

اولین بررسی بالینی وضعیت آلودگی به ویروس کمبود ایمنی گاو و یافته‌های پاتولوژیک، هماтолوژیک و فلوسایتو متیرک در گاوهای هلشتاین ایران

نقی تنقی پور بازرگانی^۱ محمد طلوعی^{*۲} غلامرضا نیکبخت بروجنی^۳ سعید بکائی^۴ محمود خرمالی^۵ ندا بر جسته^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 صنعت‌گاوهای 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 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 نوکلوتیدی این ویروس و سویه رفرانس، تشابه ۹۸/۷-۹۸/۷ درصدی وجود دارد. میزان آلودگی در گاوهای مبتلا به بزرگشدنی همال نودها، نسبت به گاوهای فاقد این ضایعات، بیشتر بود ($p < 0.05$). بین میزان آلودگی و سن، جنس، BCS، اختلالات بالینی، آسیب‌های درشت‌بینی، بزرگی عقده‌های لمفاوی و موقعیت آناتومیک حضور همال نودهای گاوهای رابطه‌آماری معنی داری مشاهده شد. آنالیز فلوسایتو متیرک معلوم ساخت که در سلسول‌های CD8+ در گاوهای آلوده در مقایسه با غیرآلوده، کاهش معنی داری ($p < 0.05$) دارد. اختلاف معنی داری بین شمارش کل گلبول‌های سفید، درصد هماتوکریت، نوتروفیل، لمفوسيت، مونوسیت، ائزوپنوفیل، سلسول‌های CD4+ و میزان هموگلوبین مابین دو دسته از گاوهای آلوده و غیرآلوده مشاهده نشد. هیپرپلازی-هیپرتروفی و در برخی موارد تخلیه لمفوئیدی فولیکول‌های لمفاوی، از یافته‌های آسیب‌شناسی عقده‌های لمفاوی و همال نودهای گاوهای آلوده بودند. بررسی حاضر نشان داد که گاوهای هلشتاین مورد مطالعه واحد آلودگی نسبتاً بالاتر با ویروس BIV بودند.

واژه‌های کلیدی: ویروس کمبود ایمنی گاو، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از نوع نستد، سکانسینگ، خون‌شناختی، فلوسایتو متیرک.

در بدن به طیف وسیعی از سلسول‌های ایمنی از جمله لمفوسيت‌های T، B، نمونه‌ساخته‌ها و ماکروفازهای گرایش دارد^(۲۹). (البته هنوز گیرنده‌های سلسولی درگیر در آلودگی به این ویروس کاملاً شناخته نشده‌اند در حالی که HIV عمدتاً سلسول‌هایی را که در سطح خود، واحد گیرنده CD4+ هستند، آلوده می‌کند^(۲۸)). احتمالاً آلودگی با ویروس کمبود ایمنی گاو، توزیع جهانی و غیریکنواختی دارد (۷، ۲۰، ۲۲). ممکن است در گله‌های شیری که فراوانی تعداد دام‌های نامقرن به صرفه در آن‌ها بالاست، میزان آلودگی حتی تا بالای ۶۰ درصد نیز برسد^(۲۰). به جزء ادھاری اصلی شیری بوزیره هلشتاین، تراویدهای بومی و حتی گاومیش‌های زیبه میزان نسبتاً بالاتر آلودگی را نشان داده‌اند^(۳، ۱۱، ۱۳). آلودگی با این ویروس می‌تواند با عفونت‌های ویروسی دیگر نیز که مهمترین آن‌ها ویروس لوکوز می‌باشد، توازن شود^(۱۱، ۱۴، ۲۲، ۲۶). در انتقال طبیعی ویروس کمبود ایمنی گاو هر دو روش افقی و بیوژنه عمودی از طریق شیر مادران آلوده و یا داخل رحمی از طریق جفت مورد توجه قرار گرفته است^(۱۴). این ویروس قویاً وابسته به سلسول بوده و لذا ممکن است از طریق خون، آغوز، شیر و سایر مایعات آلوده بدن مثل منی که حاوی سلسول‌های لمفوپرولیفراتیو هستند منتقل شود^(۲۰). تاکنون آلودگی گاوهای ماده با ویروس از طریق منی‌های آلوده در حین جفت‌گیری،

