

اولین بررسی بالینی وضعیت آلودگی به ویروس کمبود ایمنی گاو و یافته‌های پاتولوژیک، هماپاتولوژیک و فلوسایتومتریک در گاوهای هلشتاین ایران

نتقی تقی پور بازگانی^۱ محمد طلوعی^{۲*} غلامرضا نیکبخت بروجنی^۳ محمد جواد قره‌گوزلو^۴ سعید بکائی^۵ محمود خرمالی^۳ ندا برجسته^۳

۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران.

۲) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز- ایران.

۳) گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران.

۴) گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران.

۵) بخش اپیدمیولوژی گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

(دریافت مقاله: ۷ مهر ماه ۱۳۸۶، پذیرش نهایی: ۲۹ خرداد ماه ۱۳۸۷)

چکیده

ویروس کمبود ایمنی گاو، لنتی ویروسی هست که با ایجاد عوارض عفونی متنوع، می‌تواند خسارات زیادی به صنعت گاو داری وارد نماید. با توجه به احتمال پراکندگی جهانی عفونت با این ویروس، این مطالعه برای اولین بار در ایران با هدف تعیین میزان آلودگی به آن در گاوهای هلشتاین و بررسی سایر اختلالات همراه، انجام گرفت. در این مطالعه، ۱۶/۲ درصد از ۱۹۷ راس گاو هلشتاین ذبح شده در کشتارگاه صنعتی میثم تهران با بکارگیری روش Nested-PCR، آلوده به ویروس BIV تشخیص داده شدند. سکانسینگ قطعات ژنومی تکثیر یافته با پرایمرهای ژن gag ویروس، مشخص نمود که بین توالی‌های نوکلئوتیدی این ویروس و سویه‌های فرانس، تشابه ۹۸/۹-۹۸/۷ درصدی وجود دارد. میزان آلودگی در گاوهای مبتلا به بزرگشده همال نودها، نسبت به گاوهای فاقد این ضایعات، بیشتر بود ($p < 0/05$). بین میزان آلودگی و سن، جنس، BCS، اختلالات بالینی، آسیب‌های درشت بینی، بزرگی عقده‌های لمفاوی و موقعیت آناتومیک حضور همال نودهای گاوها، رابطه آماری معنی داری مشاهده نشد. آنالیز فلوسایتومتریک معلوم ساخت که درصد سلول‌های CD8+ در گاوهای آلوده در مقایسه با غیر آلوده، کاهش معنی داری ($p < 0/05$) دارد. اختلاف معنی داری بین شمارش کل گلبول‌های سفید، درصد هماتوکریت، نوتروفیل، لمفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل، سلول‌های CD4+ و CD21+ و میزان هموگلوبین مابین دودسته از گاوهای آلوده و غیر آلوده مشاهده نشد. هیپرپلازی-هیپرتروفی و در برخی موارد تخلیه لمفونیدی فولیکول‌های لمفاوی، از یافته‌های آسیب‌شناسی عقده‌های لمفاوی و همال نودهای گاوهای آلوده بودند. بررسی حاضر نشان داد که گاوهای هلشتاین مورد مطالعه واجد آلودگی نسبتاً بالایی با ویروس BIV بودند.

واژه‌های کلیدی: ویروس کمبود ایمنی گاو، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از نوع نسته، سکانسینگ، خون‌شناسی، فلوسایتومتري.

مقدمه

ویروس کمبود ایمنی گاو (BIV)، از زیر خانواده لنتی ویروس‌ها بوده و از ژنوم RNA تک رشته‌ای، غشاء، کپسید، نوکلئوکپسید، ترانس کریپتاز معکوس و اینترگاز تشکیل شده است. ویروس‌های کمبود ایمنی انسان (HIV-1,2)، میمون (SIV)، گربه (FIV)، ویروس مدی-ویژنا، آرتریت-آنسفالیت بزها (CAEV)، کم‌خونی عفونی اسب (EIA) و ویروس بیماری جمبرانا گاو (JDV) از دیگر لنتی ویروس‌های مهم پستانداران می‌باشند (۱، ۱۸). ویروس کمبود ایمنی گاو اولین بار در سال ۱۹۶۹ توسط وان در مااتن Van Der Maaten در لوئیزیانای آمریکا از لکوسیت‌های خون یک گاو هلشتاین مبتلا به لمفوسیتوز، لمفوآدنوپاتی، لاغری و نروپاتی، جداسازی و در سال ۱۹۷۲ تحت عنوان سویه BIV-R29 گزارش گردید (۲۷). مطالعه این ویروس تا حوالی سال‌های ۱۹۸۰ که مصادف با شناسایی ویروس HIV بود، معلق ماند ولی از این زمان به بعد مجدداً مطالعات بیشتری روی آن انجام شد (۲۲، ۲۳). ویروس کمبود ایمنی گاو از لحاظ ساختاری، آنتی ژنیکی و ژنتیکی مشابه تیپ یک ویروس کمبود ایمنی انسان بوده (۶، ۲۷) و تاکنون تنها دو جدایه از آن تحت عناوین BIVR29 یا جدایه مرجع و قدیمی (۲۷) و BIV FL112 یا جدایه جدید (۲۵) شناخته شده‌اند. این ویروس

در بدن به طیف وسیعی از سلول‌های ایمنی از جمله لمفوسیت‌های T، B، مونوسیت‌ها و ماکروفاژها گرایش دارد (۲۹) البته هنوز گیرنده‌های سلولی درگیر در آلودگی به این ویروس کاملاً شناخته نشده‌اند در حالی که HIV عمدتاً سلول‌هایی را که در سطح خود، واجد گیرنده CD4+ هستند، آلوده می‌کند (۲۸). احتمالاً آلودگی با ویروس کمبود ایمنی گاو، توزیع جهانی و غیر یکنواختی دارد (۷، ۲۰، ۲۲). ممکن است در گله‌های شیری که فراوانی تعداد دام‌های نامقرون به صرفه در آن‌ها بالاست، میزان آلودگی حتی تا بالای ۶۰ درصد نیز برسد (۲۰، ۲۲). به جز نژادهای اصیل شیری بویژه هلشتاین، نژادهای بومی و حتی گاو میش هانیزیه میزان نسبتاً بالایی آلودگی را نشان داده‌اند (۳، ۱۱، ۱۳). آلودگی با این ویروس می‌تواند با عفونت‌های ویروسی دیگر نیز که مهمترین آن‌ها ویروس لوکوز می‌باشد، توأم شود (۱۱، ۱۴، ۲۳، ۲۶). در انتقال طبیعی ویروس کمبود ایمنی گاو هر دو روش افقی و بویژه عمودی از طریق شیر مادران آلوده و یا داخل رحمی از طریق جفت مورد توجه قرار گرفته است (۵، ۱۴). این ویروس قویاً وابسته به سلول بوده و لذا ممکن است از طریق خون، آغوز، شیر و سایر مایعات آلوده بدن مثل منی که حاوی سلول‌های لمفوپرولیفراتیو هستند منتقل شود (۲۰) تاکنون آلودگی گاوهای ماده با ویروس از طریق منی‌های آلوده در حین جفت‌گیری،



این‌که تاکنون در ایران هیچ بررسی در خصوص وضعیت آلودگی با این ویروس انجام نگرفته بود، این مطالعه برای اولین بار در ایران در یکی از کشتارگاه‌های استان تهران با هدف تعیین میزان شیوع آلودگی به ویروس کمبود ایمنی گاودر گاوهای هلشتاین به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مرز از نوع ناستد و بررسی اختلالات بالینی، آسیب‌های درشت بینی و ریز بینی، تغییرات شاخص‌های مختلف خونی و فلوسایتومتری (فراوانی نسبی برخی زیر گروه‌های لمفوسیت‌های T و B) همراه در گاوهای آلوده انجام گردید.

مواد و روش کار

الف- دام‌های مورد مطالعه، جمع آوری اطلاعات و نمونه‌گیری: حداقل تعداد نمونه بر اساس سطح اطمینان ۹۵ درصد و متوسط میزان شیوع در منابع بررسی شده (۳۰ درصد) و دقت (حد اشتباه) ۶ درصد، ۱۸۰ نمونه تعیین گردید. نمونه‌های خونی مورد نیاز، در فاصله زمانی اوایل پاییز تا اواخر زمستان ۱۳۸۴، از ورید و داج ۱۹۷ گاو هلشتاین کشتار شده در کشتارگاه میثم تهران ۵ گروه سنی واجد صفراوی ۴ زوج دندان بالغ بصورت تصادفی مطبق و به تعداد تقریباً مساوی در هر گروه در لوله‌های حاوی EDTA ۱۰ درصد تهیه شد. برای هر دام، سرنگ و سوزن نو استفاده می‌شد. سن، جنس، درجه وضعیت بدنی (BCS)، وضعیت عقده‌های لمفاوی و همال نودها و حضور سایر اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت بینی در دام‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. در شرایط برخورد با تغییرات عقده‌های لمفاوی و همال نودها، ضمن ثبت آن‌ها، در صورت نیاز برای مطالعه ریز بینی نمونه برداری و نمونه با فرمالین ۱۰ درصد فیکس می‌شد.

