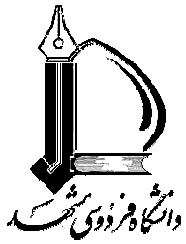
« مقدمه »



دانشکده دامپزشکی

پایان نامه

جهت دریافت درجه دکتری عمومی در رشته دامپزشکی(DVM)

بررسی کارایی تولیدمثلی در بین گاوهایی با آنتی بادی بر علیه ویروس BVD

به کوشش:

فاطمه اسکندرزاده

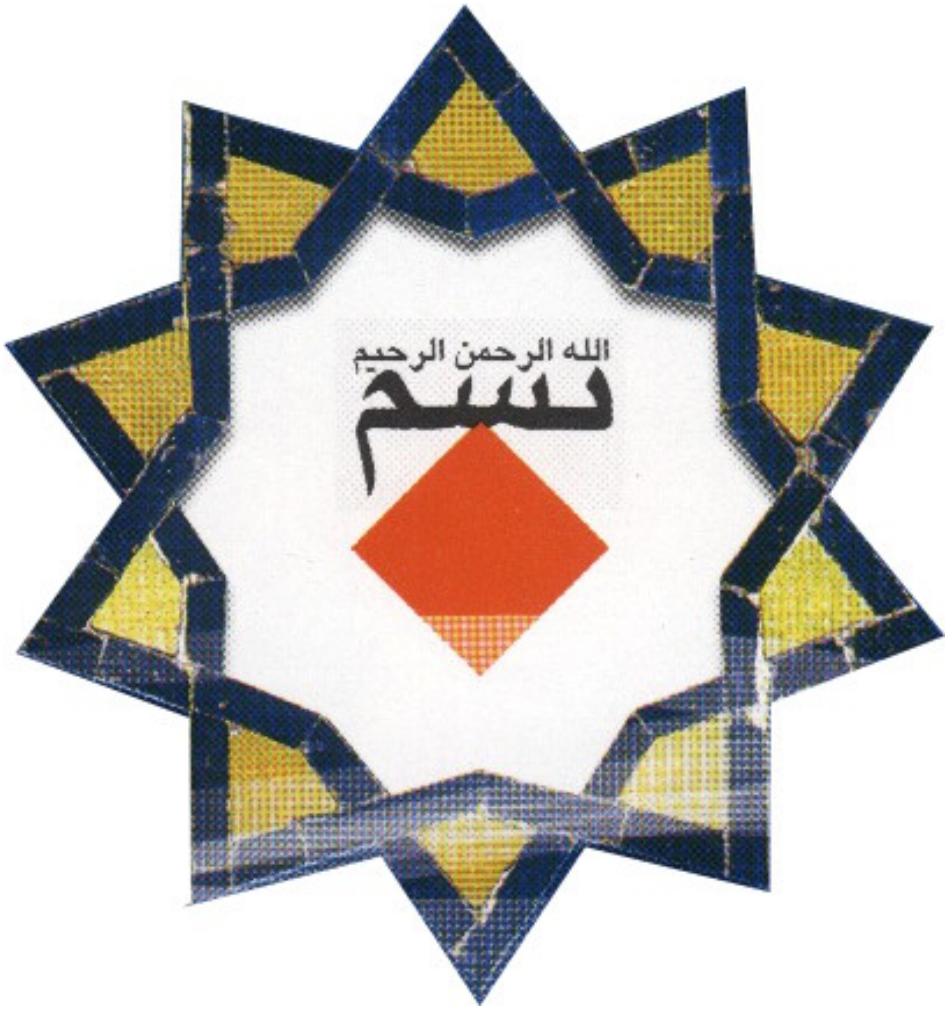
استاد راهنما

دکتر مسعود طالب خان گروسی

استاد مشاور

دکتر جلیل مهرزاد

تیر ۱۳۹۱


بسم
الله الرحمن الرحيم

چکیده

بررسی کارایی تولیدمثلی در بین گاوهایی با آنتی بادی بر علیه ویروس BVD

به کوشش:

