

بررسی میزان شیوع اسهال روتاویروسی گوساله‌های شیری در منطقه تهران و تعیین سروتیپ‌های موجود

دکتر هادی کیوانفر^۱، دکتر مسعود قربانپور^۲، دکتر مسعود رضا صیفی‌آبادشاپوری^۳

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۳، ۱-۳، (۱۳۸۰)

ماه و در مجموع ۵۰۰ نمونه جمع آوری شد. تمامی نمونه‌ها با استفاده از آزمایش الیزا مورد جستجوی روتاویروس قرار گرفتند و سپس از میان نمونه‌های مثبت تعدادی از نظر سروتیپ روتاویروس نیز بررسی گردیدند.

برای انجام آزمایش الیزا از یک کیت الیزای تجاری (ساخت شرکت Bio-X بلژیک) و دستگاه قرائت الیزا مدل Dynatech MR 500، (ایسلند) استفاده شد. کیت‌های فوق جهت تشخیص اسهال روتاویروسی گاو طراحی شده بودند و برای انجام آزمایش الیزا مطابق با دستور کارخانه سازنده عمل شد.

برای تعیین سروتیپ روتاویروس در نمونه‌های مثبت مجدداً از کیت الیزای Bio-X و نیز از دو آنتی‌بادی مونوکلنال ویژه سروتیپ‌های G₆ و G₁₀ (دانشکده دامپزشکی لیورپول) استفاده شد. در این آزمایش پس از تهیه رقت $\frac{1}{2}$ از نمونه‌های مورد نظر، هر نمونه در دو گوده از پلیت الیزا ریخته شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای آزمایشگاه و سپس سه مرتبه شستشو، به یکی از گوده‌ها آنتی‌بادی ضد سروتیپ G₆ و به دیگری آنتی‌بادی ضد سروتیپ G₁₀ اضافه گردید. پلیت مجدداً یک ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد و پس از سه مرتبه شستشو، کونژوگه ضد آنتی‌بادی موشی Antimouse IgG Peroxidase Conjugate به آن اضافه شد. پس از انجام مجدد مراحل شستشو، افزودن ماده کروموزن و در انتها محلول متوقف کننده، پلیت با دستگاه تحت طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

نتایج

از مجموع ۵۰۰ نمونه مدفوع مورد آزمایش ۱۴۴ نمونه از نظر روتاویروس مثبت بودند، بنابراین میزان شیوع $\frac{144}{500}$ یعنی ۲۸/۸ درصد برآورد گردید. میزان شیوع اسهال روتاویروسی در فصلها و ماههای مختلف در جدول ۱ آورده شده است.

همان طوری که مشاهده می‌شود بیشترین شیوع مربوط به فصل زمستان (۳۷/۶ درصد) و کمترین شیوع مربوط به فصل تابستان (۲۲/۴ درصد) می‌باشد. آزمون مربع‌کای اختلاف معنی‌داری بین شیوع در دو فصل بهار و زمستان ($P < 0/02$) و نیز زمستان و تابستان ($P < 0/01$) را نشان می‌دهد. درصد شیوع بیماری در سنین مختلف ۵-۱ هفتگی نیز در جدول ۲ درج گردیده است.

براساس نتایج به دست آمده بیشترین شیوع در سن سه هفتگی و کمترین میزان در سن یک هفتگی بوده است. آزمون مربع کای دال بر وجود اختلاف معنی‌دار بین میزان شیوع در سن سه هفتگی با سایر سنین می‌باشد. در این مطالعه از میان ۲۴ نمونه تعیین سروتیپ شده سروتیپ G₆ با ۴۱/۷ درصد ($\frac{10}{24}$) بیشترین فراوانی را داشت و سروتیپ G₁₀ با ۳۳/۳ درصد ($\frac{8}{24}$) در مرتبه بعدی بود. ۸/۳ درصد ($\frac{2}{24}$) از نمونه‌ها آلودگی به هر دو سروتیپ G₆ و G₁₀ را نشان دادند و ۱۶/۷ درصد ($\frac{4}{24}$) نیز از نظر آلودگی به این دو سروتیپ منفی بودند و عفونت احتمالاً مربوط به سایر سروتیپ‌ها بوده است.

بحث

در این مطالعه ضمن تعیین میزان شیوع اسهال‌های روتاویروسی در

پانصد نمونه مدفوع از گوساله‌های زیر یکماه مبتلا به اسهال از هفت گاوداری شیری در اطراف تهران در طی یک دوره یکساله (از مهرماه ۱۳۷۷ تا مهرماه ۱۳۷۸) جمع آوری گردیده و با استفاده از کیت الیزا از نظر روتاویروس گروه A مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان شیوع عفونتهای روتاویروسی ۲۸/۸ درصد برآورد گردید. تعداد ۲۴ نمونه مدفوع مثبت از نظر روتاویروس گاو به طور تصادفی انتخاب و با استفاده از پادتنهای تک‌بنیانی ضد سروتیپ‌های G₆ و G₁₀ روتاویروس تعیین سروتیپ گردیدند. از میان این نمونه‌ها ۱۰ مورد (۴۱/۷ درصد) آلودگی به سروتیپ G₆، ۸ مورد (۳۳/۳ درصد) آلودگی به سروتیپ G₁₀ و ۲ مورد (۸/۳ درصد) آلودگی مخلوط به هر دو سروتیپ G₆ و G₁₀ را نشان دادند و ۴ نمونه (۱۶/۷ درصد) نیز غیر قابل تعیین سروتیپ تشخیص داده شد. واژه‌های کلیدی: اسهال، گوساله، روتاویروس، سروتیپ.