ب- خون شناسی: شمارش تعداد کل گلبول‌های سفید با بهره‌گیری از لام توما، شمارش تفکیکی آن‌ها با تهیه گسترش خون و رنگ آمیزی آن با گیمسا، اندازه‌گیری هموگلوبین با افزودن درابکین به خون و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری Jenway مدل 6100 و تعیین درصد هماتوکریت با بهره‌گیری از لوله‌های موئین و دستگاه قرائت کننده میکرو هماتوکریت مدل Hawksley روش استاندارد سنجیده می‌شد.

پ- ریز بینی: نمونه‌های فیکس شده پس از آنگیری، شفاف سازی و الکل‌گیری، با پارافین آغشته و قالب‌گیری شده (روش پارافین) و با دستگاه میکروتوم برش داده شدند. پس از زودن مواد اضافه و آنگیری و شفاف سازی مجدد، لام‌ها به روش هماتوکسیلین و انوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مورد مشاهده قرار می‌گرفتند.

ت- پادتن‌های منوکلونال و فلوسایتومتری: پانلی از پادتن‌های منوکلونال کونژوگه موشی شامل: MCA1653F (ضدگیرنده CD4 گاو)، MCA837F (ضدگیرنده CD8 گاو)، MCA1424F (ضدگیرنده CD21 گاو) و دو نوع پادتن منوکلونال کونژوگه (-CD21 CO و -CD4,8 CO) به عنوان پادتن‌های کنترل منفی، همگی تهیه شده از شرکت Serotec انگلستان، استفاده شدند. لیز گلبول‌های قرمز، آماده سازی نمونه‌ها و رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت سلول‌ها با استفاده از کیت تهیه شده از شرکت Cytomation

مشخص نشده است (۵). در شرایط تجربی علاوه بر گاو و گوساله، دام‌های دیگری نظیر گوسفند، بز، و خرگوش نیز به این ویروس آلوده شده اندولی آلودگی طبیعی آن‌ها به جز در گاو دیده نشده است (۲۸). تاکنون مدرکی دال بر انتقال ویروس کمبود ایمنی گاو به انسان وجود ندارد (۱،۵،۲۰) با توجه به شباهت‌های BIV با HIV، فرض این موضوع که این ویروس نیز بایستی در گاو اثرات آسیب زائی مشابهی داشته و سلامتی آن‌ها را بصورت مزمن، به خطر اندازد، توجیه پذیر می‌باشد (۲۰۶) اما احتمالاً به علت عمر اقتصادی پائین گاو و دوره کمون بالای ویروس، سندرم‌های بالینی و اثرات آسیب زائی ایجاد شده توسط این ویروس در گاو شناخته نمی‌شوند (۲۰،۲۰). شکل‌گیری سنسیتیوم، ضایعات سیستم لمفوئیدی (۲۱،۲۳)، سیستم اعصاب مرکزی (۱،۲۲) و عفونت‌های ثانویه (۲۰،۲۱،۲۲،۲۳) نکات شناخته شده مرتبط با آسیب زائی ویروس کمبود ایمنی گاو هستند. همانند اثرات تضعیف ایمنی سایر لنتی ویروس‌ها، آلودگی با این ویروس نیز با اختلالات ایمنولوژیک از جمله کاهش سلول‌های TCD4+ (۲،۲۲) تضعیف عملکرد ماکروفاژ (۱۱)، مونوسیت، نوتروفیل، لمفوسیت (۶) و تضعیف پاسخ‌های ایمنی هومورال (۶،۱۱) همراه بوده است، ولی برخلاف این ویروس‌ها، هنوز ارتباط پایدار و قابل توجهی بین آلودگی به ویروس کمبود ایمنی گاو و ایجاد بیماری بالینی اختصاصی در آن مستند نشده است (۲۰) با این حال این ویروس در برخی آلودگی‌های تجربی گوساله‌ها، فاقد اثرات تضعیف‌کنندگی ایمنی بوده یا اثرات ملایم و موقتی از خو به جا می‌گذاشت (۶،۲). لاغری (۱۱،۱۹،۲۲،۲۳)، کاهش تولید شیر (۱۱،۲۱،۲۶)، بزرگی همال نودها، لمفادنوپاتی، نشانه‌های عصبی، لنگش، آتاکسی، پاراپلزی و طیف وسیعی از بیماری‌های ثانویه از نشانه‌های گزارش شده آلودگی هستند (۱،۲۱،۲۲،۲۳). هیپرپلازی فولیکولار و تخلیه لمفوئیدی در نسوج لمفاوی (۲۰،۲۳،۲۷) و همچنین منگوا نسفالیت غیر چرکی (۱۹،۲۲،۲۶) از مهمترین تغییرات آسیب شناسی در آلودگی با این ویروس می‌باشند (۱۶،۲۸). در آلودگی انسان، گربه و میمون با ویروس‌های کمبود ایمنی مربوطه نیز تغییرات مشابهی گزارش شده است (۲۱،۲۳،۲۸). کشت و جداسازی ویروس، روش‌های سرولوژیک یا مولکولی برای تشخیص آلودگی به این ویروس استفاده شده است (۱۸) با خاطر مشکل بودن تشخیص دام‌های آلوده از طریق جداسازی ویروس و محدودیت‌های روش‌های سرولوژیک از جمله عدم شناسائی آنتی بادی در مراحل اولیه یا مزمن آلودگی، عمدتاً به طور موفقیت آمیزی اقدام به شناسایی DNA پروویروسی بروش واکنش زنجیره‌ای پلی مرز به ویژه نوع ناستد، در لکوسیت‌های خونی، نسوج لمفاوی یا عصبی نموده‌اند (۱۵،۱۸،۲۲) و بنظر می‌رسد که این روش، قابل اعتمادترین و حساس ترین روش در تشخیص این ویروس باشد (۵،۸). درمان مؤثری برای این آلودگی وجود ندارد. در گله‌های آلوده که نشانه‌های بالینی را بیشتر نشان می‌دهند، کمبودهای تغذیه‌ای و ضعف در مدیریت پرورش، بیشتر بوده و با سامان بخشیدن به این کمبودها، نشانه‌های بالینی کاهش یافته یا به تأخیر می‌افتند (۱).

با توجه به احتمال پراکندگی جهانی عفونت با این ویروس و مشخص نبودن کامل اختلالات بالینی و آزمایشگاهی همراه در گاوهای آلوده و همچنین نظر به



جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی و موقعیت پرایمرهایی مورد استفاده در آمپلیفیکاسیون قطعه ژن gag ویروس کمبود ایمنی گاو.

اندازه محصول (جفت باز bp)	توالی اولیگونوکلئوتید	موقعیت در ژنوم ویروس	ژن	پرایمر	مرحله واکنش
۷۴۰	5' - AGGCCAGAGCTGATAAGGAA - 3'	۶۷۳-۶۵۳	gag	Gag F	PCR دور اول
	5' - ATCCCACTACCCCTACATGCT - 3'	۱۳۹۳-۱۳۷۳	gag	Gag R	
۳۹۲	5' - AGATCTGGTCAGACGCCA - 3'	۸۳۹-۸۲۱	gag	Gag 3	PCR دور دوم
	5' - CCAAGGAGCCGTACACAG - 3'	۱۲۱۳-۱۱۹۹	gag	Gag 4	

پروویروسی BIV در ژنوم سلول های تک هسته ای گاوهای مورد مطالعه، با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی، از روش نستد PCR استفاده شد. در این روش، برای شناسایی یک قطعه DNA ۳۹۲ جفت بازی از سکنس ویروس مذکور مطابق با نوکلئوتید ۱۲۱۳-۸۲۱ ژن gag، آمپلیفیکاسیون دو مرحله ای انجام گرفت. در هر سری از واکنش ها، حداقل یک نمونه کنترل منفی بدون DNA و یک نمونه DNA پلاسمید GAG (PBIV300) حاوی سکنس های کامل DNA پروویروسی BIV (که از کشور کانادا - اتاوا از Susan Nadin-Davis دریافت گردید)، به عنوان کنترل مثبت استفاده می شد. حجم مخلوط نهائی هر واکنش به ۵۰ میکرولیتر می رسید. مواد مورد استفاده و حجم هر کدام از آن ها برای بدست آوردن مخلوط نهائی عبارت بودند از: ۱۰۰ نانوگرم (۲ میکرولیتر) DNA ژنومی سلول ها (در واکنش مرحله دوم PCR، به جای نمونه DNA، یک میکرولیتر از مخلوط PCR مرحله اول استفاده می شد)، ۳۸/۵ میکرولیتر آب (در واکنش مرحله دوم، ۳۹/۵ میکرولیتر)، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰x (حاوی Tris-HCl ۲۰ mM با pH=8، ۲ mM ۵۰ MgCl₂، ۱/۵ میکرولیتر Triton X100، ۰/۱ درصد)، ۲ میکرولیتر dNTPs ۱/۲۵ مولار حاوی ۵ میلی مول از هر dNTP، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر و ۰/۲ میکرولیتر (حاوی ۵ واحد در هر میکرولیتر) Taq پلی مراز. چرخه های حرارتی با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر Techne مدل 512 Tc، به ترتیب زیر انجام گرفت: پس از مرحله واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، مراحل کامل آمپلیفیکاسیون برای ۳۴ سیکل تکرار شدند، بدینصورت که در تمام سیکل ها، مرحله اول (واسرشت سازی) و سوم (ساخت رشته مکمل هدف) به ترتیب در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه انجام شده و سپس مرحله نهایی ساخت رشته مکمل با ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد دنبال شدند با این تفاوت که مرحله دوم (چسبیدن پرایمرها به هدف)، در هر سیکل به مدت ۱ دقیقه، در دو سیکل ابتدایی در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، در دو سیکل بعدی در ۵۷/۵ درجه سانتیگراد و در سی سیکل آخر در ۵۵ درجه سانتیگراد انجام گرفت. بدین شکل مرحله اول PCR در ۳۴ سیکل تمام شده و سپس محصول واکنش PCR مرحله اول، آماده سازی و رقیق تر شده و آمپلیفیکاسیون مرحله دوم روی آن، در همان شرایط انجام می شد.