فاطمه اسکندرزاده

بیماری BVD یک بیماری ویروسی از جنس پستی ویروس و خانواده فلاوی ویریده است. از نظر اپیدمیولوژی این ویروس در نشخوارکنندگان بسیار خطرناک بوده و سبب خسارات اقتصادی زیادی شامل کاهش کارایی تولیدمثلی، کاهش تولید شیر، سرکوب سیستم ایمنی، تولد گوساله های ناقص الخلقه و یا گوساله های دارای عفونت پایدار در گله گاوها می شود. هدف اصلی مطالعه حاضر، بررسی کارایی تولیدمثلی در بین گاوهایی با آنتی بادی سرمی بر ضد ویروس BVD می باشد. در این بررسی ۱۴۰ رأس گاو و تلیسه نژاد هلشتاین در سه گله از گاوداریهای صنعتی اطراف مشهد به طور تصادفی برای خونگیری انتخاب شدند. حضور آنتی بادی بر ضد ویروس BVD در خون گاوها با تست الایزای غیر مستقیم آنالیز شد. ارتباط بین نتایج آزمایش الایزا (مثبت بودن یا منفی بودن نسبت به بیماری BVD) با پارامترهای کیفی تولیدمثلی از قبیل تعداد زایش، روزهای باز، فاصله گوساله زایی، جفت ماندگی ، وضعیت تولد جنین، تعداد تلقیحات منجر به آبستنی و سن دامها مورد بررسی قرار گرفت. سپس در گاوهای مورد مطالعه اطلاعات بدست آمده با استفاده از روش آماری spearman correlation testمورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج آزمون های آماری انجام شده نشان داد که بین تلیسه، گاو، جفت ماندگی و سایر پارامترهای کیفی مرتبط با تولیدمثل مورد بررسی در این مطالعه با نتیجه آزمون الایزای سرم ارتباط معنی داری وجود نداشت. هم چنین بین عواملی از قبیل سن، تعداد زایش، فاصله گوساله زایی، روزهای باز و تعداد تلقیح منجر به آبستنی با میزان عیار ضد ویروس BVD درسرم گاوها ارتباط معنی داری وجود نداشت. ولی در مورد پارامترهای سن گاوها وتعداد زایش آنها با وجود آنتی بادی سرمی رابطه مستقیمی وجود داشت اما معنی دار نبود. با توجه به اینکه تقریباً تمام گاوهای مورد بررسی در طول زندگیشان حداقل یکبار ویروس BVD آلوده شده اند مطالعه بیشتر جنبه های اساسی اثرات این ویروس بر بیولوژی و کارایی تولیدمثل گاوها در ایران ضروری است.

کلمات کلیدی: ویروس بیماری اسهال ویروسی گاو، الایزا، کارایی تولیدمثل، آنتی بادی، روزهای باز، فاصله گوساله زایی.

فهرست مطالب :

بررسی کارایی تولیدمثلی در بین گاوهایی با آنتی بادی بر علیه

ویروس BVD

مقدمه ۱

۱ـ مبانی نظری تحقیق..... ۴

۱-۱ بیماری ۴

BVD.....

