ در سوئیس در ۱۲۱ فارم حداقل شیوع BVD ۲۲/۹% و حداکثر شیوع ۸۴/۹% بوده است(۱۰). از سال ۱۹۴۶ مواردی از شیوع در نیویورک ثبت شـده است و این بیـماری بطور عمده به تعداد کمی از تلیسه های جوان (۲۴-۶ ماهه) محدود می شود که نتیجه آن بطور عمده مرگ بوده است. این ویروس عـلت سقط جنین در بیش از ۲۰% از گاوها در پنج گله در نیویورک گزارش

شده است (۱۱). در تحقیق حاضر میزان شیوع سقط جنین حاصل از BVD در گاوداری های استان تهران ۲۵/۲% بیان شد که از نظر درصد بیان شده شباهت به میزان آن در آمریکا (۲۰%) دارد که از دلایل آن می توان به شرایط مشابه در سیستم گاوداری های دو کشور، چگونگی پخش ویروس، حدت ویروس و... اشاره نمود. رئوفی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ایران با استفاده از روش SNT گزارش دادند که از ۱۳۷ نمونه سرمی اخذ شده از شترها در کشتارگاه خورین از توابع استان تهران ۲۷ نمونه (۱۹/۷%)BVD مثبت بودند(۹). بر اساس گزارش پوگرانیچی و همکاران در سال ۲۰۰۸ میزان شیوع BVD در جمعیت گوزن دم سفید در هند حدود ۰/۳% بوده (۸)، پس بهتر است نشخوار کنندگان وحشی و شترهای آلوده به BVD در طول برنامه ی ریشه کنی BVD مد نظر قرار گیرند. در سال ۲۰۰۶، هاو و همکاران در دانشگاه رویال دانمارک تحقیق جامعی را برای ریشه کنی BVDV در اروپا انجام دادند و که راه های استراتژیک برای اعمال مدیریت امنیت زیستی و آلاینده های زیستی را مطالعه نمودند با توجه به اینکه یکی از فاکتورهای اساسی یافتن حیوان PI و جلوگیری از ورود آن به گله می باشد ایشان در راستای نایل شدن به هدف تست های مختلف آزمایشگاهی را مورد بررسی قرار داده و در ارتباط با RT-PCR اعلام نمودند که این تفکیک برای نمونه های مجموع مثل سرم، پلاسما، bulk milk و... یک تفکیک با حساسیت بالا بوده و قادر است تا مقادیر اندک ویروس در نمونه ها را برای یافتن حیوان PI نشان دهد(۵). کندی در سال ۲۰۰۶ از روش RT-PCR در برنامه های غربال گری گله های گاو برای یافتن حیوان PI استفاده نموده است(۶). در تحقیق حاضر نیز از روش RT-PCR برای بررسی میزان شیوع BVD در جنین های سقط شده استفاده شد تفاوت این تحقیق با کارهای دیگر در زمینه RT-PCR این است که ویروس را از بافت جنین سقط شده جدا گردید که این روش دشوارتر از استفاده از روش RT-PCR برای نمونه های سرم، پلاسماو bulk milk می باشد و تفاوت دیگر اینکه ویروس در خون یک ویرمی گذرا داده و از بین می رود ولی در بافت به صورت مخفی و طولانی مدت باقی می ماند. بر اساس گزارش تالفا و همکاران در سال ۲۰۰۹ در اردن شیوع آنتی بادی در برابر BVDV در گله های گاو و گوساله به ترتیب ۳۱/۶% و۸۰/۷% بوده است(۱۳). بر اساس گزارش هاو در سال ۱۹۹۵ بیشترین شیوع عفونت، به همراه آسیب های متنوع متعاقب عفونت BVD دیده شد که باعث بروز خسارات اقتصادی عظیمی گردید که در سطح ملی در انگلستان و دانمارک (مناطق با شیوع بالای عفونت) بین ۷ تا ۲۷ میلیون پوند (بین ۱۱ تا ۴۲ میلیون دلار) برآورد شده است(۴). در تحقیق حاضر میزان شیوع سقط جنین حاصل از BVD در گاوداری های استان تهران در فصول و ماه های مختلف متفاوت بوده است که می توان به حداکثر شیوع مربوط به مهرماه با ۶۱/۵% و حداکثر شیوع فصلی مربوط به فصول پاییز با ۳۴/۲% و بهار با ۳۳/۳% اشاره نمود. در تحقیق حاضر میزان شیوع سقط جنین ناشی از BVD در گاوداری های استان تهران ۲۵/۲% بیان شد که احتمالاً به دلیل مواردی چون رعایت نشدن اصول امنیت زیستی (شامل کنترل رفت وآمد افراد، رعایت نکردن اصول بهداشتی توسط دامپزشکان و کارکنان گاوداری و...)، عدم اعمال تدابیر مورد نیاز جهت پایش که امروزه در برخی از دامداری ها انجام می شود، عدم حذف گاو در بعضی از گاوداری ها، عدم قرنطینه، واکسیناسیون و... می باشد. به دلیل اینکه هیچ نوع درمان خاصی برای بیماری BVD وجود ندارد بهترین روش مبارزه با آن بکارگیری راهکارهای کنترل و پیشگیری و ریشه کن نمودن بیماری می باشد و امروزه در بسیاری از کشورها از جمله کشورهای اسکاندیناوی راهکارهای کنترل و پیشگیری و حتی روش های ریشه کنی بیماری BVD با موفقیت قابل توجهی انجام گرفته است. با توجه به این موضوع که منبع اصلی ویروس در طبیعت گاوها هستند مهم ترین اقدام جهت مبارزه با این بیماری شناسایی با