ح- شناسایی محصول PCR: محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز و جداسازی روی ژل آگارز ۱ درصد، با بکارگیری یک دستگاه ترانس لومیناتور UV، و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، سپس تصویربرداری مورد

Daco امریکا، انجام گردید. پس از بدست آوردن سلول های سفید نشاندار شده با پادتن های منوکلونال کوئژوگه، با اضافه نمودن محلول فیکساتور (PBS) و پارافمالدئید به نسبت ۱:۶۰، سلول ها ثابت شده و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری Becton Dickinson با تکنیک FACS و با کمک نرم افزار آنالیز فلوسایتومتری WinMDI، لمفوسیت های هدف شناسائی و شمارش می شدند. در نرم افزار مذکور، فراوانی نسبی و مطلق این یاخته، در شمارش ۱۰۰۰۰ سلول لکوسیتی از طریق رسم یک هیستوگرام تک پارامتری که شدت فلورسانس را در محور X و تعداد شمارش را در محور Y نشان می داد محاسبه می شد.

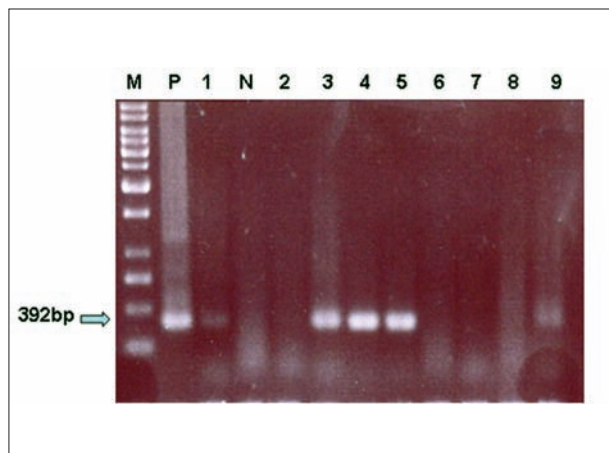
ث- آماده سازی و استخراج DNA: گلبول های قرمز نمونه ها با استفاده از محلول بافر A (لیزکننده گلبول های قرمز حاوی Tris-HCl، MgCl₂، Triton x 100، NaCl) و سلول های سفید توسط محلول بافر B (لیزکننده گلبول های سفید حاوی Tris-HCl، NaCl، EDTA نیم مول، SDS ۱۰ درصد) لیز شده و با اضافه نمودن محلول گوانیدیموم 5M و سپس محلول استات پتاسیم و در نهایت سانتریفوژ نمودن کل مجموعه با ۱۴۰۰۰ rpm DNA سلولی در مایع روئی آزاد می شد. بدنبال اضافه نمودن ۰/۷ حجم محلول ایزوپروپانول سرد به مایع روئی و سانتریفوژ آن، DNA در ته میکروتیوب رسوب کرده و با محلول اتانول شستشو شده و با سانتریفوژ و دور ریختن محلول روئی اتانول، پلیت DNA در هوای تمیز خشک شده و با اضافه نمودن محلول TE روی آن، DNA بدست آمده جهت استفاده PCR آماده بوده و به فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد منتقل می شد. به منظور تأیید صحت مرحله استخراج DNA، این نمونه ها با استفاده از پرایمرهای ژن (GAPDH)، PCR شده و نتیجه روی ژل برده شدند تا از حضور این ژن در پرو فایل به عنوان معیار صحت استخراج DNA استفاده شود. ردیف اولیگونوکلئوتیدی پرایمرهای ژن GAPDH شامل: 5'-(TGGCAAAGTGGACATCGTTCG-3' و 3'-(TTGCGTGGACAGTGGTCATAAGTC-5' بودند.

ج- پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی: برای ردیابی حضور DNA پروویروسی BIV، پرایمرهای ژن gag ویروس، انتخاب شدند (جدول ۱).

این پرایمرها مطابق با سکنس BIV سویه 1. NC-001413 که در بانک ژنی سایت PubMed بنام سویه فرانس معرفی شده بودند (۴) و با کمک نرم افزار 5. Fast PCR، طراحی شدند. تمامی پرایمرهای استفاده شده از شرکت Prime ایتالیا تهیه شدند.

چ- آمپلیفیکاسیون DNA پروویروسی: به منظور شناسایی DNA





تصویر ۱- ژل آگارز مربوط به الکتروفورز تعدادی از محصولات PCR آمپلیفای شده با پرایمرهای ژن gag ویروس BIV که با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و با اشعه ماوراء بنفش تصویر برداری شده اند: نمونه های مثبت با حضور باند ۳۹۲ جفت بازی مشخص شده اند (خط ۱، ۳-۵ و ۹). خط M مارکر یک کیلو بازی، خط P و N به ترتیب نمونه های کنترل مثبت و منفی را نشان می دهند.

شد (جدول ۲). تصویر رنگ آمیزی شده ژل آگارز چند نمونه از محصولات PCR آمپلیفای شده در تصویر ۱ آمده است.

ب- تعیین توالی (سکانسینگ): نتایج سکانسینگ قطعات بدست آمده از آمپلیفیکاسیون پروویروس BIV در سه نمونه از گاوهای آلوده مورد مطالعه و ردیف بندی و مقایسه آن ها (Alignment) در تصویر ۲ آمده است. تیترا سرمی آنتی بادیهای ضد آنفلوآنزای مرغی تحت تیپ H₉N₂ در نمونه های سرم اخذ شده از گروه های جمعیت انسانی شامل بیماران با عوارض تنفسی بستری در بیمارستان، بیماران بدون عوارض تنفسی بستری در بیمارستان، مرغداران و کارگران مرغداری ها و کارورزان و افراد مرتبط با حرفه دامپزشکی توسط آزمایش HI سنجیده شد. در این تحقیق نمونه های دارای تیتر HI بالاتر از ۱/۸ به عنوان نمونه های مثبت در نظر گرفته شدند. نتایج حاصله در جدول ۱، ۲، ۳، ۴ نشان داده شده است. تیترا سرمی آنتی بادی های ضد آنفلوآنزای تیپ A در نمونه های سرم اخذ شده از گروه های مختلف جمعیت انسانی شامل بیماران بستری در بیمارستان (با عوارض و بدون عوارض تنفسی)، مرغداران و کارگران مرغداری ها، کارورزان و افراد مرتبط با حرفه دامپزشکی توسط آزمایش ایزاسنجیده شد، نتایج حاصل در جدول ۴ نشان داده شده است.

پ- ارتباط بین شاخص های بالینی با میزان آلودگی: توزیع فراوانی آلودگی به BIV در گروه های سنی، جنسی و درجات مختلف وضعیت بدنی دام ها در جدول ۳، فراوانی آلودگی در ارتباط با حضور اختلالات بالینی یا آسیب های درشت بینی در جدول ۴ و فراوانی آلودگی در ارتباط با بزرگ شدگی همال نودها، عقده های لمفاوی و ناحیه آنا تومیک همال نودها در جدول ۵، آمده اند.

مال نودهای بزرگ شده، عمدتاً در چربی های اطراف عقده های لمفاوی پیش کتفی (تصویر ۴)، در زیر عضلات سطحی، یا در زیر پوست و سطح

جدول ۲- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به ویروس کمبود ایمنی گاو بر اساس نتایج حاصل از آزمون Nested-PCR.

آلودگی به ویروس BIV	فراوانی	درصد
دارد	۳۲	۱۶/۲
ندارد	۱۶۵	۸۳/۸
جمع	۱۹۷	۱۰۰

ارزیابی قرار گرفتند.