۱-۱-۱- تعریف و سبب شناسی ۴

۱-۱-۲- اپیدمیولوژی بیماری BVD ۶

۱-۱-۲-۱- شیوع بیماری BVD ۶

۱-۱-۲-۲- انتقال ویروس BVD ۷

۱-۱-۳- روشهای تشخیص ۸

۱-۱-۳-۱- جداسازی ویروس BVD ۸

۱-۱-۳-۲- روش های تشخیص اسید نوکلئیک..... ۹

۱-۱-۳-۳-تشخیص آنتی ژن ویروس BVD..... ۹

۱-۱-۳-۴- روش های سرولوژی..... ۹

۱-۱-۳-۴-۱- تشخیص حیوانات دارای عفونت پایدار ۱۰

۱-۱-۴- درمان و کنترل بیماری BVD ۱۱

۱-۱-۵- اثرات بالینی ویروس BVD ۱۲

۱-۱-۵-۱- اسهال ویروسی حاد ۱۳

۱-۱-۵-۲- عفونت BVD فوق حاد ۱۴
۱-۱-۵-۳- سندرم هموراژیک ۱۴
۱-۱-۶- اثرات ویروس BVD بر سیستم تولید مثل..... ۱۶
۱-۱-۶-۱- اثر ویروس BVD بر تخمدان ۱۶
۱-۱-۶-۲- اثر ویروس BVD بر روی رحم..... ۱۸
۱-۱-۶-۳- اثر ویروس BVD بر روی دیگر بافت های تولید مثلی جنس ماده ۱۸
۱-۱-۷- اثر ویروس BVD در مراحل مختلف آبستنی ۱۸
۱-۱-۷-۱- اثرات ویروس BVD در روز ۰-۴۵ آبستنی..... ۱۸
۱-۱-۷-۲- اثرات ویروس BVD در روز ۴۵-۱۲۵ آبستنی..... ۱۹
۱-۱-۷-۲-۱- دامهای دارای عفونت پایدار ۲۰
۱-۱-۷-۳- اثرات ویروس BVD در روز ۱۲۵-۱۷۵ آبستنی..... ۲۲
۱-۱-۷-۴- اثرات ویروس BVD در روز ۱۸۰ تا انتهای آبستنی ۲۴
۱-۱-۸- اثر ویروس BVD بر روی مرگ و میر جنین ۲۴
۱-۱-۸-۱- اثر ویروس BVD بر جنین بافت زنده ۲۴
۱-۱-۸-۲- اثر ویروس BVD بر جنین در شرایط آزمایشگاهی ۲۶
۱-۱-۹- اثرات ویروس BVD بر عملکرد تولید مثلی ۲۸
سقط جنین ناشی از ویروس BVD ۲۸
اثر ویروسBVD بر روی میزان گیرایی ۳۰
اثر ویروسی BVD بر روی باروری ۳۱
اثر ویروس BVD بر روی جفت ماندگی..... ۳۲
اثر ویروس BVD بر روی فاصله گوساله زایی ۳۲
اثر ویروس BVD بر روی تعداد تلقیحات ۳۲

انتقال ویروس BVD از منی ۳۳

مروری بر تحقیقات انجام شده.....۳۵

۱-۲- ELISA و اجزای آن ۳۸

الایزا چیست ؟..... ۳۸

۱-۲-۱- روش ELISA رقابتی ۳۹

۱-۲-۲- روش ELISA غیر رقابتی ۴۰

۱-۲-۳- اجزای کیت های آلایزا و کاربردهای آن ۴۰

۱-۲-۳-۱- میکروپلیت پوشش داده شده با آنتی بادی یا آنتی ژن ۴۱

۱-۲-۳-۲- آنتی بادی ۴۲

۱-۲-۳-۳- محلول کونژوگه آنزیمی ۴۳

۱-۲-۳-۴- محلول سوبسترا کوروموژن..... ۴۳

۱-۲-۳-۵- محلول شستشو ۴۴

۱-۲-۳-۶- استاندارد ها..... ۴۵

۱-۲-۳-۷- محلول بازدارنده ۴۵

۱-۲-۳-۸- اجزای دیگر ۴۵

مکانیزم کلی روش آلایزا..... ۴۶

جستجوی آنتی بادی در نمونه ها ۴۶

جستجوی آنتی بادی به روش ساندویچ..... ۴۷

۲ـ مواد و روش ها ۴۹

۲-۱- مواد و لوازم مورد استفاده ۴۹

۲-۱-۱- نمونه گیری و جمع آوری نمونه ها ۵۰

۲-۱-۲- آماده سازی معرف ها جهت انجام ELISA ۵۰

۲-۱-۳- آزمایش آلایزا(ELISA) ۵۱

انجام آزمایش ELISA ۵۲

۲-۲- محاسبه نتایج واکنش های ELISA ۵۴

۲-۲-۱- تفسیر نتایج..... ۵۴

۳ـ نتایج ۵۷

۴- بحث ، نتیجه گیری و پیشنهادها..... ۷۳

۴-۱- بحث ۷۳

۴-۲- نتیجه گیری و پیشنهادها..... ۷۹

منابع و مراجع ۸۲

فهرست جداول

عنوان و شماره **صفحه**

جدول۲-۱- تفسیر نتایج با استفاده از عیار پادتن تولید شده (PP Value) ۵۵

جدول۳-۱- توزیع جمعیت دامی مورد مطالعه بر اساس آلودگی به ویروس BVDV در گاوداری های صنعتی مورد بررسی در پایان نامه حاضر.....۵۸