اسهال گوساله‌ها که سبب‌شناسی پیچیده‌ای دارد از علل عمده کاهش بهره‌دهی گاوداریها و از بین رفتن منابع پروتئینی حیوانی است. بنابراین مطالعه بر روی عوامل ایجاد کننده این عارضه از اهمیت خاصی برخوردار است. روتاویروسها (Rotaviruses) به عنوان جنسی از خانواده رتوویریده (Reoviridae) واجد یک کپسید بیست وجهی سه لایه و ۱۱ قطعه ژنوم dsRNA (Double strand RNA) می‌باشند (۱،۶،۷). روتاویروسها را بر اساس واکنشهای سرمی در ۶ گروه سرمی A-F قرار می‌دهند که به طور عمده روتاویروسهای گروه A مرتبط با بیماری شناخته شده‌اند (۶،۸). روتاویروسهای گروه A که عامل عمده اسهال در انسان و اکثر گونه‌های دامی محسوب می‌شوند، را بر مبنای خصوصیات آنتی‌ژنی پروتئینهای VP_۶ و VP_۷ به ترتیب در سروتیپ‌های G و P گروه‌بندی می‌نمایند (۱۶ و ۱۵). از میان ۱۴ سروتیپ G شناسایی شده در روتاویروسهای گروه A، تاکنون انواع G₁، G₂، G₃ و G₄ را از گاوها جدا نموده‌اند، با این حال سروتیپ‌های G₆ و G₁₀ سروتیپ‌های غالب دخیل در اسهال روتاویروسی گوساله‌ها می‌باشند (۶،۸). میزان شیوع اسهال‌های روتاویروسی گوساله‌ها در کانادا (۸) ژاپن (۷) آمریکا (۱۰) و اسرائیل (۳) به ترتیب ۷۹، ۲۴/۷، ۴۱/۴ و ۷۹ درصد بوده است.

در ایران نیز تنها بررسی صورت گرفته توسط کارگر موخر و همکاران (۹) مؤید شیوع ۳۱/۷ درصدی اسهال روتاویروسی در گوساله‌های گاوداریهای اطراف تهران بوده است. بنابراین با توجه به اهمیت اسهال‌های روتاویروسی، بر آن شده تا ضمن مطالعه‌ای دقیق، میزان شیوع اسهال‌های روتاویروسی در گاوداریهای اطراف تهران که بخش عمده‌ای از گاوداریهای صنعتی کشور را تشکیل می‌دهند، تعیین و برای اولین بار در ایران سروتیپ‌های روتاویروسی شایع در این گاوداریها را شناسایی نماییم. این اطلاعات در آینده می‌تواند در برنامه‌های کنترل و پیشگیری از این بیماری مهم مورد استفاده قرار گیرند، زیرا سروتیپ‌های روتاویروسی به طور معمول بر علیه یکدیگر محافظت ایجاد نمی‌کنند، بدین معنی که گوساله مبتلا شده با یک سروتیپ بر ضد سروتیپ‌های دیگر ایمن نمی‌شوند (۱۲).

مواد و روش کار

برای تهیه نمونه مدفوع هفت گاوداری در اطراف تهران در نظر گرفته شد. نمونه‌گیری طی یک دوره یکساله از مهرماه ۱۳۷۷ تا مهرماه ۱۳۷۸ صورت گرفت. در هر فصل ۱۲۵ نمونه مدفوع گوساله اسهالی با سن زیر یک

۱) گروه آموزشی میکروبی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز - ایران.

۳) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز - ایران.



میکروسکوپ الکترونی در یک بررسی مشابه درصد شیوع کمتری را نشان دهد (۶).

مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات صورت گرفته در سایر کشورها حاکی از آن است که در مجموع، میزان شیوع اسهال‌های روتاویروسی در این مطالعه کمتر نشان داده می‌شود، و این اختلاف گاهی تا ۳۰ درصد یا بیشتر هم می‌رسد. در اکثر مطالعات مشابه که در سایر کشورها صورت پذیرفته از کیت‌های الیزای تجاری استفاده نشده است بلکه محققین خود اقدام به تهیه پلیت الیزا نموده‌اند.

بنابراین ممکن است بخشی از این تفاوت مربوط به شیوه تهیه پلیت‌های الیزا و تفاوت در حساسیت آنها باشد. در اکثر مطالعات مشابه، نمونه‌گیریها فصلی نبوده و در فصول خاصی از سال که اسهال‌های روتاویروسی شایعتر می‌باشند، تعداد نمونه‌های تهیه شده بیشتر بوده است. این نکته که نمونه‌برداری در چه محدوده سنی صورت گیرد و نوع گاوداری (شیری یا گوشتی) تحت مطالعه از چه نوع باشد به طور قطع بر روی اشاعه بیماری تأثیرگذار است. اسهال روتاویروسی به دلیل شرایط نگهداری گوساله‌ها، در گله‌های گوشتی معمولاً شایعتر می‌باشد (۴، ۱۳، ۱۴). همان گونه که از نتایج این تحقیق نیز مستفاد می‌شود این عفونتها در گوساله‌های ۲-۳ هفته بیشتر بوده و بنابراین اگر تعداد نمونه‌های تهیه شده در این محدوده سنی زیاد باشد درصد شیوع بالاتر برآورد می‌گردد. آماری بودن شرایط مطالعه ایرادی است که در بسیاری از مطالعات مشابه دیده می‌شود و بنابراین نمی‌توان مطمئن بود که نتایج حاصل از این مطالعات قابل تعمیم بر روی جمعیت باشد.