خ- خالص سازی و تعیین توالی (سکانسینگ) محصول PCR: سه نمونه از محصولات PCR بدست آمده از افزوده سازی (آمپلیفیکاسیون) پروویروس BIV مطابق با نوکلئوتید ۱۲۱۳-۸۲۱، با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR، Gibco BRL، خالص سازی و از نمک ها و بافرهای موجود در واکنش PCR، جدا گردیدند. قطعات با استفاده از کیت PCR-Cloning، شرکت Qiagen آلمان، کلون شده و سپس با دستگاه سکانسینگ اتوماتیک ABI3730XL (شرکت Macrogen کره) در امتداد پرایمر M13F، تعیین توالی یا سکانسینگ شدند. کلون ها پس از سکانسینگ، با استفاده از روش Clustal که در نرم افزار DNASTAR قابل دسترس هست، با گزارشات ویروس BIV موجود در بانک ژنی سایت PubMed از جمله سویه ۱. NC-001413 یا ۱. M32690 که بنام سویه رفرانس BIV R2۹ معرفی شده (۴) و همچنین سویه ۱. BIVL04974 (۱۷)، مقایسه و ردیف بندی (Alignment) شدند. تعیین توالی محصول PCR توسط شرکت Macrogen واقع در کره- سئول انجام شد.

د- بررسی آماری: بررسی آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 11 و بکارگیری آزمون های فیشر، مک نمار و محاسبه آماری کاپا برای مقایسه نتایج آزمون PCR با بزرگ شدگی همال نودها، مربع کای با سطح اطمینان ۹۵ درصد برای سنجش ارتباط بین متغیرهای سن، حضور اختلال بالینی یا آسیب های درشت بینی، درجه وضعیت بدنی و جنس با نتایج آلودگی و آزمون t نمونه های مستقل، برای ارزیابی ارتباط بین شاخص های هماتولوژیک و فلوسایتومتریک با نتیجه آلودگی، انجام شد. با آزمون کولموگرو- اسمیرنواز نرمال بودن توزیع داده ها، اطمینان حاصل می شد و در صورت پیروی نکردن داده ها از توزیع نرمال، با مانیپولاسیون آن ها مثل اخذ لگاریتم، توزیع آن ها نرمال می شد.

نتایج

الف- میزان آلودگی: نتایج واکنش زنجیره ای پلی مرز از نوع نسترده روی DNA های استخراج شده از سلول های تک هسته ای خون محیطی ۱۹۷ راس گاو مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای ژن gag ویروس نشان دادند که در PCR دور اول، هیچ باند آشکاری بدست نیامد ولی در PCR دور دوم، در ۳۲ مورد از نمونه ها، قطعات ۳۹۲ bp دیده شدند، لذا میزان آلودگی با این آزمون یا موارد واجد DNA پروویروسی BIV، برابر ۱۶/۲ درصد برآورد



جدول ۳- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به ویروس کمبود ایمنی بر اساس نتایج آزمون تست PCR در گروه‌های سنی، جنسی و درجات مختلف وضعیت بدنی گاوهای مورد مطالعه و آنالیز آماری آن‌ها. *گاوهای مورد مطالعه از لحاظ درجه وضعیت بدنی (Body Condition Score = BCS) در سه گروه لاغر (1-2 = BCS)، متوسط (3-5 = BCS) و چاق (4-5 = BCS) تقسیم شدند (۱۶).

جنس		درجه وضعیت بدنی			سن			
فراوانی مطلق و نسبی دام‌های آلوده	جمع نمونه	جنس	فراوانی مطلق و نسبی دام‌های آلوده	جمع نمونه	BCS*	فراوانی مطلق و نسبی دام‌های آلوده	جمع نمونه	زوج دندان بالغ
۵ (۱۱/۱ درصد)	۴۵	نر	۳ (۱۲/۵ درصد)	۲۴	۱-۲	۲۱ (۱۳/۵)	۲۸	۰
							۳۶	۱
۲۷ (۱۷/۸)	۱۵۲	ماده	۲۰ (۱۶/۱)	۱۲۴	۲/۵-۳/۵	۲۱ (۱۳/۵)	۴۰	۲
							۴۲	۳
۳۲ (۱۶/۲)	۱۹۷	جمع	۳۲ (۱۶/۲)	۴۹	۴-۵	۳۲ (۱۶/۲)	۴۱	۴
							۱۹۷	جمع
p>۰/۰۵			p>۰/۰۵				p>۰/۰۵	

(N=821)

R29_REFSEQ **AGATCTGGTCCAGCGCCCACTGAAAGAAATGGGGTTGACCTTCATGCAGTGAATATATTAGGGGTCATTACAGCAAACCTAGTACAGGAAAGAAATTAACCT**

R29AA.....

FS1AA.....

FS2AA.....

FS3AA.....

R29_REFSEQ **CCT-CTTGAAATAGTACACC-CAAGTGGAGATTAGATGTACAACTTATAGAAATCAAAAGTAAAGAGAGAAAGAAAATGCCCAACAGAACTGGAAACAGCATC**

R29A.....

FS1A.....

FS2A.....

FS3A.....

R29_REFSEQ **ATCCAGAAAGCCCCAAAACAGATGAAATCATCGGTAAAGGGCTTAGTTCTGCTGAACAAGCCACCCTGATCTCAGTAGAAATGCAGAGAAACTTTCAAGACA**

R29G.....

FS1G.....

FS2G.....

FS3G.....

(N= 1213)

R29_REFSEQ **GTGGGTGCTGCAGGCAGCTATGGAGGTGGCAGGGCAAAACATGCTACC--CCAGGTCCCATCAACATTCATCAGGGACCCAGGGAGCCGTCACAG**

R29--.....

FS1--.....

FS2--.....

FS3--.....

تصویر ۲- توالی نوکلئوتیدی قطعات آمپلیفای شده ۳۹۲ جفت بازی ژن gag ویروس BIV بدست آمده از سه نمونه گاو آلوده و ردیف بندی و مقایسه آن‌ها (Alignment) با توالی نوکلئوتیدی سویه‌های گزارش شده R29 BIV. (توالی نوکلئوتیدی در موقعیت ۱۲۱۳-۸۲۱ نشان داده شده و پرایمرها بصورت ایتالیک و رنگی مشخص شده‌اند).

جدول ۴- توزیع فراوانی نسبی و مطلق آلودگی به ویروس کمبود ایمنی بر اساس نتایج آزمون تست PCR در گاوهای کشتاری در ارتباط با حضور اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت بینی و آنالیز آماری آن‌ها. * ورم پستان، متریت، اختلالات گوارشی مثل چسبندگی، اسهال، عوارض کبدی، ربوی، از پافتادگی و لنگش از اختلالات مشاهده شده، بودند.

جمع کل	ندارد	دارد	اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت بینی * وضعیت آلودگی
۳۲ (۱۶/۲ درصد)	۲۳ (۱۴/۴ درصد)	۹ (۲۴/۳ درصد)	دارد
۱۶۵ (۸۳/۸)	۱۳۷ (۸۵/۶)	۲۸ (۷۵/۷)	ندارد
۱۹۷ (۱۰۰)	۱۶۰ (۱۰۰)	۳۷ (۱۰۰)	جمع کل
p>۰/۰۵			

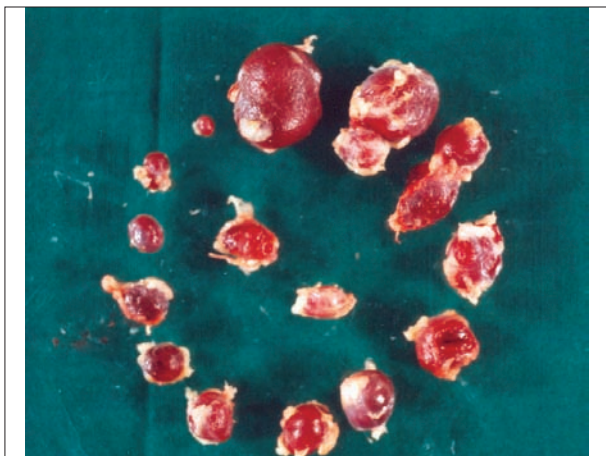


تصویر ۳- بزرگ‌شدگی همال نوده‌های ناحیه گردنی را در یک گاو آلوده BIV نشان می‌دهد.