جدول ۳-۲- توزیع وضعیت آلودگی به ویروس BVD بر اساس Percent positivity (PP) در گاوداری های صنعتی مورد بررسی در پایان نامه حاضر.....۵۹

جدول۳-۳- ارتباط بین عیار پادتن ایجاد شده بر اساس Percent positivity و سن دامها در گاوداری های صنعتی مورد بررسی در پایان نامه حاضر.....۶۱

جدول۳-۴- ارتباط بین عیار پادتن ایجاد شده بر اساس Percent positivity(PP) و تعداد زایش(تعداد شیرواری) در گاوداری های صنعتی مورد بررسی در پایان نامه حاضر.....۶۲

جدول۳-۵- - ارتباط بین عیار پادتن ایجاد شده بر اساسPercent positivity و وضعیت تولد گوساله ها در زمان زایمان در گاوداری های صنعتی مورد بررسی در پایان نامه حاضر.....۶۳

جدول ۳-۶- ارتباط بین عیار پادتن ایجاد شده بر اساسPercent positivity و جفت ماندگی در گاوداری های صنعتی مورد بررسی در پایان نامه حاضر.....۶۴

جدول ۳-۷- ارتباط بین عیار پادتن ایجاد شده بر اساسPercent positivity بر اساس روزهای باز در گاوداری های صنعتی مورد بررسی در پایان نامه حاضر ۶۵

جدول ۳-۸- ارتباط بین عیار پادتن ایجاد شده بر اساسPercent positivity و فاصله گوساله زایی بر اساس روز در گاوداری های صنعتی مورد بررسی در پایان نامه حاضر.....۶۷

جدول ۳-۹- ارتباط بین عیار پادتن ایجاد شده بر اساسPercent positivity وتعداد تلقیحات بعد از آخرین زایش در گاوداری های صنعتی مورد بررسی در پایان نامه حاضر.....۶۹

جدول۳-۱۰-ارتباط بین PP Value حاصل آزمایش های الیزا و بعضی از پارامترهای تولیدمثلی در مطالعه حاضر.....۷۱

فهرست نمودارها

عنوان و شماره **صفحه**

نمودار ۱-۱-اثرات بالینی مربوط به سیستم تولید مثل گاو پس از عفونت با ویروس BVD در مراحل مختلف آبستنی.....۲۴

نمودار ۳-۱- ارتباط بین عیار پادتن ایجاد شده بر اساسPercent positivity بر اساس روزهای باز در گاوداری های صنعتی مورد بررسی در پایان نامه حاضر.....۶۶

نمودار ۳-۲- ارتباط بین عیار پادتن ایجاد شده بر اساسPercent positivity و فاصله گوساله زایی بر اساس روز در گاوداری های صنعتی مورد بررسی در پایان نامه حاضر.....۶۸

نمودار۳-۳- ارتباط بین عیار پادتن ایجاد شده بر اساسPercent positivity وتعداد تلقیحات بعد از آخرین زایش در گاوداری های صنعتی مورد بررسی در پایان نامه حاضر.....۷۰

فهرست شکل‌ها

عنوان و شماره **صفحه**

شکل ۱-۱: شکل ظاهری ویروس BVD.....۴

شکل ۱-۲: گوساله متولد شده آلوده به ویروس BVD و دارای کوتاهی فک پائین.....۲۳

شکل ۱-۳: هایپوپلازی مخچه در گوساله در اثر عفونت BVD.....۲۳

شکل۲-۱: شکل شماتیک ازالایزای غیر مستقیم.....۵۳

مقدمه

ویروس BVD [۱]ویروسی از جنس پستی ویروس[۲] متعلق به خانواده فلاوی ویریده[۳] می باشد که آسیب فراوانی به صنعت دامپروری وارد می کند. شیوع آنتی بادی بر علیه ویروسBVD در دنیا ۶۵ الی ۸۵ درصد گزارش شده است(۲۹). این مقدار بر اساس آزمون ELISA، در بین گاوهای شیری نژاد هلشتاین در دامپروری های صنعتی مشهد ۶۹ درصد گزارش شده است(۲۱). در این بررسی مشخص گردید که کلیه گله های مورد بررسی آنتی بادی مثبت بوده و میزان شیوع آن در گله های مورد بررسی بین ۶۶ الی ۱۰۰ درصد می باشد(۱۸, ۲۰, ۲۱).