مقدمه

ویروس کمبود ایمنی گاو (BIV)، از زیر خانواده لنتی ویروس‌ها بوده و از ژنوم RNA تک رشته‌ای، غشاء، کپسید، نوکلئوپسید، ترانس کریبتاز معکوس و اینتگراز تشکیل شده است. ویروس‌های کمبود ایمنی انسان (HIV-1, 2)، میمون (SIV)، گربه (FIV)، ویروس مددی-ویزنا، آرتیت-آنسفالیت بزها (CAEV)، کم خونی عفونی اسپ (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 درماتن Van Der Maaten در لوئیزیانای آمریکا از لکوسیت‌های خون یک گاو هلشتاین مبتلا به لمفوسيتوز، لمفوآدنوپاتی، لاغری و نروپاتی، جداسازی و در سال ۱۹۷۲ تحت عنوان سویه BIV-R29 گزارش گردید^(۲۷). مطالعه این ویروس تا حالی سال‌های ۱۹۸۰ که مصادف با شناسائی ویروس HIV بود، معلم ماندگاری 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 عنوان BIV R29^(۲۷) یا جدایه مرجع قدیمی^(۲۷) و FL 112 BIV^(۲۷) یا جدایه جدید^(۲۵) شناخته شده‌اند. این ویروس



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 باهدف تعیین میزان شیوع آلودگی به ویروس کمبودا یمنی گاو در گواهای هلشتاین به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز از نوع نستند و بررسی اختلالات بالینی. آسیب‌های درشت بینی و ریزبینی، تغییرات شاخص‌های مختلف خونی و فلوسایتومتری (فرابوی نسبی برخی زیر گروه‌های لمفوسیت‌های T و B) همراه در گواهای 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 زمستان ۱۳۸۴، از ورید و داج ۱۷ گاو هلشتاین کشتار شده در کشتارگاه میثم تهران در ۵ گروه سنی واحد صفرالی 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 بدنه (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 ریزبینی نمونه‌برداری و نمونه با فرمالین ۱۰ درصد فیکس می‌شد.

ب- خون شناسی: شمارش تعداد کل گلوبول‌های 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 بروش استاندارد سنجیده می‌شد.

پ- ریزبینی: نمونه‌های فیکس شده پس از آبگیری، شفاف سازی و الكل‌گیری، با پارافین آغشته و قالب‌گیری شده (روش پارافین) و با دستگاه میکروتوم برش داده شدند. پس از زدودن مواد اضافه‌آبگیری و شفاف سازی مجدد، لام‌های روش هماتوکسیلین و اتوژین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مورد مشاهده قرار می‌گرفتند.

ت- پادتن‌های منوکلونال و فلوسایتومتری: پانلی از پادتن‌های منوکلونال کوتزروگه موشی شامل: MCA1653F (ضد‌گیرنده CD4 گاو)، MCA1424F (ضد‌گیرنده CD8 گاو)، MCA837F (ضد‌گیرنده CD21 گاو) و دونوع پادتن منوکلونال کوتزروگه (-CO و CD4, 8 CO-.). به عنوان پادتن‌های کنترل منفی، همگی تهیه شده از شرکت Serotec انگلستان، استفاده شدند. لیز گلوبول‌های قرمز، آماده سازی نمونه‌ها و رنگ آمیزی این‌نوفلورست سلول‌های 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 شده‌اند ولی آلودگی طبیعی آن‌ها به جز در گاو دیده نشده است (۲۸). تاکنون مدرکی دال بر انتقال ویروس کمبودا یمنی گاو به انسان وجود ندارد (۱، ۵، ۲۰). با توجه به شباهت‌های HIV، فرض این موضوع که این ویروس نیز بایستی در گاو اثرات آسیب زائی مشابهی داشته و سلامتی آن‌ها را بصورت مزمن، به خط‌راندازد، توجیه پذیر می‌باشد (۲، ۶). اما احتمالاً به علت عمر اقتصادی پائین گاو و دوره کمون بالای ویروس، سندروم‌های بالینی و اثرات آسیب‌زنای ایجاد شده توسط این ویروس در گاو شناخته نمی‌شود (۲، ۲۰). شکل‌گیری سنسیتیوم، ضایعات سیستم لمفوئیدی (۲۱، ۲۲)، سیستم اعصاب مرکزی (۱، ۲۲) و عفونت‌های ثانویه (۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳) نکات شناخته شده مرتبط با آسیب‌زنای ویروس کمبودا یمنی 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 ماکروفایز (۱۱)، مونوцит، بوتروفیل، 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 کمبودا یمنی گاو و ایجاد بیماری بالینی اختصاصی در آن مستثنده است (۲۰) (با این حال این ویروس در برخی آلودگی‌های تجربی گوساله‌ها، فاقد اثرات تضعیف کننده ایمنی بوده یا اثرات ملایم و موقتی از خوبه 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 مننگوآنسفالیت غیر چرکی (۱۹، ۲۲، ۲۶) از مهمترین تغییرات آسیب‌شناسی در آلودگی این ویروس، می‌باشند (۱۶، ۲۸). در آلودگی انسان، گریه و میمون با ویروس‌های کمبودا یمنی مربوطه نیز تغییرات مشابهی گزارش شده است (۲۱، ۲۲، ۲۸). کشت و جداسازی ویروس، روش‌های سرولوژیک یا مولکولی برای تشخیص آلودگی به این ویروس استفاده شده است (۱۸) (بخاطر مشکل بودن تشخیص دام‌های آلوده از طریق جداسازی ویروس و محدودیت‌های روش‌های سرولوژیک از جمله عدم شناسائی آنتی بادی در مراحل اولیه یا مزمم آلودگی، عدم تابه طور موقفيت آمیزی اقدام به شناسایی DNA پروروبروسی بروش و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازیه و پژوه نوع نستد، در لکوستیت‌های خونی، نسوج لمفاوی یا عصبی نموده‌اند (۱، ۵، 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 می‌افتد (۱).