همان گونه که ذکر شد در این مطالعه اختلاف معنی‌داری بین میزان شیوع در فصل بهار با زمستان و نیز تابستان با زمستان وجود دارد که این موضوع با مطالعات برانند و همکاران (۲) و برنر و همکاران (۳) همخوانی دارد. در اکثر کشورها عفونتهای روتاویروسی الگوی فصلی دارند و اوج عفونت در فصول سرد سال است. علت فصلی بودن شیوع ممکن است متفاوت بودن رطوبت نسبی در فصول مختلف باشد زیرا ثابت شده است پایین بودن دما و رطوبت نسبی، بقای روتاویروسها را افزایش می‌دهد (۲، ۶). این الگوی فصلی بیشتر در نواحی معتدل مشهود است و در نواحی گرمسیری معمولاً در فصول مختلف میزان شیوع تفاوت معنی‌داری ندارد (۶). ممکن است بخشی از علت فصلی بودن، متفاوت بودن تراکم محل زیست و تفاوت در نوع تغذیه در فصول مختلف باشد. ثابت شده است که سوء تغذیه می‌تواند باعث وخیمتر شدن عفونتهای روتاویروسی گردد (۶). بنابراین در فصول سرد که تغذیه در وضعیت مطلوبی نیست و تراکم نیز بیشتر است انتقال عفونتهای روتاویروسی تسهیل می‌گردد.

همان گونه که قبلاً ذکر گردیده در این مطالعه میزان شیوع اسهال روتاویروسی در هفته سوم پس از تولد اختلاف معنی‌داری با سایر هفته‌ها داشته است که با اطلاعات ارائه شده در منابع مختلف همخوانی دارد (۴، ۶، ۱۳، ۱۴). وجود پادتنهای آغوزی و ایمنی موضعی قوی در هفته‌های اول و تا حدودی دوم باعث وقوع کمتر اسهالهای روتاویروسی در این سنین می‌شود. وقوع عفونت روتاویروسی طبیعی در هفته‌های سوم و چهارم باعث پیدایش ایمنی موضعی و عمومی فعال شده بنابراین میزان عفونتهای روتاویروسی در گوساله‌های بزرگتر از یکماه به طور معنی‌داری کم می‌گردد.

در این مطالعه سروتیپهای غالب سروتیپ G₆ (۴۱/۷ درصد) و G₁₀ (۳۳/۳ درصد) بوده است که با بسیاری از مطالعات مشابه (۵، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۵) همخوانی دارد. درصد سروتیپهای غیر G₆ و G₁₀، در مطالعه حاضر ۱۶/۷ درصد برآورد شده است که این میزان خیلی کمتر از ارقام به دست آمده در بررسیهای مشابه می‌باشد (۸، ۱۰). از آنجا که کم تعداد بودن ویروس در نمونه مدفوع ممکن است باعث ایجاد اشکال در تعیین سروتیپ توسط الیزا شود، احتمال دارد این تفاوت ناشی از این مهم باشد. البته لازم به ذکر است که این مطالعه صرفاً بر روی گاوداریهای شیری صورت گرفته در حالی که در مطالعات مذکور گاوداریهای تحت مطالعه از هر دو نوع گاوداریهای شیری و

جدول ۱- درصد شیوع اسهال‌های روتاویروسی در گاوداریهای تحت بررسی در ماهها و فصول مختلف.

ماه، فصل	تعداد نمونه گرفته شده	تعداد نمونه مثبت از نظر روتاویروس	درصد شیوع
فروردین	۳۸	۸	۲۱/۰۵
اردیبهشت	۴۳	۱۱	۲۵/۵۸
خرداد	۴۴	۱۰	۲۲/۷۲
بهار	۱۲۵	۲۹	۲۳/۲
تیر	۳۷	۸	۲۱/۶۲
مرداد	۴۸	۱۱	۲۲/۹۱
شهریور	۴۰	۹	۲۲/۵
تابستان	۱۲۵	۲۸	۲۲/۴
مهر	۳۷	۱۱	۲۹/۷۲
آبان	۴۳	۱۷	۳۹/۵۳
آذر	۴۵	۱۲	۲۶/۶۶
پاییز	۱۲۵	۴۰	۳۲
دی	۳۷	۱۴	۳۷/۸۳
بهمن	۴۰	۲۰	۵۰
اسفند	۴۸	۱۳	۲۷/۰۸
زمستان	۱۲۵	۴۷	۳۷/۶

جدول ۲- میزان شیوع اسهال روتاویروسی در سنین مختلف در ۵۰۰ گوساله مورد بررسی قرار گرفته.

سن (هفته)	تعداد موارد بررسی شده	تعداد نمونه مثبت از نظر روتاویروس	درصد شیوع
۱	۱۱۵	۲۴	۲۰/۸۶
۲	۱۳۴	۳۷	۲۷/۶۱
۳	۹۳	۴۰	۴۳/۰۱
۴	۱۰۱	۲۸	۲۷/۷۲
۵	۵۷	۱۵	۲۶/۳
مجموع	۵۰۰	۱۴۴	۲۸/۸

گاوداریهای اطراف تهران برای اولین بار در ایران به تعیین سروتیپهای روتاویروسی در این منطقه پرداخته شد.

در مطالعه‌ای که توسط کارگر موخر و همکاران (۹) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بر روی ۶۳ نمونه مدفوع از گوساله‌های اسهالی گاوداریهای اطراف تهران انجام گردید وجود روتاویروس در ۲۰ نمونه یعنی در ۳۱/۷۴ درصد از نمونه‌ها نشان داده شد. لازم به ذکر است که نمونه‌های مورد آزمایش در آن مطالعه تماماً مربوط به ۶ ماه اول سال یعنی دو فصل بهار و تابستان بوده‌اند.