تاکنون خسارات اقتصادی که مستقیماً به وسیله این ویروس ایجاد می شود دقیقاً محاسبه نشده است با این وجود نقش این ویروس به عنوان عامل سرکوب کننده ایمنی[۴]که زمینه ساز بروز سایر بیماری هاست مشخص شده است. بر خلاف اسم ظاهری این عامل بیماریزا، این ویروس قادر است که بر بسیاری از ارگان های بدن از جمله دستگاه تولیدمثل گاو تأثیر منفی بسزایی بگذارد. بیشترین خسارت وارده بر روی گاو ، ضایعات وارده بر روی دستگاه تولیدمثلی است(۴۶). کاهش کارایی تولیدمثلی دام در جمعیت های دامی شامل سقط در مراحل مختلف آبستنی، دفع گوساله مرده[۵] ، مرگ زودرس رویان، تولد گوساله های ضعیف، تولدهای زودرس، تولید گوساله هایی با عفونت پایدار[۶] (PI)، ناقص الخلقگی در گوساله ها ، کاهش میزان باروری ناشی از اختلال در اوولاسیون ، اوولاسیون تأخیری، تورم تخمدان(۴۶)، تعدادی از اثرات منفی و تخریبی است که توسط این ویروس ایجاد می شود(۸, ۵, ۲۵, ۳۰, ۳۹, ۴۲).

این ویروس قادر است باعث کاهش باروری تخمک هم در شرایط *in vivo* و هم در شرایط *in vitro* شود.تلیسه های دارای عفونت پایدار دارای باروری پایینی نسبت به سایر تلیسه های سالم می باشند(۶۲).

---

۱. Bovine Viral Diarrhoea
۲.Pestivirus
۳.Flaviviridae
٤. Immunosuppression
٥. Still birth
٦. Persistently infection

اکثر بررسی های صورت گرفته در رابطه با اثر این ویروس بر روی سیستم تولیدمثل به صورت تجربی و یا در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفته است(۸, ۳۰, ۱۸). و مطالعات انجام شده بر روی سیستم تولیدمثل در سطح گله ها بسیار کم می باشد(۴۲).

هدف از این بررسی ارزیابی ارتباط بین شاخص های تولید مثلی در گاوهایی که دارای آنتی بادی بر علیه ویروس BVD می باشند، است.

با توجه به اینکه چنین بررسی در زمینه تولیدمثلی در ایران صورت نگرفته است، فرض بر این است که کارایی تولیدمثلی در دام هایی که از نظر سرمی بر علیه ویروس BVD دارای آنتی بادی می باشند، طبیعی می باشد.

«فصل اول»

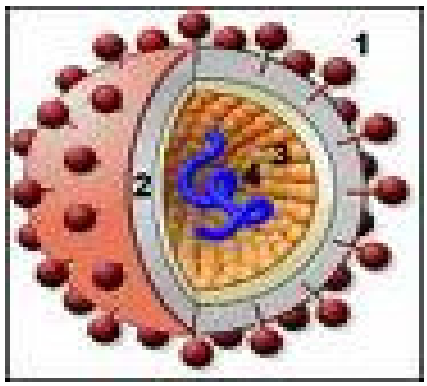
مروری بر تحقیقات انجام شده

۱- مبانی نظری تحقیق

۱-۱- بیماری BVD

۱-۱-۱-تعریف و سبب شناسی

بیماریBVD یک بیماری ویروسی است که سبب خسارات اقتصادی زیادی در گله می شود. ویروس BVD یک RNA ویروس تک رشته ایی و تک قطعه ایی نسبتاً کوچک (nm ۶۰-۴۰) غشا دار و کروی است. این ویروس در خانواده فلاوی ویریده و یکی از سه ویروس در جنس پستی ویروس می باشد. سایر اعضای این جنس شامل ویروس تب کلاسیک خوک[۱](ویروس وبای خوک) و ویروس بیماری مرزی گوسفند[۲] می باشد(۴, ۴۶, ۷۰).



