

بررسی فراوانی روتاویروس، کروناویروس، E. coli K99 و کریپتوسپوریدیوم در اسهال گوساله‌ها در شهرستان اراک به روش الیزا

● شمس‌الدین قائم‌مقامی، عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان مرکزی

● روحانی کارگر مؤخر، عضو هیأت علمی مؤسسه واکنس و سرم‌سازی رازی

● حجت‌آبادی... نیرومند، کارشناس مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان مرکزی

تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۷۸

شهرستان اراک تعداد ۸۲ نمونه مدفوع از گوساله‌های مبتلا به اسهال با سن کمتر از یک ماه به این ترتیب جمع‌آوری گردید. در هر یک از گاوداریهای تحت آزمایش تعدادی شیشه‌آونیسورسال در پیچ‌دار ۲۰ سی‌سی به مسؤل پرورش گوساله‌ها تحویل شده و نامبرده موظف گردید که با مشاهده اسهال ادامه‌دار نسبت به جمع‌آوری آن به طور مستقیم اقدام نموده و آن را در یخچال قرار دهد. نمونه‌ها پس از ارسال به آزمایشگاه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده و متعاقباً به روش الیزا از نظر آلودگی به هر یک از عوامل روتاویروس، کروناویروس، E. coli K99 و کریپتوسپوریدیوم ارزیابی شدند.

ب- روش کار

جهت ارزیابی نمونه‌های جمع‌آوری شده از ۴ نوع کیت مجزای روتاویروس، کروناویروس، E. coli K99 و کریپتوسپوریدیوم (ساخت شرکت سانوفی) استفاده شد و بدین ترتیب با استفاده از کیت‌های فوق هر یک از نمونه‌ها از نظر آلودگی به چهار عامل مذکور مورد آزمایش قرار گرفت. پس از خارج ساختن نمونه‌های مدفوع از فریزر و ذوب سریع آنها به وسیله حرارت، با اضافه نمودن بافر رقیق کننده به هر نمونه، آنها را رقیق نموده و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به حفرات کیت اضافه می‌نمودیم. سپس میکروپلیت به مدت ۶۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شده و متعاقب آن به وسیله بافر شستشو (توسط Washer الیزا) ۳ بار شسته شده و در مرحله بعد به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه (پادتن مونوکلونال متصل شده به آنزیم پراکسیداز) به هر حفره کیت اضافه نموده و مجدداً آن را برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه نمودیم. پس از شستشوی پلیت همانگونه که گفته شد در مرحله بعد محلول سوبسترای آنزیم (پراکسیداز هیدروژن) و کروموژن به آنها اضافه شده و در نهایت واکنش آنزیمی به وسیله اسید متوقف شده و نتایج در طول موج ۴۵۰ نانومتر و به وسیله دستگاه الیزا ریدر قرائت گردید و در پایان مطابق دستورالعمل ارائه شده در کیت، موارد مثبت مشخص شد.

نتیجه و بحث

از تعداد ۸۲ نمونه مدفوع، ۶۹ مورد (۸۴٪) از نظر یک یا مجموعه‌ای از عوامل فوق مثبت و ۱۳ مورد آن

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 43 PP: 60-61

Study on prevalence of rotavirus, coronavirus, E. coli k99 and cryptosporidium in calf diarrhoea using ELISA test.

By: Ghaemmaghami Sh., Kargar Moakhar R., Niroumand H. and Sadri, R.

Fecal samples from 82 untreated diarrhoeic calves from different dairy farms were screened for rotaviruses, coronaviruses, E. coli k99 and cryptosporidium by ELISA test. 69 fecal samples (84%) were found to be infected to one or more than one of these agents. Overall infection to cryptosporidia in 41 samples (50%), to rotavirus in 28 samples (34%), to coronavirus in 28 samples (34%) and to E. coli K99 in 24 samples (30%) were detected.

امکانات پیشرفته آزمایشگاهی مانند میکروسکوپ الکترونی و الیزا زمینه مساعدی را جهت شناسایی این عوامل مهیا نموده است. در حال حاضر مشخص شده است که روتاویروس، کروناویروس، E. coli K99 و کریپتوسپوریدیوم حدوداً مسؤل ۵۵ تا ۷۵ درصد عفونت‌های روده‌ای در گوساله‌های تازه متولد شده در سرتاسر دنیا هستند که تمایز آنها از یکدیگر براساس علائم بالینی به تنهایی ممکن نبوده و استفاده از روشهای آزمایشگاهی در این زمینه اهمیت به‌سزایی دارد (۲، ۴، ۵، ۷) تست الیزا از جمله روشهای آزمایشگاهی است که برای تشخیص آلودگی عوامل فوق به کار گرفته می‌شود (۷).