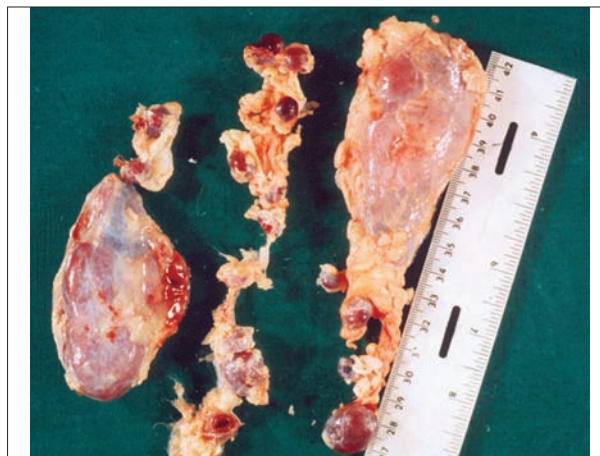
نودها در گاوهای مختلف بصورت توده‌های کروی یا بیضی شکل با قوام سفت و به رنگ قرمز تیره تا سیاه به اندازه‌های متفاوت از قطر ۱ تا ۲ سانتیمتر و به تعداد متغیر از یک تا بیش از ۵۰ عدد، بصورت پراکنده یا در یک ردیف خطی و

عضلات این ناحیه و در برخی موارد در زیر پوست ناحیه تهیگاهی و تنه یا اطراف عقده‌های لمفاوی پیش رانی و فوق پستانی مشاهده می‌شدند. این همال





تصویر ۵- همال نودهای موجود در چربی های اطراف عقده لمفاوی پیش کتفی یک گاو آلوده به BIV که از این چربی ها جداسازی شده اند.



تصویر ۴- ردیفی از همال نودها که در چربی های اطراف عقده های لمفی پیش کتفی یک گاو آلوده به BIV آشکار شده اند.

مورد (۱۶/۷ درصد) راکتیو و مبتلا به لمفادنیت و بقیه (۳ مورد) طبیعی. همچنین یافته های ریزبینی در همال نودهای همان گاوهای آلوده شامل موارد زیر بودند: ۲ مورد (۳۳/۳ درصد) واجد هیپرپلازی و هیپرتروفی فولیکول های لمفاوی (تصویر ۶)، ۳ مورد (۵۰ درصد) مبتلا به تخلیه لمفوئیدی فولیکول های لمفاوی (تصویر ۷) و ۱ مورد (۱۶/۷ درصد) طبیعی.

بحث

ویروس کمبود ایمنی گاو لنتی ویروسی هست که با توجه به توانایی آن در ایجاد خسارات اقتصادی به صنعت گاو داری بایستی در صنعت پرورش گاو، از مسائل مهم تلقی شده و لذا توجه متناسب رامی طلبد. کنترل آلودگی این ویروس بستگی به فهم چگونگی انتقال و توانایی شناسایی حضور آن ها در گاو ها دارد (۸).

نتایج این بررسی، نشان داد که آلودگی با ویروس کمبود ایمنی گاو در جمعیت گاوی مورد این مطالعه ۱۶/۲ درصد می باشد. بیشترین میزان

در موارد کمی بصورت خوشه ای و مترکم دیده می شدند (تصویر ۵).

ت- ارزیابی شاخص های هماتولوژیک و فلوسایتومتریک: نتایج بررسی هماتولوژیک، فلوسایتومتریک و نتایج آنالیز آماری آن ها در ۱۹۷ راس گاو مورد مطالعه (جمعیت شماره ۱۰) در جدول ۶، آمده است. البته با حذف گاوهای واجد اختلالات بالینی یا آسیب های درشت بینی، به علت احتمال تغییر مقادیر طبیعی فاکتورهای خونی در آن ها و همچنین گاوهای واجد لکوسیتوزیس توام با نوتروفیلی به عنوان دام های استرس دار (۱۶) از کل جمعیت، شاخص های مذکور در جمعیت ۱۴۳ راسی باقی مانده (جمعیت شماره ۲)، مجدداً مورد مطالعه قرار گرفتند (جدول ۷).

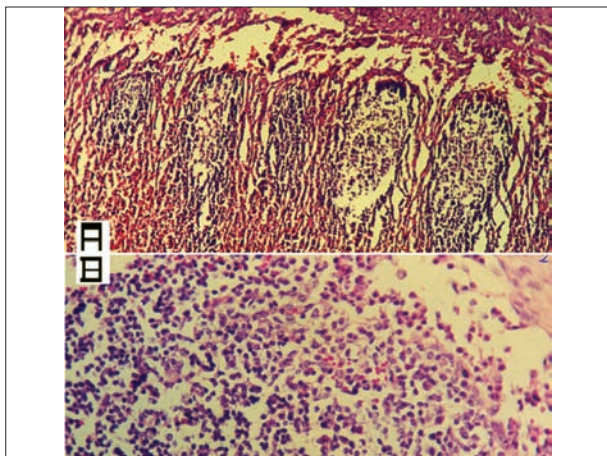
ث- نتایج هیستوپاتولوژی: در بازرسی پس از کشتار، به منظور بررسی هیستوپاتولوژی، ۴۳ راس گاو، مورد نمونه برداری نسجی قرار گرفتند که ۶ راس از آن ها آلوده به ویروس کمبود ایمنی گاو، بودند.

یافته های ریزبینی در عقده های لمفاوی ۶ راس گاو آلوده عبارت بودند از: ۲ مورد (۳۳/۳ درصد) واجد هیپرپلازی و هیپرتروفی فولیکول های لمفاوی، ۱

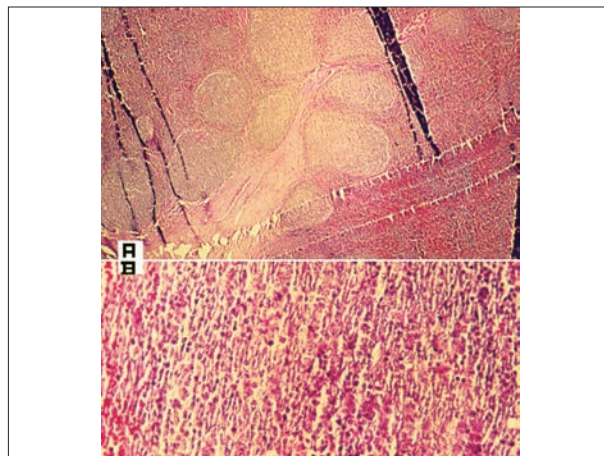
جدول ۶- نتایج ارزیابی شاخص های هماتولوژیک و فلوسایتومتریک در کل گاوهای کشتاری آلوده و غیر آلوده و آنالیز آماری آن ها.

P-Value	فاقد آلودگی (n=۱۶۵)			واجد آلودگی (n=۲۲)			شاخص هماتولوژیک یا فلوسایتومتریک
	Min	Max	Median	Min	Max	Median	
p>۰/۰۵	۶/۸	۲۵/۶	۱۱/۴۰	۷/۹	۱۹/۳	۱۱/۵۵	هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)
p>۰/۰۵	۲۰	۴۶	۳۲	۲۲	۴۳	۳۱	هماتوکریت (درصد)
p>۰/۰۵	۱۵۰۰	۴۶۵۰۰	۱۰۵۰۰	۲۲۵۰	۲۳۷۵۰	۱۰۸۷۵	گلبول های سفید (در میکرو لیتر)
p>۰/۰۵	۱۶	۸۱	۵۴	۲۳	۹۰	۴۷/۵۰	لمفوسیت (درصد)
p>۰/۰۵	۰/۵	۲۵/۴۳	۵/۶۰۰	۱/۱۳	۱۷/۹	۵/۳۹۵	لمفوسیت B (CD21 %)
p>۰/۰۵	۷/۷۸	۵۸	۳۵/۹۵	۰/۲۱	۵۸	۴۲/۱۳	لمفوسیت T (CD4 %)
p>۰/۰۵	۶/۱	۶۴/۸	۲۷/۲۴	۳/۳	۴۲/۳	۲۳/۱۵	لمفوسیت T (CD8 %)
۰/۰۱<p<۰/۰۵	۰/۳	۴	۱/۳۰	۰	۱۳/۲	۱/۸۵	CD4/CD8
p>۰/۰۵	۱۳	۸۳	۴۲	۵	۷۳	۴۵	نوتروفیل (درصد)
p>۰/۰۵	۰	۹	۱	۰	۱۰	۱	مونوسیت (درصد)
p>۰/۰۵	۰	۱۴	۲	۰	۱۸	۲	ائوزینوفیل (درصد)





تصویر ۷- همال نودهای مبتلا به تخلیه لمفاوی (کاهش تراکم سلول های لمفوئیدی و هیپوسلولاریته در فولیکول های لمفاوی، حضور پیکتوز و نکروز سلولی).



تصویر ۶- مشاهدات ریز بینی در همال نودهای مبتلا به هیپر پلازی و هیپرتروفی فولیکول های لمفاوی (A): فولیکول های لمفاوی در حال توسعه با مراکز زایگر فراوان و هیپرتروفیک، تراکم بافت لمفوئیدی بیش از حد B: تراکم بافت لمفوئیدی بیش از حد، حضور سلول های لمفوبلاست درشت با تراکم بالا).