در مطالعه حاضر آزمایش الیزا میزان شیوع اسهال‌های روتاویروسی در گوساله‌های زیر یکماه را ۲۸/۸ درصد برآورد نمود که با نتایج حاصل از مطالعه کارگر موخر و همکاران تقریباً همخوانی دارد گرچه روش تشخیص در دو مطالعه متفاوت است و زمان و فصلهای نمونه‌گیری هم در این دو مطالعه فرق دارند. اسهال‌های روتاویروسی معمولاً شیوع فصلی داشته و شیوع آنها در فصول زمستان و پاییز بیشتر است. به هر حال در بررسی حاضر این مطالعه میزان شیوع در دو فصل بهار و تابستان ۲۲/۸ درصد بوده است در حالی که در مطالعه کارگر موخر و همکاران این میزان ۳۱/۷۴ درصد تخمین زده شده است. در توجه این اختلاف می‌توان بدین نکته اشاره کرد که میکروسکوپ الکترونی روش دقیقتر و حساستری جهت تشخیص مورفولوژی روتاویروسهاست و انتظار می‌رود آزمایش الیزا در مقایسه با



تشکر و قدردانی

با تشکر از همکاری صمیمانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران، دکتر محمد رضا سلیمی، دکتر سیاوش مکتبی و سرکار خانم ارزانی.

References

1. فنراف جی و همکاران. (۱۹۹۳): ویروس شناسی دامپزشکی. بخش بیماریها ترجمه هادی کیوانفر و ناصر کریمی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۳۱۳-۳۰۹.
2. Brandt, C.D. Kim, H.W. Rodriguez, W.J. Arrobio, J.O. Jeffries, B.C. Parrott, H. (1982): Rotavirus gastroenteritis and weather, *Journal of Clinical Microbiology*, 16, 478-482.
3. Brenner, J. Elad. D. Markovics, A. Grinberg, A. Tranin, Z. (1993): Epidemiological Study of neonatal calve diarrhoea in Israel. A one-year survey of faecal samples, *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 48, 113-116.
4. Castro, A.E. Hevschele, W.P. (1992): *Veterinary Diagnostic Virology*, Mosby, USA, pp: 126-130.
5. Cornaglia, E. Elazhary, R. Talbot, B. (1993): Bovine rotavirus type detection by neutralizing monoclonal antibodies, *Archives of Virology*, 129, 243-250.
6. Fields, B.N. Knipe, D.M. Howley, P.M. Chanock, R.M. Melnick, J.L. Monath, T.P. Roizman, B. Straus, S.E. (1995): *Fields Virology*, Third edition, Lippincott, Raven, Philadelphia, pp: 1625-1708.
7. Fukai, K. Sakai, T. kamata, H. (1998): Distribution of G serotypes and p genotypes of bovine group A rotavirus isolated in Japan. *Australian Veterinary Journal*, 76: 418-422.
8. Hussein, A.H., Cornaglia, E., Saber, M.S., E.L., Azhary, Y. (1995): Prevalence of serotypes G₆ and G₁₀ group A rotaviruses in dairy calves in Quebec. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 59: 235-237.
9. Kargar, R., vand, Yoosefi, J. shahrabadi, M.S., Khodashenas, M., heidarzadeh, B. (1981): Diarrhea in calves: diagnosis and incidence around Tehran, *Archives de l' Institute Razi*, 32: 91-99.
10. Lucchelli, A., Kang, S.Y., Jayasekera, M.K., Parwani, A.V., Zeman, O.H., Saif, L. J., (1994): A survey of G₆ and G₁₀ serotypes of group A bovine rotaviruses from diarrheic beef and dairy calves using monoclonal antibodies in ELISA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6: 175-181.
11. Matsuda, Y., Nakagomi, O., Offit, P.A. (1990): Presence of three types (VP₄ serotypes) and two G, types (VP₇ serotypes) among bovine rotavirus strain, *Archives of Virology*, 115: 199-207.
12. Murakami, R., Nichioka, N., Eguchi, M., Kuniyasu, C. (1990): Serotype, Specific antibody responses of calves infected naturally with rotavirus, *Japanese Journal of Veterinary Science*, 52: 171-174.
13. Radostits, O. M., Blood, D. C., Gay, C.C. (1994): *Veterinary Medicine, A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats, and Horses*, Eighth edition, Bailliere tindall, England, PP: 1016-1025.
14. Smith, B.P. (1996): *Large Animal Internal Medicine*, Second edition, Mosby, USA, PP: 1673-1675.
15. Snodgrass, D.R., Fitzgerald, T., Campbell, L., Scott, FMM, Browning, G.F., Miller, D.L., Herring, A.J., Greenberg, H.B. (1990): Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 504-507.

A survey on prevalence of rotaviral diarrhea in dairy calves in Tehran region and determination of serotypes

Keyvanfar, H.¹, Ghorbanpour, M.², Seifi Abad Shapouri, M.R.³

¹Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. ²Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shalhid chamran University (Ahvaz), Ahvaz - Iran.

Five hundred fecal samples from diarrheic dairy calves (under 1 month old) collected from 7 regions in Tehran, between October 1998 to October 1999. Samples were screened for group A bovine rotavirus (BRV) using antigen capture enzyme - linked immunosorbent assay (AC-ELISA). The overall prevalence of BRV infection was 28.8%. Twenty four BRV positive samples were randomly selected and serotyped by AC-ELISA using G₆ and G₁₀ monoclonal antibodies. Analysis of these samples revealed that 10 (41.7%) were G₆, and 8 (33.3%) were G₁₀ Positive. Two samples (8.3%) were Positive for both G₆ and G₁₀ Serotypes. Four samples (16.7%) were found to be untypeable (G₆ and G₁₀ negative).

Key words : Diarrhea, Calf, Rotavirus, Serotype.