مواد و روش کار

الف - نمونه‌گیری

در یک دوره ۹ ماهه از ۱۲ گاوداری صنعتی واقع در

چکیده

اسهال در گوساله‌ها یکی از عوارض شایع در سطح دامپروریها بوده و از علل مهم زیان اقتصادی گله‌های گاو به حساب می‌آید. شواهد موجود حاکی از آن است که در بروز سندرم فوق عوامل متعددی از جمله باکتریها، ویروسها، تک یاخته‌ها و ... دخالت نموده و تفکیک و تمایز آن از طریق علائم بالینی ممکن نمی‌باشد. در این بررسی که در سطح دامپروریهای صنعتی صورت گرفت مجموعاً تعداد ۸۲ نمونه مدفوع مربوط به گوساله‌های مبتلا به اسهال با سن زیر یک ماه از نظر آلودگی به روتاویروس، کروناویروس، E. coli K99 و کریپتوسپوریدیوم (عوامل معمول مولد اسهال گوساله) به روش الیزا مورد آزمایش قرار گرفت. به طور کلی از تعداد ۸۲ نمونه، ۶۹ نمونه (۸۴٪) به یک یا مجموعه‌ای از عوامل فوق آلوده بودند. در مجموع، آلودگی به کریپتوسپوریدیوم در ۴۱ نمونه (۵۰٪)، روتاویروس در ۲۸ نمونه (۳۴٪)، کروناویروس در ۲۸ نمونه (۳۴٪) و E. coli K99 در ۲۴ نمونه (۳۰٪) تشخیص داده شد.

مقدمه

اسهال در حیوانات تازه متولد شده به ویژه گوساله‌ها با سن کمتر از ۳۰ روز یکی از مهم‌ترین بیماریهایی است که دامپزشکان در دامداری با آن برخورد می‌نمایند. همچنین بیماری اسهال یکی از عوامل مهم زیان اقتصادی در گله‌های گاو می‌باشد. بررسیهای انجام شده در گله و آزمایشگاه نشان داده که در بروز اسهال تنها یک عامل دخالت نمی‌نماید بلکه مجموعه‌ای از میکروبها از قبیل باکتریهای آنروپاتوژن، ویروسها، تک یاخته‌ها و عواملی مانند میزان ایمنی، تغذیه، شرایط بهداشتی و غیره می‌تواند در ایجاد عارضه مذکور دخالت داشته باشد (۲).

با وجود مطالعات فراوان میکروبیولوژی و سرولوژی تا چندین سال پیش تشخیص همه عوامل مولد اسهال در گوساله‌ها غیر ممکن به نظر می‌رسید ولی دسترسی به

clinical microbiology, 33: 7, 1963-1965.
 5- Scheultz constance et al, 1994. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. Journal of clinical Microbiology, 32: 10, 2393-2397.
 6- Shahrabadi M.S Kargar moakhar, R. 1978. Isolation of virus like particles from fecal material obtained from diarrheal calves. Arch, Inst. Razi, 30, 129-132.
 7- Thorns christopher et al, 1992. Development of monoclonal antibody elisa for simultaneous detection of bovine corona virus, rotavirus serogroup a, and *Escherichia coli* k99 antigen in feces of calves, American journal of veterinary research, 52: 1, 36-43.

مناسب و... برنامه‌ریزی جهت افزایش قابلیت ایمنی‌زایی کلستروم (تهیه واکسن مناسب در مقابل عوامل میکروبی مورد نظر و استفاده در گاوهای آبستن) صورت پذیرد.