آلودگی گاوها با این ویروس گزارش شده است. در مطالعه حاضر برای شناسایی گاوهای آلوده به ویروس کمبود ایمنی از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز از نوع نستند استفاده شد و همانند برخی مطالعات دیگر (۸) مشکل مانیزدربکارگیری این روش، عدم دسترسی به نمونه پلاسمید یا نمونه مثبت بود که از کشور کانادا تهیه گردید. شایان ذکر است که با تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات DNA تکثیر یافته در این بررسی و مقایسه آن ها با توالی های موجود در بانک ژن (۴،۹،۱۷)، معلوم شد که این قطعه DNA، مربوط به ژنوم ویروس کمبود ایمنی گاو بوده و لذا اختصاصی بودن روش اثبات گردید طوری که بین توالی های نوکلئوتیدی قطعات ژنومی تکثیر یافته که با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن gag از لوکوسیت های خون سه نمونه از گاوهای مورد مطالعه بدست آمده بودند و توالی های نوکلئوتیدی ویروس BIV R29 سویه فرانس (۴) و سویه 1. L04974 (۱۷)، به ترتیب تشابه (همولوگی) ۹۸/۷-۹۸/۹ درصدی و ۹۹/۷-۱۰۰ درصدی وجود داشت (تصویر ۲).

سکانسینگ نوکلئوتیدی محصولات آمپلیفای شده ژن pol ویروس های BIV جدا شده از ژاپن، برزیل، زامبیا و ژن gag ویروس جدا شده از هندوستان

آلودگی با این ویروس در برخی نواحی ایالات متحده آمریکا مثل لوئیزیانا، کلرادو و ایالات جنوب شرقی با میزان آلودگی در حدود بیش از ۶۰ درصد در گاوهای شیری گزارش شده است (۲۰،۲۴). با در نظر گرفتن میزان وقوع آلودگی به این ویروس در کشورهای آسیائی از جمله ژاپن ۲۵-۱۵ درصد (۱۴)، کره ۳۵ درصد (۳)، پاکستان ۱۵/۸ درصد (۱۳)، ترکیه ۱۲/۳ درصد (۱۵)، روسیه ۳۲ درصد (۷) و کامبوج ۲۶/۳ درصد (۱۱)، افریقایی از جمله زامبیا ۱۱/۴ درصد (۱۰) و امریکای جنوبی از جمله ونزوئلا ۱۲ درصد، برزیل ۱۱/۷ درصد (۱۲)، و با توجه به نتایج این بررسی، میزان آلودگی گاوها در کشور ما نیز تقریباً همانند سایر کشورهای مذکور آسیایی، افریقایی و امریکای جنوبی، نسبتاً بالا است در حالی که میزان وقوع آلودگی با این ویروس در گاوهای شیری استرالیا، اندونزی و نیوزلند ۵-۱ درصد (۱،۲۰)، در کشورهای اروپائی از جمله آلمان ۶/۶ درصد، فرانسه ۴ درصد (۱۹)، هلند ۱/۴ درصد و ایتالیا ۵/۸ درصد (۲) بوده که در مقایسه با نتایج بدست آمده در بررسی ما، میزان آلودگی پائین تری دارند. در برخی کشورهای دیگر جهان نیز از جمله پرتغال، سوئیس، کرواسی، چین، کاستاریکا و هندوستان (۲،۱۳،۱۸،۱۶)

جدول ۷- نتایج ارزیابی شاخص های هماتولوژیک و فلوسایتومتریک در جمعیت شماره ۲ گاوهای مورد مطالعه و آنالیز آماری آن ها.

P-Value	فاقد آلودگی (n = ۱۲۴)			واجد آلودگی (n = ۱۹)			شاخص هماتولوژیک یا فلوسایتومتریک
	Min	Median	Max	Min	Median	Max	
p>۰/۰۵	۱۵۰۰	۲۸۵۰۰	۹۷۵۰	۵۰۰۰	۱۶۵۵۰	۱۰۵۰۰	گلبول های سفید (در میکرولیتر)
p>۰/۰۵	۲۲	۸۱	۵۷	۳۸	۸۰	۵۳	لمفوسیت (درصد)
p>۰/۰۵	۱۳	۷۴	۳۸/۵	۱۳	۵۸	۳۹	نوتروفیل (درصد)
p>۰/۰۵	۰	۹	۱	۰	۶	۱	مونوسیت (درصد)
p>۰/۰۵	۰	۱۴	۲	۰	۱۸	۲	ائوزینوفیل (درصد)
p>۰/۰۵	۱	۲۳/۸	۶/۳۹	۱/۱۳	۱۷/۹	۸/۷۳	لمفوسیت B (CD21)
p>۰/۰۵	۷/۷	۵۸	۳۵/۰۴	۰/۲	۵۸/۷	۳۹/۸۷	لمفوسیت T (CD4)
۰/۰۱<p<۰/۰۰۵	۹/۲	۶۴/۸	۲۶/۱۱	۳/۳۶	۳۲/۴۷	۲۰/۸۵	لمفوسیت T (CD8)
۰/۰۰۱<p<۰/۰۰۵	۰/۳	۴	۱/۳	۰	۱۳/۲	۱/۸۰	CD4/CD8



۲۲، ۱۶)، که نتایج بررسی حاضر نیز با این موضوع هم راستاست. ۱۶٪ از ۶۸ گاو که همال نودهای آن ها، بزرگ و قابل تشخیص بودند (۲۳/۵ درصد)، آلوده به ویروس BIV تشخیص داده شدند (جدول ۵) بین میزان آلودگی به این ویروس و حضور بالینی همال نودها، رابطه معنی داری وجود داشت ($p < 0.05$) که این نتیجه همانند یافته‌هایی است که بزرگ شدگی همال نودها را به عنوان یکی از نشانه‌های قابل توجه در گاوهای آلوده به این ویروس ذکر کرده‌اند (۱۶، ۲۱). در مطالعه‌ای متداولترین یافته پس از کشتار در گاوهای آلوده به این ویروس را درگیری عقده‌های لمفاوی بدن دانسته‌اند که تبدیل به همال نودهای گرد و بزرگ به رنگ سیاه شده و یادردرون خود حاوی این همال نودها می‌شوند (۱۶). در این بررسی همال نودهای بزرگ شده، عمدتاً در ناحیه گردن با هم در ناحیه گردن و هم ناحیه تهیگاهی و گاهی پهلوها بصورت قرینه قابل ملامسه یا مشاهده بودند. ارتباط معنی داری بین میزان آلودگی و ناحیه آناتومیک همال نودها در معاینه بالینی، مشاهده نشد.

اگر چه در این بررسی، شمارش کل گلبول‌های سفید و بویژه درصد لمفوسیت در دامهای آلوده بصورت جزئی، بیشتر از دامهای غیر آلوده بودند، ولی آنالیز آماری نتایج، هیچ اختلاف معنی داری را بین شمارش کل گلبول‌های سفید، درصد نوتروفیل، لمفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل، میزان هموگلوبین، درصد هماتوکریت و درصد زیر گروه‌های لمفوسیتی (سلول‌های CD4+، CD8+، CD21+)، مابین دودسته از گاوهای آلوده و غیر آلوده به این ویروس، نشان ندادند و لذا نتایج این مطالعه، با گزارشی که حاکی از ایجاد لمفوسیتوزیس (موقتی) در گاوهای آلوده به این ویروس، می‌باشند (۶، ۲۵، ۲۷)، در این مورد همخوانی ندارد. با این حال نسبت سلول‌های CD4+ به CD8+ در گاوهای آلوده نسبت به غیر آلوده، افزایش معنی داری داشت ($p < 0.05$) که عمدتاً بدلیل کاهش قابل توجه درصد سلول‌های CD8+ در دامهای آلوده بود این وضعیت در رابطه با جمعیت شماره ۲ نیز، مصداق داشت ($p < 0.001$) (جدول ۷، ۶). منشأ لمفوسیتوزیس گزارش شده در مطالعات مختلف، افزایش هر دو نوع لمفوسیت‌های T و B (۶)، افزایش لمفوسیت‌های B یا افزایش لمفوسیت‌های T گزارش گردیده که نوع سلول‌های T افزایش یافته (T کمکی یا T ساپرسور) مشخص نشدند (۲۹)، در این بررسی نه تنها هیچ کدام از لمفوسیت‌های T یا B، در دامهای آلوده افزایشی را نشان نمی‌دادند، بلکه لمفوسیت‌های T از نوع CD8+، کاهش نیز یافته بودند که ظاهراً برخلاف گزارشات منتشره می‌باشد. البته باید اشاره کرد که با حذف دامهای آلوده به ویروس لوکوز از جمعیت مورد بررسی و ارزیابی سلول‌های CD8+ در بقیه گاوها، مشخص گردید که هیچ اختلاف معنی داری در درصد این سلول‌ها و نسبت CD4+/CD8+ در گاوهای آلوده و غیر آلوده با BIV، وجود ندارد. همانند این بررسی، مطالعاتی مختلفی نیز هستند که نشان می‌دهند در آلودگی گاو و گوساله‌ها به این ویروس چه پس از سپری شدن مدت زمان کوتاه پس از آلودگی (۲) یا مدت زمان طولانی مثلاً ۵ سال (۶)، در هیچ کدام از شاخص‌های خونی و زیر گروه‌های لمفوسیتی، تغییر معنی داری در مقایسه با دام‌های کنترل منفی ایجاد نمی‌شود (۲۹، ۲۶، ۲۷). در حالی که برخلاف نتایج

و مقایسه آن‌ها با همان ژن در ایزوله فرانس BIV-R29، نیز نشان داده است که سویه فرانس امریکائی BIV-R29، واجد ۹۹-۹۷/۵ درصد تشابه با سویه ژاپنی (۹)، ۱۰۰-۹۸ درصد تشابه با سویه زامبیایی (۱۰)، ۱۰۰-۹۸ درصد تشابه با سویه برزیلی (۱۲) و ۹۷-۹۶ درصد تشابه با سویه هندی (۱۸) بوده است.