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



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

اندازه محصول (جفت باز bp)	توالی اولیگونوکلئوتید	موقعیت در زنگ و بروس	رن	پرایمر	مرحله و اکشن
۷۴.	۵'-AGGCCAGAGCTGATAAGGAA - 3'	۶۵۳-۶۷۳	Gag F	gag	دورة PCR
	۵'-ATCCCCTACTACCTACATGCT - 3'	۱۳۷۳-۱۳۹۳	Gag R	gag	
۳۹۲	۵'-AGATCTGGTCAGACGCCA - 3'	۸۲۱-۸۳۹	Gag 3	gag	دورة PCR
	۵'-CCAAGGAGCCGTACACAG - 3'	۱۱۹۹-۱۲۱۳	Gag 4	gag	

پروویروسی BIV در زنوم سلول های تک هسته ای گاوه های مورد مطالعه، با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی، ازروش نستد PCR استفاده شد. در این روش، برای شناسایی یک قطعه DNA ۳۹۲ جفت بازی از سکانس وبروس مذکور مطابق با نوکلئوتید ۱۳۱-۸۲۱ 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 (PBIV300) GAG (که از کشور کانادا - اتاوا سکانس های کامل DNA پروویروسی BIV) حاوی Susan Nadin-Davis دریافت گردید)، به عنوان کنترل مثبت استفاده می شد. حجم مخلوط نهائی هرو واکنش به ۵۰ میکرو لیتر می رسید. مواد مورد استفاده و حجم هر کدام از آن ها برای بدست آوردن مخلوط نهائی عبارت بودند از: ۱۰۰ انانوگرم (۰.۰۲ میکرو لیتر) DNA زنومی سلول ها (در واکنش مرحله دوم PCR، به جای نمونه DNA، یک میکرو لیتر از محلول PCR مرحله اول استفاده می شد)، ۳/۸ میکرو لیتر آب (در واکنش مرحله دوم، ۳/۹ میکرو لیتر)، ۵ میکرو لیتر بافر ×۱۰ (حاوی ۰.۸ mM Tris-HCl، ۰.۸ mM میکرو لیتر)، ۰.۱ میکرو لیتر /۰.۰۵ درصد، ۰.۱ Triton X100، ۰.۰۵ mM KCl، ۰.۰۵ mM MgCl₂، ۰.۰۵ dNTPs (۰.۰۵ میکرو لیتر از هر ۰.۰۵ میکرو لیتر میکرو پرایمر و ۰.۰۵ میکرو لیتر (حاوی ۵ واحد در هر میکرو لیتر) Taq پلی مراز).

چرخه های حرارتی با استفاده از یک دستگاه ترسوسایکلر Techne مدل Tc 512، به ترتیب زیر انجام گرفت: پس از مرحله واسرشت سازی اولیه در ۴۴ 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 ۴۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه انجام شده و سپس مرحله نهایی ساخت رشته مکمل با ۱۰ دقیقه در ۷۷ درجه سانتیگراد دنبال شدند با این تفاوت که مرحله دوم (چسیدن پرایمرهای هدف)، در هر سیکل به مدت ۱ دقیقه، در دو سیکل ابتدایی در مدارای 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 آغاز شد. در همان شرائط انجام می شد.

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

Daco امریکا، انجام گردید. پس از بدست آوردن سلول های سفید نشاندار شده با پادتن های منوکلولنال کونژوگه، با اضافه نمودن محلول فیکساتور PBS و پارافرمالدیئید 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، لمفوسيت های هدف شناسائی و شمارش می شدند. در نرم افزار مذکور، فراوانی نسبی و مطلق این یاخته، در شمارش ۱۰۰۰ سلول لکو سیتی از طریق رسم یک هیستوگرام تک پارامتری که نشدت فلورسانس را در محور X و تعداد شمارش را در محور Z نشان می داد محاسبه می شد.