منابع مورد استفاده

۱- نوری، محمد، جزوه درسی اسهال گوساله، صفحه ۳۹-۴۲.
 2- Blood D.S. and Radostits O.M., 1994. Veterinary Medicine, Eighth Edition. Bailliere tindall-London - PP: 703-705, 716 - 723, 1023-1024, 1195, 1198.
 3- Kargar R. et al, 1981. Diarrhea in calves diagnosis and incidence around Tehran. Arch Inst Razi, 32, 91-99.
 4- Mary T. et al, 1995. Evaluation of new rapid commerial enzyme immunoassay for detection of cryptosporidium oocysts in untreated stool specimen. Journal of

(۱۶٪) منفی بود (نمودار شماره ۱). آلودگی به کریپتوسپورییدیوم در ۴۱ نمونه (۵۰٪) روتاویروس در ۲۸ نمونه (۳۴٪)، کروناویروس در ۲۸ نمونه (۳۴٪) و *E. coli* K99 در ۲۴ نمونه (۳۰٪) مشاهده گردید (نمودار شماره ۲). نتایج این تحقیق انگل کریپتوسپورییدیوم را به عنوان عامل غالب در نمونه‌ها معرفی می‌نماید. این نکته توسط سایر گزارشاتی که در ارتباط با فراوانی عوامل مذکور در کشورهای مختلف ارائه شده است تأیید می‌گردد (۲). این تک‌یاخته از نظر میزبان تعدد و تنوع زیادی داشته و موارد جدا شده از پستانداران به راحتی به گونه‌های مشابه و غیرمشابه قابل انتقال هستند بنابراین آلودگی سایر حیوانات مزرعه، جوندگان و گونه‌های وحشی می‌تواند به عنوان مخزنی برای عفونت حیوانات اهلی عمل نموده و سبب بقاء آلودگی در محیط گردد همچنین در طی بررسی انجام شده، وجود سایر عوامل معمول ویروسی و باکتریایی در نمونه‌های آزمایش شده به اثبات رسید (۲).

نسبت شیوع روتاویروس ۳۴٪ نشان داده شده است که تقریباً با تحقیقات مشابه که در سایر استانها و با استفاده از سایر روشهای تشخیصی (میکروسکپ الکترونی) انجام گرفته است هم‌خوانی دارد (۳). میزان شیوع کروناویروس ۳۴٪ بوده که در مورد این عامل نیز در ابران تحقیقات جامعی صورت نگرفته و فقط در بعضی از موارد وجود آن در نمونه‌های مدفوع به طور مستقیم و توسط میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفته است (۶). صرف‌نظر از باکتری *E. coli* (که البته این باکتری نیز به درمان دارویی مقاومت نشان می‌دهد) در مورد سایر عوامل فوق‌الذکر درمان دارویی معمول نبوده و توصیه می‌گردد اقدام لازم در زمینه پیشگیری صورت پذیرد. که با توجه به حضور بالای روتاویروس و کروناویروس به عنوان عامل معمول اسهال در گوساله‌ها باید چاره‌ای اندیشیده شود. به خصوص در مورد ضدعفونی جایگاه‌های گوساله که حتماً باید به مسأله مقاومت عوامل در برابر ضد عفونی کننده‌ها توجه نموده و به این منظور از مواد شیمیائی مؤثر و یا عوامل فیزیکی مثل شعله (برای مکانهای مقاوم در برابر آتش) استفاده به عمل آورد.

یکی از مهمترین راههای مبارزه با این عوامل ایجاد ایمنی پاسیو در حیوان می‌باشد. در این راستا باید حالتی را بوجود آورد که همواره پادتن در روده وجود داشته باشد تا به محض ورود عامل بیماری‌زا به دستگاه گوارش آن را خنثی نماید و این حالت زمانی فراهم می‌شود که گوساله تازه به دنیا آمده به مقدار زیاد کلستروم غنی از پادتن روتاویروس، کروناویروس، *E. coli* K99 و کریپتوسپورییدیوم را دریافت کرده باشد.

براساس تحقیقات انجام شده مشخص گردیده که وجود پادتن در دستگاه گوارش نقش اولیه و اساسی در پیشگیری از بروز عارضه اسهال را به عهده دارد. همچنین مشخص شده که مصرف تدریجی و طولانی مدت کلستروم اثر بهتری ایجاد می‌نماید (۱). به همین علت به نظر می‌رسد که ایجاد یک بانک ذخیره آغوز ضروری می‌باشد تا به وسیله آن بتوان در چند روز اول حیات گوساله، به میزان ۵ تا ۱۰ درصد آغوز با شیر آنها مخلوط نموده و بدین ترتیب احتمال ابتلا به عارضه مذکور را کاهش داد، همچنین لازم است تا در کنار سایر اقدامات مدیریتی از قبیل رعایت بهداشت، تغذیه