بررسی میزان شیوع اسهال روتاویروسی گوساله‌های شیری در منطقه تهران و تعیین سروتیپ‌های موجود

دکتر هادی کیوانفر^۱، دکتر مسعود قربانپور^۲، دکتر مسعود رضا صیفی‌آبادشاپوری^۳

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۳، ۱-۳، (۱۳۸۰)

ماه و در مجموع ۵۰۰ نمونه جمع آوری شد. تمامی نمونه‌ها با استفاده از آزمایش الیزا مورد جستجوی روتاویروس قرار گرفتند و سپس از میان نمونه‌های مثبت تعدادی از نظر سروتیپ روتاویروس نیز بررسی گردیدند.

برای انجام آزمایش الیزا از یک کیت الیزای تجاری (ساخت شرکت Bio-X بلژیک) و دستگاه قرائت الیزا مدل Dynatech MR 500، (ایسلند) استفاده شد. کیت‌های فوق جهت تشخیص اسهال روتاویروسی گاو طراحی شده بودند و برای انجام آزمایش الیزا مطابق با دستور کارخانه سازنده عمل شد.

برای تعیین سروتیپ روتاویروس در نمونه‌های مثبت مجدداً از کیت الیزای Bio-X و نیز از دو آنتی‌بادی مونوکلنال ویژه سروتیپ‌های G₆ و G₁₀ (دانشکده دامپزشکی لیورپول) استفاده شد. در این آزمایش پس از تهیه رقت $\frac{1}{2}$ از نمونه‌های مورد نظر، هر نمونه در دو گوده از پلیت الیزا ریخته شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای آزمایشگاه و سپس سه مرتبه شستشو، به یکی از گوده‌ها آنتی‌بادی ضد سروتیپ G₆ و به دیگری آنتی‌بادی ضد سروتیپ G₁₀ اضافه گردید. پلیت مجدداً یک ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد و پس از سه مرتبه شستشو، کونژوگه ضد آنتی‌بادی موشی Antimouse IgG Peroxidase Conjugate به آن اضافه شد. پس از انجام مجدد مراحل شستشو، افزودن ماده کروموزن و در انتها محلول متوقف کننده، پلیت با دستگاه تحت طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

نتایج

از مجموع ۵۰۰ نمونه مدفوع مورد آزمایش ۱۴۴ نمونه از نظر روتاویروس مثبت بودند، بنابراین میزان شیوع $\frac{144}{500}$ یعنی ۲۸/۸ درصد برآورد گردید. میزان شیوع اسهال روتاویروسی در فصلها و ماههای مختلف در جدول ۱ آورده شده است.

همان طوری که مشاهده می‌شود بیشترین شیوع مربوط به فصل زمستان (۳۷/۶ درصد) و کمترین شیوع مربوط به فصل تابستان (۲۲/۴ درصد) می‌باشد. آزمون مربع‌کای اختلاف معنی‌داری بین شیوع در دو فصل بهار و زمستان ($P < 0/02$) و نیز زمستان و تابستان ($P < 0/01$) را نشان می‌دهد. درصد شیوع بیماری در سنین مختلف ۵-۱ هفتگی نیز در جدول ۲ درج گردیده است.

براساس نتایج به دست آمده بیشترین شیوع در سن سه هفتگی و کمترین میزان در سن یک هفتگی بوده است. آزمون مربع کای دال بر وجود اختلاف معنی‌دار بین میزان شیوع در سن سه هفتگی با سایر سنین می‌باشد. در این مطالعه از میان ۲۴ نمونه تعیین سروتیپ شده سروتیپ G₆ با ۴۱/۷ درصد ($\frac{10}{24}$) بیشترین فراوانی را داشت و سروتیپ G₁₀ با ۳۳/۳ درصد ($\frac{8}{24}$) در مرتبه بعدی بود. ۸/۳ درصد ($\frac{2}{24}$) از نمونه‌ها آلودگی به هر دو سروتیپ G₆ و G₁₀ را نشان دادند و ۱۶/۷ درصد ($\frac{4}{24}$) نیز از نظر آلودگی به این دو سروتیپ منفی بودند و عفونت احتمالاً مربوط به سایر سروتیپها بوده است.

بحث

در این مطالعه ضمن تعیین میزان شیوع اسهال‌های روتاویروسی در

پانصد نمونه مدفوع از گوساله‌های زیر یکماه مبتلا به اسهال از هفت گاوداری شیری در اطراف تهران در طی یک دوره یکساله (از مهرماه ۱۳۷۷ تا مهرماه ۱۳۷۸) جمع آوری گردیده و با استفاده از کیت الیزا از نظر روتاویروس گروه A مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان شیوع عفونتهای روتاویروسی ۲۸/۸ درصد برآورد گردید. تعداد ۲۴ نمونه مدفوع مثبت از نظر روتاویروس گاو به طور تصادفی انتخاب و با استفاده از پادتنهای تک‌بنیانی ضد سروتیپ‌های G₆ و G₁₀ روتاویروس تعیین سروتیپ گردیدند. از میان این نمونه‌ها ۱۰ مورد (۴۱/۷ درصد) آلودگی به سروتیپ G₆، ۸ مورد (۳۳/۳ درصد) آلودگی به سروتیپ G₁₀ و ۲ مورد (۸/۳ درصد) آلودگی مخلوط به هر دو سروتیپ G₆ و G₁₀ را نشان دادند و ۴ نمونه (۱۶/۷ درصد) نیز غیر قابل تعیین سروتیپ تشخیص داده شد. واژه‌های کلیدی: اسهال، گوساله، روتاویروس، سروتیپ.