در این بررسی، اختلاف میزان آلودگی بین جنس نر و ماده معنی دار نبود (جدول ۳). البته در مقایسه بین گاوهای شیری ماده با گاوهای نر تخمی در چند مطالعه محدود، میزان آلودگی در گاوهای نر تخمی بیشتر گزارش شده است از جمله در کانادا و ایتالیا میزان وقوع آلودگی در گاوهای نر تخمی به ترتیب ۱۲/۶ درصد و ۵/۵ درصد، در حالی که در گاوهای شیری ماده ۵/۵ درصد و ۲/۵ درصد اعلام شده است (۲) که نتایج مطالعات مذکور، مغایر با نتایج این بررسی هستند. علت این تفاوت‌ها را در بررسی‌های مذکور عمدتاً نوع مدیریت و سن دام‌ها ذکر کرده‌اند. از طرفی در مقایسه بین گاوهای شیری و گوشتی، وقوع آلودگی به این ویروس در گاوهای گوشتی پائین تر از گله‌های شیری بوده است که احتمالاً به علت پرورش متراکم و زیاد بودن عمر مفید دام‌های شیری باشد (۱۱، ۱۹) و ارتباطی به جنسیت ندارد. تاثیر سن دام‌ها در حساسیت به آلودگی با این ویروس، شناسائی شده و در مطالعه‌ای بر روی گاوهای شیری در میسی سپی نشان داده شد که میزان آلودگی با افزایش سن گاوها افزایش معنی داری می‌یابد (۲۴). با اینحال علیرغم این که در این بررسی در تجزیه و تحلیل کلی همه گروه‌های سنی با همدیگر رابطه معنی داری بین آلودگی و افزایش سن دام‌ها وجود نداشت، ولی بیشترین میزان آلودگی در گروه سنی چهار زوج دندان بالغ (۵ سال به بالا) با ۲۶/۸ درصد آلودگی، مشاهده شد (جدول ۳) طوری که میزان آلودگی در سنین صفرالی سه زوج دندان بالغ تقریباً در یک سطح بوده که پس از آن، در سن چهار زوج دندان، افزایش معنی داری ($p < 0.05$) پیدا کرده است لذا نتایج این بررسی نیز از افزایش احتمال آلودگی در سنین بالا، حکایت می‌کنند، قابل توجه آنکه دوره کمون و دوره بیماری اکثر لنتی ویروس‌ها بالا بوده و لذا وقوع آلودگی به این ویروس و نشانه‌های بالینی حاصله نیز اصولاً باید در دامهای مسن بیشتر باشد (۲).

ارتباط معنی داری بین آلودگی گاوها با این ویروس و درجه وضعیت بدنی آن‌ها مشاهده نشد (جدول ۳). با این حال در برخی گزارشات، لاغری و کاهش وزن به عنوان یکی از نشانه‌های بالینی آلودگی با این ویروس ذکر می‌شود (۱۱، ۱۹، ۲۳، ۲۶). در بررسی حاضر رابطه معنی داری بین میزان آلودگی گاوها و حضور اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت بینی و همچنین واکنش ظاهری عقده‌های لمفاوی در آن‌ها مشاهده نشد که این نتایج همانند نتایج مطالعاتی هست که ارتباط پایدار و قابل توجهی را بین آلودگی به این ویروس و ایجاد بیماری بالینی اختصاصی در گاوها، مستند نکرده و نقش آن را در ایجاد بیماری در گاو، نامعلوم اعلام می‌نمایند (۲۰، ۲۴). با این که در برخی بررسی‌ها، درجات متفاوت لمفادنوپاتی عمومی یا موضعی را در این آلودگی ذکر کرده‌اند (۱۰، ۲۱) ولی عموماً معتقدند که هیچ ارتباط معنی داری بین واکنش و بزرگ شدگی عقده‌های لمفاوی و آلودگی به این ویروس، وجود ندارد (۲۳).



References

1. Andrews, A. H., Blowy, W., Boyd, H., Eddy, R. G. (2003) Bovine medicine. (2thed.) Blackwell Science Ltd. Oxford, UK.
2. Carivani, S., Donofrio, G., Chiocco, D., Foni, E., Martelli, P., Allegri, G., Cabbasi, C. S., De Iaco, B., Flammini, C. F. (1998) Seroprevalence to Bovine immunodeficiency virus and lack of association with leukocyte counts in Italian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 37: 147-157.
3. Cho, K. O., Meas, S., Park, N. Y., Kim, Y. H., Lim, Y. K., Endoh, D., Lee, S. I., Oashi, K., Sugimoto, C., Onuma, M. (1999) Seroprevalence of Bovine Immunodeficiency virus in dairy and beef cattle herds in Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 549-551.
4. Garvey, K. J., Oberste, M. S., Elser, J. E., Braun, M. J., Gonda, M. A. (1990) Nucleotide sequence and genome organization of biologically active proviruses of the bovine immunodeficiency-like virus. *Virology* 175: 391-409.
5. Gradil, C. M., Watson, R. E., Renshaw, R. W., Gilbert, R. O., Dubovi, E. J. (1999) Detection of Bovine immunodeficiency virus DNA in the blood and semen of experimentally infected bulls. *Vet. Microbiol.* 70: 21-31.
6. Isaacson, J. A., Flaming, K. P., Roth, J. A. (1998) Effects of long - term infection with Bovine immunodeficiency virus and/or bovine leukemia virus on antibody and lymphocyte proliferative responses in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64: 249-266.
7. Kolotvin, V. V., Grinenko, N. F., Piskareva, L. M., Pashvykina, G. V., Shaikhaev, G. O., Al'tshtin A. D., Valikhov, F. (2007) Distribution of Bovine Immunodeficiency Virus in Herdsof Moscow Region and Stavropol Krai, *Russian Agri. Sci.* 1: 54-56.
8. Lew, A. E., Back, R. E., Miles, J., Cuttall, L. B., Steer, P., Nadin-Davis, S. A. (2004) Sensitive and specific detection of Bovine immunodeficiency virus and syncytial virus by 5 Taq nuclease assays with fluorescent 3 minor groove binder - DNA probs. *J. Virol. Meth.* 116: 1-9.
9. Meas, S., Kabeya, H., Yoshihara, S., Ohashi, K., Matsuki, S., Mikami, Y., Sugimoto, C., Onuma, M.

این بررسی، در گزارش هایی نیز آمده است که ۳-۴ ماه پس از آلوده کردن تجربی گاوها با BIV، لمفوسیت هایکاهش می یابند (۲۱،۲۲)، وضعیت اخیر نشان دهنده آنست که اختلال عملکرد سیستم ایمنی در گاو دقیقاً مثل اثر ویروس HIV می باشد. احتمالاً این تغییرات و کاهش سلول های ایمنی در اوایل آلودگی به ویروس کمبود ایمنی گاو مشهود می باشند (۶،۲۱). در عقده های لمفاوی و همال نودهای نمونه برداری شده از گاوهای آلوده به ویروس BIV، هیپرپلازی و هیپرتروفی فولیکول های لمفاوی (در ۳۳/۳ درصد) و تخلیه لمفوئیدی فولیکول های لمفاوی (در ۵۰ درصد) مشخص گردیدند. در گزارش های مختلف نیز در آلودگی گاوها با این ویروس عمدتاً به این دو نوع تغییر آسیب شناسی در سیستم لمفاوی اشاره می کنند (۲۱،۲۲،۲۳،۲۶،۲۷). که با نتایج بررسی حاضر، همخوانی دارند. البته هر دو این تغییرات ذکر شده، بسته به مرحله آلودگی، اتفاق می افتند، طوری که در مراحل اولیه آلودگی، هیپرپلازی اولیه لمفوئیدی در نسوج لمفاوی از جمله عقده های لمفاوی و همال نودها و در مراحل بعدی و انتهائی آلودگی با پیشرفت بیماری، از میزان هیپرپلازی لمفوئیدی کاسته شده و تخلیه لمفاوی در این ساختارها، دیده می شود (۱،۱۶،۲۲،۲۷).