شکل ۱-۱-شکل ظاهری ویروس BVD (۳۱).

این ویروس از مهم ترین پاتوژن های گاو درتمام سنین بوده وعامل سندروم های بالینی متفاوتی همچون اسهال ویروسی گاوها، بیماری موکوزی[۳] و عفونت جنین در گله می باشد(۶۵).

خسارات اقتصادی با ورود ویروس BVD به گله گاوهای حساس و آبستن مربوط به سقط، نقایص مادرزادی، مرده زایی، افزایش مرگ ومیر و تلفات نوزادان، افزایش ابتلا به دیگر بیماری

۱.Classical swine fever
۲.Border disease
۳.Mucosal disease

های عفونی، تأخیر در رشد قبل و بعد از نوزادی، کاهش کارایی تولیدمثلی مربوط به ناباروری، تلفات مربوط به بیماری مخاطی و حذف حیوانات PI در سنین شروع تولید است(۴۶).

بر اساس نوع اثر در کشت سلولی ویروس BVD شامل دو بیوتیپ سایتوپتیک[۱] (CP) وغیرسایتوپتیک[۲] (NCP) می باشد. در بین سویه های ویروس اختلاف آنتی ژنیکی و واکنش متقاطع وجود دارد. در مطالعات انجام گرفته با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ویروس های سایتوپتیک و غیرسایتوپتیک از نظر شکل ظاهری تفاوتی با یکدیگر ندارند(۴۶). بیوتیپ غیرسایتوپتیک در بین جمعیت گاوها بیوتیپ غالب است و اهمیت بیشتری دارد. سویه های NCP قادرند با جلوگیری از ایجاد پاسخ اینترفرون۱ در جنین باقی بمانند. در حالی که سویه هایCP قادر به این کار نمی باشند(۹, ۱۲).

ویروس BVD بر اساس اختلافهای آنتی ژنیکی و تفاوت در توالی نوکلئوتیدها به دو ژنوتیپ I و II تقسیم می شود. با وجود تفاوتهای آنتی ژنیکی در هر دو ژنوتیپ سویه هایی با حدت کم و زیاد وجود دارند. ژنوتیپ یک شامل BVD 1a و BVD1b می باشد که به ترتیب از مزارع آمریکا و اروپا جدا شده اند(۴۶, ۶۵).

وجود تفاوت های ژنوتیپی و آنتی ژنیک در بین ویروس های جدا شده، باعث بروز مشکلاتی در تشخیص آزمایشگاهی آن شده و سبب می شود کنترل کامل عفونت ویروس BVD از طریق واکسیناسیون با مشکل مواجه شود(۱۶).

در هر دو تیپ، بیوتیپ های CP و NCP وجود دارند. اگرچه تیپ II از شیوع های شدید BVD حاد جداشده است، تیپ یک در سویه های کلاسیک بیماری وجود دارد. ژنوتیپ II متداول ترین گروه ویروسی جدا شده از سندروم هموراژیک، BVD فوق حاد و گوساله های PI می باشد(۴, ۶۵). ژنوتیپ های II از نظر آنتی ژنیکی مجزا هستند و تعدادی از ایزوله های آن سبب بیماری بالینی شدید می شوند ولی سویه های بدون حدت هم وجود دارند(۴۶). پستی ویروس ها دارای چهار پروتئین ساختاری می باشند. یک پروتئین کپسید و سه نوع گلیکو

۱.Cytopathic
۲.Non cytopathic

پروتئین موجود در غشا. گلیکوپروتئین های موجود در غشای ویروس وبه ویژه gp ۵۳ و gp ۴۸[1] در اتصال ویروس و نفوذ آن به سلول های میزبان نقش دارند(۱۳). رسپتورهای متعدد برای اتصال ویروس BVD وجود دارد و سویه ی NCP و CP ویروس از رسپتورهای متفاوت برای ورود به سلول استفاده می کنند(۱۹, ۲۲). با وجود تفاوت های ژنوتیپی سویه های ویروس BVD برای هر گله اختصاصی می باشند. این بدان معنی است که ویروس های جدا شده از یک گله کم و بیش مشابه هم هستند مگر اینکه ویروس جدید به علت واکسیناسیون گله با واکسن زنده و یا وارد کردن دام آلوده به گله وارد گله شود(۴۵).