اسهال گوساله‌ها که سبب‌شناسی پیچیده‌ای دارد از علل عمده کاهش بهره‌دهی گاوداریها و از بین رفتن منابع پروتئینی حیوانی است. بنابراین مطالعه بر روی عوامل ایجاد کننده این عارضه از اهمیت خاصی برخوردار است. روتاویروسها (Rotaviruses) به عنوان جنسی از خانواده رتوویریده (Reoviridae) واجد یک کپسید بیست وجهی سه لایه و ۱۱ قطعه ژنوم dsRNA (Double strand RNA) می‌باشند (۱،۶،۷). روتاویروسها را بر اساس واکنشهای سرمی در ۶ گروه سرمی A-F قرار می‌دهند که به طور عمده روتاویروسهای گروه A مرتبط با بیماری شناخته شده‌اند (۶،۸). روتاویروسهای گروه A که عامل عمده اسهال در انسان و اکثر گونه‌های دامی محسوب می‌شوند، را بر مبنای خصوصیات آنتی‌ژنی پروتئینهای VP_۶ و VP_۷ به ترتیب در سروتیپ‌های G و P گروه‌بندی می‌نمایند (۱۶ و ۱۵). از میان ۱۴ سروتیپ G شناسایی شده در روتاویروسهای گروه A، تاکنون انواع G₁، G₂، G₃ و G₄ را از گاوها جدا نموده‌اند، با این حال سروتیپ‌های G₆ و G₁₀ سروتیپ‌های غالب دخیل در اسهال روتاویروسی گوساله‌ها می‌باشند (۶،۸). میزان شیوع اسهال‌های روتاویروسی گوساله‌ها در کانادا (۸) ژاپن (۷) آمریکا (۱۰) و اسرائیل (۳) به ترتیب ۷۹، ۲۴/۷، ۴۱/۴ و ۷۹ درصد بوده است.

در ایران نیز تنها بررسی صورت گرفته توسط کارگر موخر و همکاران (۹) مؤید شیوع ۳۱/۷ درصدی اسهال روتاویروسی در گوساله‌های گاوداریهای اطراف تهران بوده است. بنابراین با توجه به اهمیت اسهال‌های روتاویروسی، بر آن شده تا ضمن مطالعه‌ای دقیق، میزان شیوع اسهال‌های روتاویروسی در گاوداریهای اطراف تهران که بخش عمده‌ای از گاوداریهای صنعتی کشور را تشکیل می‌دهند، تعیین و برای اولین بار در ایران سروتیپ‌های روتاویروسی شایع در این گاوداریها را شناسایی نماییم. این اطلاعات در آینده می‌تواند در برنامه‌های کنترل و پیشگیری از این بیماری مهم مورد استفاده قرار گیرند، زیرا سروتیپ‌های روتاویروسی به طور معمول بر علیه یکدیگر محافظت ایجاد نمی‌کنند، بدین معنی که گوساله مبتلا شده با یک سروتیپ بر ضد سروتیپ‌های دیگر ایمن نمی‌شوند (۱۲).

مواد و روش کار

برای تهیه نمونه مدفوع هفت گاوداری در اطراف تهران در نظر گرفته شد. نمونه‌گیری طی یک دوره یکساله از مهرماه ۱۳۷۷ تا مهرماه ۱۳۷۸ صورت گرفت. در هر فصل ۱۲۵ نمونه مدفوع گوساله اسهالی با سن زیر یک

۱) گروه آموزشی میکروبی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز - ایران.

۳) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران، اهواز - ایران.



میکروسکوپ الکترونی در یک بررسی مشابه درصد شیوع کمتری را نشان دهد (۶).

مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعات صورت گرفته در سایر کشورها حاکی از آن است که در مجموع، میزان شیوع اسهال‌های روتاویروسی در این مطالعه کمتر نشان داده می‌شود، و این اختلاف گاهی تا ۳۰ درصد یا بیشتر هم می‌رسد. در اکثر مطالعات مشابه که در سایر کشورها صورت پذیرفته از کیت‌های الیزای تجاری استفاده نشده است بلکه محققین خود اقدام به تهیه پلیت الیزا نموده‌اند.

بنابراین ممکن است بخشی از این تفاوت مربوط به شیوه تهیه پلیت‌های الیزا و تفاوت در حساسیت آنها باشد. در اکثر مطالعات مشابه، نمونه‌گیریها فصلی نبوده و در فصول خاصی از سال که اسهال‌های روتاویروسی شایعتر می‌باشند، تعداد نمونه‌های تهیه شده بیشتر بوده است. این نکته که نمونه‌برداری در چه محدوده سنی صورت گیرد و نوع گاوداری (شیری یا گوشتی) تحت مطالعه از چه نوع باشد به طور قطع بر روی اشاعه بیماری تأثیرگذار است. اسهال روتاویروسی به دلیل شرایط نگهداری گوساله‌ها، در گله‌های گوشتی معمولاً شایعتر می‌باشد (۴، ۱۳، ۱۴). همان گونه که از نتایج این تحقیق نیز مستفاد می‌شود این عفونتها در گوساله‌های ۲-۳ هفته بیشتر بوده و بنابراین اگر تعداد نمونه‌های تهیه شده در این محدوده سنی زیاد باشد درصد شیوع بالاتر برآورد می‌گردد. آماری بودن شرایط مطالعه ایرادی است که در بسیاری از مطالعات مشابه دیده می‌شود و بنابراین نمی‌توان مطمئن بود که نتایج حاصل از این مطالعات قابل تعمیم بر روی جمعیت باشد.