بررسی حاضر نشان داد که اولاً جمعیت گاوهای هلستاین کشتار شده در استان تهران، واجد آلودگی نسبتاً بالائی با ویروس کمبود ایمنی گاو بوده که این میزان آلودگی بالا و نیز توالی نوکلئوتیدی ویروس درگیر در ایران، تقریباً مشابه برخی کشورهای دیگر آسیائی، آفریقائی و امریکای جنوبی، می باشد. دوماً بزرگ شدگی همال نودهای بدن گاوهای آلوده با این ویروس، معنی دار بوده و همچنین نسبت سلول های CD4+ به CD8+ (CD4+/CD8+) در گاوهای آلوده نیز، ممکن است افزایش یابد. از طرفی پیشنهاد می شود که علاوه بر انجام مطالعات گسترده دیگر روی گاوهای صنعتی و بومی کشور به منظور مشخص کردن وضعیت آلودگی با این ویروس، در طی یک مطالعه نسبتاً مدت دار در سطح دامداری های آلوده نیز، ارتباط بین نشانه های بالینی گزارش شده و آلودگی و همچنین میزان خسارات اقتصادی ایجاد شده بررسی گردد. شایان ذکر است که با توجه به اهمیت ویروس کمبود ایمنی گاو در ایجاد اختلال در سلامتی گاو و امکان بهره گیری از آلودگی گاوها به این ویروس، به عنوان یک مدل حیوانی در عفونت با ویروس ایدز انسان، نیاز به تحقیقات بسیار زیادتری در خصوص اثرات آلودگی با آن در پاسخ های اکتسابی سیستم ایمنی گاو، وجود دارد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت های مالی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و بنیاد مستضعفان برای انجام این پژوهش قدردانی میشود. بعلاوه نگارندگان از زحمات آقایان مظاهری، اشرافی و موسوی، کارشناسان محترم دانشکده دامپزشکی و همچنین پرسنل محترم آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران برای همکاری در انجام این تحقیق، صمیمانه تشکر می نمایند.



- (1998) Seroprevalence and field isolation of Bovine Immunodeficiency virus. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 1195-1202.
10. Meas, S., Nakayama, M., Usui, T., Nakazato, Y., Yasuda, J., Ohashi, K., Onuma, M. (2004) Evidence for Bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Zambia. *Jpn. J. Vet. Res.* 52:3-8.
11. Meas, S., Ohashi, K., Tum, S., Chhin, M., Te, K., Miura, K., Sugimoto, C., Onuma, M. (2000) Seroprevalence of Bovine immunodeficiency virus and Bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 779-781.
12. Meas, S., Ruas, J., Farias, N. A., Usui, T., Teraoka, Y., Mulenga, A., Chang, K. S., Masuda, A., Madruga, C. R., Ohashi, K., Ouma, M. (2002) Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle. *Jpn. J. Vet. Res.* 50: 9-16.
13. Meas, S., Seto, J., Sugimoto, C., Bakhsh, M., Riaz, M., Sato, T., Naeem, K., Ohashi, K., Onuma, M. (2000) Infection of Bovine Immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 329-331.
14. Meas, S., Usui, T., Ohashi, K., Sugimoto, C., Onuma, M. (2002) Vertical transmission of bovine leukemia virus and Bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Vet. Microbiol.* 84: 275 -282.
15. Meas, S., Yilmaz, Z., Usui, T., Torun, S., Yesilbag, K., Ohashi, K., Onuma, M. (2003) Evidence of bovine immunodeficiency virus in cattle in Turkey. *Jpn. J. Vet. Res.* 51: 3-8.
16. Munro, R., Lysons, R., Venables, C., Horigan, M., Jeffery, M., Dawson, M. (1998) Lymphadenopathy and non-suppurative meningo-encephalitis in calves experimentally infected with bovine immunodeficiency-like virus (FL112). *J. Comp. Pathol.* 119: 121-34.
17. Nadin-Davis, S. A., Chang, S. C., Smith, H., Jacobs, R. M. (1993) Detection of bovine immunodeficiency-like virus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Method.* 42:323-336.
18. Patil, S. S., Pattnaik, B., Mishra, N., Banumathi, N., Dubey, R., Pradhan, H. K. (2003) Detection of proviral genomic sequence of bovine immunodeficiency virus in Indian cattle. *Current Sci.* 48: 563-566.
19. Polack, B., Schwartz, I., Berthelemy, M., Belloc, C., Manet, G., Vuillaume, A., Baron, T., Gonda, M. A., Levy, D. (1996) Serologic evidence for Bovine immunodeficiency virus infection in France. *Vet. Mic.* 48: 165-173.
20. Radostitis, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. H., Constable, P. D. (2007) *Veterinary Medicine.* (10thed.) Saunders Elsevier, London, UK.
21. Snider, T. G., Coats, K. S., Storts, R. W., Graves, K. F., Cooper, C. R., Hoyt, P. G., Luther, D. G., Jenny, B. F. (2003) Natural bovine lentivirus type 1 infection in Holstein dairy cattle. II. Lymphoid tissue lesions. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 1-15.
22. Snider, T. G., Hoyt, P. G., Coats, K. S., Graves, K. F., Cooper, C. R., Storts, R. W., Luther, D. G., Jenny, B. F. (2003) Natural bovine lentivirus type 1 infection in Holstein dairy cattle. I. clinical, Serological, and Pathological observations. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 89-101.
23. Snider, T. G., Luther, D. G., Jenny, B. F., Hoyt, P. G., Battles, J. K., Ennis, W. H., Balady, J., Blas - Machado, U., Lemerchand, T. X., Gonda, M. A., (1996) Encephalitis, Lymphoid tissue depletion and secondary diseases associated with Bovine immunodeficiency Virus in a dairy herd. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 117-131.
24. St. Cyr Coats, K., Pruett, S. B., Nash, J. W., Cooper, C. R. (1994) Bovine immunodeficiency virus: incidence of infection in Mississippi dairy cattle. *Vet. Microbiol.* 42: 181-189.
25. Suarez, D. L., Van Der Maaten, M. J., Wood, C., Whetstone, C. A. (1993) Isolation and characterization of new wild - type isolates of bovine lentivirus. *J. Virol.* 67: 5051-5055.
26. Usui, T., Meas, S., Konnai, S., Ohashi, K., Onuma, M. (2003) Seroprevalence of Bovine immunodeficiency virus and Bovine leukemia virus in Dairy and Beef cattle in Hokkaido. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 287-289.
27. VanDer Maaten, M. J., Booth, A. D., Seger, C. L. (1972) Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis. *J. Natl. Cancer. Inst.* 49: 1649-1657.



28. Walder, R., Kalvatchev, Z., Perez, F., Garzaro, D., Barrios, M. (2001) Bovine immunodeficiency virus infection in experimentally infected rabbit: tropism for lymphoid and nonlymphoid tissues. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 24:1-20.
29. Whetstone, C. A., Suarez, D. L., Miller, J. M., Pesch, B. A., Harp, J. A. (1997) Bovine lentivirus induces early transient B-cell proliferation in experimentally inoculated cattle and appears to be pantropic. *J. Virol.* 71: 640-644.



THE FIRST SURVEY ON THE STATUS OF THE BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTION AND ASSOCIATED CLINICAL, PATHOLOGICAL, HAEMATOLOGICAL AND FLOW CYTOMETRIC FINDINGS IN HOLESTEIN CATTLE IN IRAN

Bazargani, T. T.¹, Tooloei, M.^{2*}, Broujeni, G. N.³, Garagozlo, M. J.⁴, Bokaei, S.⁵, Khormali, M.³, Barjaste, N.³

¹*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

²*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.*

³*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

⁴*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

⁵*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

(Received 29 September 2007 , Accepted 19 June 2008)

Abstract:

Bovine Immunodeficiency Virus is a Lentivirus which can cause varieties of infectious complications and induce remarkable losses to dairy industry. Considering to the probability of worldwide distribution of the BIV infection, this study was conducted for the first time in Iran to determine of the status of BIV infection in the Holstein cattle and evaluate the associated findings. According to the results of the Nested-PCR method in this study, 16.2% of 197 slaughtered Holstein cattle in Meysam abattoir of Tehran were infective with BIV. Sequencing of the amplicons obtained from PBLs of the cattle using gag-specific primers revealed that there was 98.7-98.9% homology between this field strain and reference sequences of BIV. The infection rate of cattle with enlarged heamal nodes was higher than the animals without these lesions ($0.01 < p < 0.05$). There weren't any significant correlations between BIV infection rate and age, sex, BCS, clinical problems or macroscopic lesions and enlarged lymph node as well as the anatomical situation of enlarged heamal nodes. Flow cytometric analysis showed that the relative frequency of CD8+s in the infected animals was significantly lower than the non- infected ones ($0.01 < p < 0.05$). There weren't any significant differences between total leukocyte counts, relative frequencies of neutrophil, lymphocyte, CD4+, CD21+, monocyte, eosinophil, hemoglobin and PCV of the infected and non- infected groups. Lymphoid follicular hyperplasia- hypertrophia and in some cases depletion of lymphoid follicles in the lymph and heamal nodes were the main histopathological findings of the infected cattle. The results showed that the BIV infection rate of the surveyed Holstein cattle was relatively high.

Key words: bovine immunodeficiency virus, Holstein cattle, Nested PCR, Hematology, flow cytometry.

*Corresponding author's email: mtooloei@tabrizu.ac.ir, Tel: 0411-3357834, Fax: 0411-3392342