سویه های حدت دار بیماری مشخصی با علایم تب، اسهال، لکوپنی، لنفوپنی، نوتروپنی، ترمبووسایتوپنی و مرگ ایجاد میکند. عفونت با سویه های بدون حدت سبب لکوپنی وتب با درجه پائین می شود. سندروم هموراژیک وترومبوسایتوپنی به وسیله سویه NCP ایجاد می شوند. سویه غیرسایتوپتیک (با توانایی ایجاد عفونت پایدار) بیوتیپ غالب موجود در طبیعت است(۴۵). غالب عفونت های بعد از مرحله نوزادی با هردو بیوتیپ، عفونتهای تحت بالینی است و علایم اغلب ملایم و شامل تب، دپرسیون، بی اشتهایی و اسهال ولکوپنی است(۵۶).

۱-۱-۲- اپیدمیولوژی بیماری BVD

۱-۱-۲-۱-شیوع بیماری BVD

بیماری BVD انتشار جهانی دارد و هم چنین در اکثر استانهای ایران هم وجود دارد و دراکثر کشورها در حال افزایش است. در بعضی از کشورها (کشورهای اسکاندیناوی مثل سوئد، نروژ، فنلاند و دانمارک) برنامه عملی کنترل و ریشه کنی بیماری سبب کاهش شیوع و بروز بیماری شده است(۶۲). تفاوت در میزان تراکم گله ، اقدامات مدیریتی و استفاده از واکسن علت اختلاف در میزان شیوع می باشد. تفاوت قابل توجه ای در ابتلا به بیماری در بین گاوهای نژاد

[1].Glycoprotein

گوشتی و شیری دیده نمی شود. اگر در گله دام PI وجود داشته باشد، می تواند با دفع مقادیر زیادی ویروس ایمنی ناشی از واکسن را کاهش داده و در نتیجه سبب شود که تعداد دام هایی که از نظر آنتی بادی مثبت هستند افزایش یابد. تخمین زده شده است که در مناطقی که اقدامات کنترلی لازم انجام نمی شود، بین ۱-۲ درصد دام های گله دارای عفونت پایدار خواهند بود. دام های دارای عفونت پایدار ممکن است تا سن تولیدمثل زنده بمانند و عفونت را به نوزادان منتقل کنند(۱۵, ۲۰, ۴۶, ۴۸, ۵۴).

۱-۱-۲-۲-انتقال ویروس BVD

انتقال ویروس BVD هم به صورت افقی و هم عمودی صورت می گیرد. مهم ترین راه انتقال ویروس بلع یا استنشاق مواد آلوده با ترشحات چشم، بزاق، ادرار، مدفوع و شیر دام های آلوده است. برای انتقال عفونت بین حیوانات باید تماس نزدیک باشد(۴). انتشار ویروس BVD بین مزارع مختلف از طریق دام های دارای عفونت پایدار ویا دامی که دارای جنین PI می باشد، روی می دهد. از طرف دیگر در صورت آلودگی دام ها پس از تولد، دام هایی با آلودگی گذرا ایجاد گردیده که به این ترتیب قادر به انتقال عفونت در سطح گله می باشند.شیوع عفونت درگله های گاو بالاست اما بروز بیماری مخاطی بالینی کم است. گاوهای جوان وغیر واکسینه در گله بیشترین حساسیت را دارند(۴۶).

اکثر نشخوارکنندگان اهلی و وحشی دچار عفونت BVD می شوند و به دلیل احتمال انتقال آلودگی از دیگر نشخوارکنندگان، جدا نگه داشتن این حیوانات و گاوهای حساس توصیه شده است. در میان دام های اهلی بعد از گاو گوسفند میزبان ویروس است. انتقال عفونت از گوسفند به گاو گزارش شده است. دامهای دارای عفونت پایدار و موقت[۱] منابع انتشار ویروس در گله می باشند. دام های دارای عفونت پایدار مقادیر زیادی از ویروس را از طریق ترشحات خود دفع می کنند اما دام های دارای عفونت موقت مقادیر کمتری از ویروس را دفع می کنند و مدت زمان انتشار ویروس توسط این دام ها هم محدود است(۵۶).