همان گونه که ذکر شد در این مطالعه اختلاف معنی‌داری بین میزان شیوع در فصل بهار با زمستان و نیز تابستان با زمستان وجود دارد که این موضوع با مطالعات برانند و همکاران (۲) و برنر و همکاران (۳) همخوانی دارد. در اکثر کشورها عفونتهای روتاویروسی الگوی فصلی دارند و اوج عفونت در فصول سرد سال است. علت فصلی بودن شیوع ممکن است متفاوت بودن رطوبت نسبی در فصول مختلف باشد زیرا ثابت شده است پایین بودن دما و رطوبت نسبی، بقای روتاویروسها را افزایش می‌دهد (۲، ۶). این الگوی فصلی بیشتر در نواحی معتدل مشهود است و در نواحی گرمسیری معمولاً در فصول مختلف میزان شیوع تفاوت معنی‌داری ندارد (۶). ممکن است بخشی از علت فصلی بودن، متفاوت بودن تراکم محل زیست و تفاوت در نوع تغذیه در فصول مختلف باشد. ثابت شده است که سوء تغذیه می‌تواند باعث وخیمتر شدن عفونتهای روتاویروسی گردد (۶). بنابراین در فصول سرد که تغذیه در وضعیت مطلوبی نیست و تراکم نیز بیشتر است انتقال عفونتهای روتاویروسی تسهیل می‌گردد.

همان گونه که قبلاً ذکر گردیده در این مطالعه میزان شیوع اسهال روتاویروسی در هفته سوم پس از تولد اختلاف معنی‌داری با سایر هفته‌ها داشته است که با اطلاعات ارائه شده در منابع مختلف همخوانی دارد (۴، ۶، ۱۳، ۱۴). وجود پادتنهای آغوزی و ایمنی موضعی قوی در هفته‌های اول و تا حدودی دوم باعث وقوع کمتر اسهالهای روتاویروسی در این سنین می‌شود. وقوع عفونت روتاویروسی طبیعی در هفته‌های سوم و چهارم باعث پیدایش ایمنی موضعی و عمومی فعال شده بنابراین میزان عفونتهای روتاویروسی در گوساله‌های بزرگتر از یکماه به طور معنی‌داری کم می‌گردد.

در این مطالعه سروتیپهای غالب سروتیپ G_6 (۴۱/۷ درصد) و G_{10} (۳۳/۳ درصد) بوده است که با بسیاری از مطالعات مشابه (۵، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۵) همخوانی دارد. درصد سروتیپهای غیر G_6 و G_{10} ، در مطالعه حاضر ۱۶/۷ درصد برآورد شده است که این میزان خیلی کمتر از ارقام به دست آمده در بررسیهای مشابه می‌باشد (۸، ۱۰). از آنجا که کم تعداد بودن ویروس در نمونه مدفوع ممکن است باعث ایجاد اشکال در تعیین سروتیپ توسط الیزا شود، احتمال دارد این تفاوت ناشی از این مهم باشد. البته لازم به ذکر است که این مطالعه صرفاً بر روی گاوداریهای شیری صورت گرفته در حالی که در مطالعات مذکور گاوداریهای تحت مطالعه از هر دو نوع گاوداریهای شیری و

جدول ۱- درصد شیوع اسهال‌های روتاویروسی در گاوداریهای تحت بررسی در ماهها و فصول مختلف.

ماه، فصل	تعداد نمونه گرفته شده	تعداد نمونه مثبت از نظر روتاویروس	درصد شیوع
فروردین	۳۸	۸	۲۱/۰۵
اردیبهشت	۴۳	۱۱	۲۵/۵۸
خرداد	۴۴	۱۰	۲۲/۷۲
بهار	۱۲۵	۲۹	۲۳/۲
تیر	۳۷	۸	۲۱/۶۲
مرداد	۴۸	۱۱	۲۲/۹۱
شهریور	۴۰	۹	۲۲/۵
تابستان	۱۲۵	۲۸	۲۲/۴
مهر	۳۷	۱۱	۲۹/۷۲
آبان	۴۳	۱۷	۳۹/۵۳
آذر	۴۵	۱۲	۲۶/۶۶
پاییز	۱۲۵	۴۰	۳۲
دی	۳۷	۱۴	۳۷/۸۳
بهمن	۴۰	۲۰	۵۰
اسفند	۴۸	۱۳	۲۷/۰۸
زمستان	۱۲۵	۴۷	۳۷/۶

جدول ۲- میزان شیوع اسهال روتاویروسی در سنین مختلف در ۵۰۰ گوساله مورد بررسی قرار گرفته.

سن (هفته)	تعداد موارد بررسی شده	تعداد نمونه مثبت از نظر روتاویروس	درصد شیوع
۱	۱۱۵	۲۴	۲۰/۸۶
۲	۱۳۴	۳۷	۲۷/۶۱
۳	۹۳	۴۰	۴۳/۰۱
۴	۱۰۱	۲۸	۲۷/۷۲
۵	۵۷	۱۵	۲۶/۳
مجموع	۵۰۰	۱۴۴	۲۸/۸

گاوداریهای اطراف تهران برای اولین بار در ایران به تعیین سروتیپهای روتاویروسی در این منطقه پرداخته شد.

در مطالعه‌ای که توسط کارگر موخر و همکاران (۹) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بر روی ۶۳ نمونه مدفوع از گوساله‌های اسهالی گاوداریهای اطراف تهران انجام گردید وجود روتاویروس در ۲۰ نمونه یعنی در ۳۱/۷۴ درصد از نمونه‌ها نشان داده شد. لازم به ذکر است که نمونه‌های مورد آزمایش در آن مطالعه تماماً مربوط به ۶ ماه اول سال یعنی دو فصل بهار و تابستان بوده‌اند.