روش های آزمایشگاهی معتبر (RT-PCR) و حذف گاوهایی که سقط ناشی از BVD داشته اند و معدوم نمودن گاوهای حامل دائمی (PI) و جلوگیری از ورود دام های آلوده به گله می باشد همچنین گاوهای نر آلوده باید مورد شناسایی قرار گرفته و از بکارگیری اسپرم آنها در برنامه های تلقیح مصنوعی جلوگیری به عمل آید و از جمله راهکارهای پیشنهادی برگزاری دوره های آموزشی به منظور آگاه سازی دامپروران و کارکنان دامداری ها جهت شناسایی و چگونگی مبارزه با بیماری BVD و نظارت بهداشتی دقیق بر مواد بیولوژیک وارداتی نظیر اسپرم و جنین فریز شده و تشکیل پست های قرنطینه در سطح استان ها و مناطق مرزی به منظور جلوگیری از ورود دام های آلوده به کشور می باشد.

References

1- Driskell, E., Ridpath, J. (2006) A survey of bovine viral diarrhea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005. J Vet. Diagn. Invest, 600-605.

2- Denise Goens, S. (2002) The evolution of bovine viral diarrhea: a review, Can. Vet. J., 946-954.

3- Howard, C.J., Clarke, M.C., Sopp, P., Brownlie, J. (1994) Systemic vaccination with inactivated bovine virus diarrhoea virus protects against respiratory challenge, Vet. Microbiol. 42(2-3)171-9.

4- Houe, H.(1995) Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. Vet. Clin. N. Am: Food Anim. Pract., 11(3) 521-547.

5- Houe, H., Lindberg, A, Moennig V. (2006) Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. J Vet. Diagn. Invest. 18(5) 427-36.

6- Kennedy, J. A. (2006) Diagnostic efficacy of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to screen cattle for persistent bovine viral diarrhea virus infection. 229 (9) 1472-1474.

7- Kim, S.G., Dubovi, E.J. (2003) A novel simple one-step single-tube. R-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. Biologicals. 31(2) 103-6.

8-Pogranichniy, R.M., Raizman, E., Thacker, H.L., Stevenson, G.W.(2008) Prevalence and characterization of bovine viral diarrhea virus in the white-tailed deer population in India.
J Vet. Diagn. Invest. 20(1) 71-4.

9- Raoofi, A., Hemmatzadeh, F., Ghanaei, A.M.(2010) Serological survey of antibodies against BVD virus in camels (Camelus dromedarius) in Iran. Trop. Anim. Health. Prod. 42(3) 411-4.

10- Riifcnacht, J., Schaller, P., Audi, L., Knutti, B., Kiipfer, U., Pcterhans, E. (2001) The effect of infection with bovine viral diarrhea virus on the fertility of Swiss dairy cattle. Theriogenology, 56(2) 199-210.

11-Shimi, A. (1996) Veterinary virology, Academic jihad of Tehran university, 306-309(text in Persian).

12-Tabatabaii, H. (2005) Bacterial disease of domestic animal, University of Tehran press, 431-440(text in persian).

13- Talafha, A.Q., Hirche, S.M., Ababneh, M.M., Al-Majali, A.M., Ababneh, M.M.(2009) Prevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhea virus infection in dairy herds in Jordan. Trop. Anim. Health Prod. 41(4) 499-506.