۱. Transient infectious

انتقال عمودی از طریق جفت صورت می گیرد. در دامهای آبستن ویروس به راحتی از جفت عبور کرده وجنین را آلوده می کند. بر اساس خصوصیات ویروس و مرحله آبستنی که دام در آن قرار دارد عوارض آلودگی متفاوت است. تنها سویه NCP قادر به عبور از جفت و ایجاد عفونت پایدار است. مراتع مشترک و محل های نمایش دام هم سبب انتشار بیماری در بین دام های یک گله و دامداری های مختلف می شوند(۴۶).

۱-۱-۳-روش های تشخیص

وجود عفونت فعال در سطح گله با توجه به علایم بالینی، حضور حیوانات دارای عفونت پایدار و برنامه های نظارتی تشخیص داده می شود. تشخیص عفونت ویروس BVD با استفاده از روش های سرولوژی جهت تعیین میزان آنتی بادی های ضد ویروسی، جداسازی ویروس، ردیابی آنتی ژن های ویروسی و کاوشگرهای DNA[۱] انجام می شود. RT-PCR از روش های مولکولی جهت تعیین عفونت های ناشی از ویروسBVD است . برای ردیابی آنتی ژن ویروسی در نمونه های تثبیت شده در فرمالین می توان از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی[۲]، استفاده کرد. از این روش برای تشخیص آنتی ژن ویروسی در جنین و جفت گاوهایی که دچار عفونت حاد با BVD هستند، نیز استفاده کرد (۲۱, ۵۱).

۱-۱-۳-۱- جداسازی ویروسBVD[۳]

جداسازی ویروس عمده ترین روش آزمایشگاهی تشخیص ویروسBVD می باشد. این روش در تشخیص حیوان PI به عنوان یک تست مرجع کاربرد دارد. بیشتر ویروس های جدا شده از نوعNCP می باشند. برای شناسایی ویروس در محیط کشت می توان از رنگ آمیزی

۱.DNA probe
۲.Immunohistochemistry
۳.Virus isolation

ایمونوفلورسانس[۱] و ایمونوپراکسیداز[۲] استفاده کرد. بهترین نمونه جهت جداسازس ویروسBVD سلول های تک هسته ایی خون جداری می باشد(۲۱, ۵۱).

۱-۱-۳-۲- روش های تشخیص اسید نوکلئیک

روش های مختلفی برای شناسایی RNA ویروس BVD وجود دارد. عدم تداخل با آنتی بادی های خنثی کننده و حساسیت و ویژگی بالا از مزایای روش های تشخیص اسید نوکئیک است. تشخیص RNA به وسیله روش RT-PCR انجام می شود. روش های تشخیص بر پایه اسید نوکلئیک شامل دو دسته می باشد که عبارتند از استفاده از جستجوگرهای هیبریداسیون اسید نوکلئیک و تشخیص به کمک روش RT-PCR (۲۱, ۵۱).

۱-۱-۳-۳- تشخیص آنتی ژن ویروس BVD

این روش ها بر تشخیص آنتی ژن در نمونه ها استوار است. با استفاده از این روش ها می توان دام های آلوده غیر PI را از دام های PI تفریق کرد. ایمونوهیستوشیمی از روش های تعیین وجود آنتی ژن ویروس است که در مقاطع بافتی کاربرد دارد. استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال[۳] یکی دیگر از روش های تشخیص آنتی ژن ویروس در بافت های تثبیت شده در فرمالین است و هم چنین در تشخیص به روش الایزا بکار می رود. فلوسیتومتری[۴] هم از روش های تعیین حضور آنتی ژن در نمونه های بافتی است. روش الایزا بر پایه تسخیر آنتی ژن یکی دیگر از روش های تشخیص آنتی ژن است (۲۱).

۱-۱-۳-۴- روش های سرولوژی

روش های سرولوژی بر تعیین حضور آنتی بادی های خنثی کننده استوار است. در گله های غیر واکسینه با استفاده از آزمایشات سرولوژیک می توان به حضور بیماری پی برد. تست هایی

۱. Immunofluorescence
۲.Immonoperoxidase
۳.Monoclonal antibody
٤.Flocytometery