در مطالعه حاضر آزمایش الیزا میزان شیوع اسهال‌های روتاویروسی در گوساله‌های زیر یکماه را ۲۸/۸ درصد برآورد نمود که با نتایج حاصل از مطالعه کارگر موخر و همکاران تقریباً همخوانی دارد گرچه روش تشخیص در دو مطالعه متفاوت است و زمان و فصلهای نمونه‌گیری هم در این دو مطالعه فرق دارند. اسهال‌های روتاویروسی معمولاً شیوع فصلی داشته و شیوع آنها در فصول زمستان و پاییز بیشتر است. به هر حال در بررسی حاضر این مطالعه میزان شیوع در دو فصل بهار و تابستان ۲۲/۸ درصد بوده است در حالی که در مطالعه کارگر موخر و همکاران این میزان ۳۱/۷۴ درصد تخمین زده شده است. در توجه این اختلاف می‌توان بدین نکته اشاره کرد که میکروسکوپ الکترونی روش دقیقتر و حساستری جهت تشخیص مورفولوژی روتاویروسهاست و انتظار می‌رود آزمایش الیزا در مقایسه با



تشکر و قدردانی

با تشکر از همکاری صمیمانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران، دکتر محمد رضا سلیمی، دکتر سیاوش مکتبی و سرکار خانم ارزانی.

References

1. فنراف جی و همکاران. (۱۹۹۳): ویروس شناسی دامپزشکی. بخش بیماریها ترجمه هادی کیوانفر و ناصر کریمی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۳۱۳-۳۰۹.
2. Brandt, C.D. Kim, H.W. Rodriguez, W.J. Arrobio, J.O. Jeffries, B.C. Parrott, H. (1982): Rotavirus gastroenteritis and weather, *Journal of Clinical Microbiology*, 16, 478-482.
3. Brenner, J. Elad. D. Markovics, A. Grinberg, A. Tranin, Z. (1993): Epidemiological Study of neonatal calve diarrhoea in Israel. A one-year survey of faecal samples, *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 48, 113-116.
4. Castro, A.E. Hevschele, W.P. (1992): *Veterinary Diagnostic Virology*, Mosby, USA, pp: 126-130.
5. Cornaglia, E. Elazhary, R. Talbot, B. (1993): Bovine rotavirus type detection by neutralizing monoclonal antibodies, *Archives of Virology*, 129, 243-250.
6. Fields, B.N. Knipe, D.M. Howley, P.M. Chanock, R.M. Melnick, J.L. Monath, T.P. Roizman, B. Straus, S.E. (1995): *Fields Virology*, Third edition, Lippincott, Raven, Philadelphia, pp: 1625-1708.
7. Fukai, K. Sakai, T. kamata, H. (1998): Distribution of G serotypes and p genotypes of bovine group A rotavirus isolated in Japan. *Australian Veterinary Journal*, 76: 418-422.
8. Hussein, A.H., Cornaglia, E., Saber, M.S., E.L., Azhary, Y. (1995): Prevalence of serotypes G₆ and G₁₀ group A rotaviruses in dairy calves in Quebec. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 59: 235-237.
9. Kargar, R., vand, Yoosefi, J. shahrabadi, M.S., Khodashenas, M., heidarzadeh, B. (1981): Diarrhea in calves: diagnosis and incidence around Tehran, *Archives de l' Institute Razi*, 32: 91-99.
10. Lucchelli, A., Kang, S.Y., Jayasekera, M.K., Parwani, A.V., Zeman, O.H., Saif, L. J., (1994): A survey of G₆ and G₁₀ serotypes of group A bovine rotaviruses from diarrheic beef and dairy calves using monoclonal antibodies in ELISA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6: 175-181.
11. Matsuda, Y., Nakagomi, O., Offit, P.A. (1990): Presence of three types (VP₄ serotypes) and two G, types (VP₇ serotypes) among bovine rotavirus strain, *Archives of Virology*, 115: 199-207.
12. Murakami, R., Nichioka, N., Eguchi, M., Kuniyasu, C. (1990): Serotype, Specific antibody responses of calves infected naturally with rotavirus, *Japanese Journal of Veterinary Science*, 52: 171-174.
13. Radostits, O. M., Blood, D. C., Gay, C.C. (1994): *Veterinary Medicine, A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats, and Horses*, Eighth edition, Bailliere tindall, England, PP: 1016-1025.
14. Smith, B.P. (1996): *Large Animal Internal Medicine*, Second edition, Mosby, USA, PP: 1673-1675.
15. Snodgrass, D.R., Fitzgerald, T., Campbell, L., Scott, FMM, Browning, G.F., Miller, D.L., Herring, A.J., Greenberg, H.B. (1990): Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 504-507.

A survey on prevalence of rotaviral diarrhea in dairy calves in Tehran region and determination of serotypes

Keyvanfar, H.¹, Ghorbanpour, M.², Seifi Abad Shapouri, M.R.³

¹Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. ²Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shalhid chamran University (Ahvaz), Ahvaz - Iran.

Five hundred fecal samples from diarrheic dairy calves (under 1 month old) collected from 7 regions in Tehran, between October 1998 to October 1999. Samples were screened for group A bovine rotavirus (BRV) using antigen capture enzyme - linked immunosorbent assay (AC-ELISA). The overall prevalence of BRV infection was 28.8%. Twenty four BRV positive samples were randomly selected and serotyped by AC-ELISA using G₆ and G₁₀ monoclonal antibodies. Analysis of these samples revealed that 10 (41.7%) were G₆, and 8 (33.3%) were G₁₀ Positive. Two samples (8.3%) were Positive for both G₆ and G₁₀ Serotypes. Four samples (16.7%) were found to be untypeable (G₆ and G₁₀ negative).

Key words : Diarrhea, Calf, Rotavirus, Serotype.