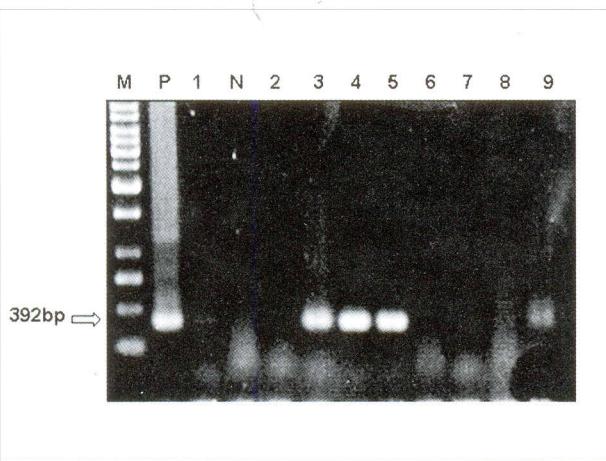
ث- آماده سازی و استخراج DNA: گلوبول های قرمز نمونه ها با استفاده از محلول بافر A (لیزکننده گلوبول های قرمز حاوی MgCl₂, Tris-HCl, NaCl) و سلول های سفید توسط محلول بافر B (لیزکننده (Triton x 100, EDTA, NaCl, Tris-HCl, NaCl, SDS) نیم مول، ۱۰ درصد) گلوبول های سفید حاوی EDTA، NaCl، Tris-HCl، NaCl، SDS مول ۵ میلی مول استاتن لیز شده و با اضافه نمودن محلول گوانیدیوم ۵M و سپس محلول استاتن پتاسیم و در نهایت سانتریفوژ نمودن کل مجموعه با rpm ۱۴۰۰۰ سلولی در مایع روئی آزاد می شد. بدنبال اضافه نمودن ۷/۰ حجم محلول ایزوپروپانول سرد به مایع روئی و سانتریفوژ آن، در ته میکروتیوب رسوپ 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، بست 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 زن (GAPDH)، شده و نتیجه روی ژل برده شدند تا ز حضور این ژن در پر فایل به عنوان معیار استخراج DNA استفاده شود. ردیف اولیگونوکلئوتیدی پرایمرهای صحت استخراج DNA شامل: F(5'-TGGCAAAGTGACATCGTCG-3') و R(5'-TTGCGTGGACAGTGGTCATAAGTC-3') بودند.

ج- پرایمراهای اولیگو نوکلئوتیدی: برای ردیابی حضور DNA پروتئین و بروکسی BIV. پرایمراهای شن gag و بروکس، انتخاب شدند (جدول ۱).

این پرایمروها مطابق با سکانس BIV سویه ۱ NC-001413 که در بانک ژنی سایت PubMed بنام سویه رفرانس معرفی شده بودند^(۴) و با کمک نرم افزار ۲.۲ Fast PCR ۵. طراحی شدند. تمامی پرایمروهای استفاده شده از شرکت Prime ایتالیا تهیه شدند.

ج- آمپلیفیکاسیون DNA پروویروسی: به منظور شناسایی





تصویر ۱- ژل آگارز مربوط به الکتروفورز تعدادی از محصولات PCR آمپلیفای شده با پرایمرهای ژن gag ویروس BIV که با تیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و با شعه ماوراء بنفش تصویر برداری شده اند: نمونه های مثبت با حضور باند ۳۹۲ جفت بازی مشخص شده اند (خط ۱، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹). خط M مارکر بکلیوبازی، 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 ۱آمده است.

ب- تعیین توالی (سکانسینگ): نتایج سکانسینگ قطعات بدست آمده از آمپلیفیکاسیون پروویروس BIV در سه نمونه از گاو های آلوده مورد مطالعه و ردیف بندی و مقایسه آن ها (Alignment) در تصویر ۲آمده است. تیتر سرمی آنتی بادیهای ضد آنفلوانزای 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 حرفة دامپزشکی توسط آزمایش HI سنجیده شد. در این تحقیق نمونه های دارای تیتر HI بالاتر از ۱/۸ عنوان نمونه های مثبت در نظر گرفته شدند. نتایج حاصله در جداول ۴، ۳، ۲، ۱ نشان داده است. تیتر سرمی آنتی بادی های ضد آنفلوانزای 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 حرفة دامپزشکی توسط آزمایش الیزا سنجیده 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 آناتومیک همال نودهادر جدول ۵، آمده اند.

مال نودهای بزرگ شده، عمدتا 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 کمبوود ایمنی گاو بر اساس نتایج حاصل از آزمون Nested-PCR.

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

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 BRL, PCR، خالص سازی و از نمک ها و بافرهای موجود در واکنش PCR، جدا گردیدند. قطعات با استفاده از کیت kit PCR-Cloning، شرکت Qiagen، 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 DNAstar که در نرم افزار دسترسی هست، با گزارشات ویروس BIV موجود در بانک ژنی سایت PubMed از جمله سویه ۱. M32690 یا ۱. NC-001413 (BIVL04974. ۱۷) رفائل R۲۹ معرفی شده (۴) و همچنین سویه ۱. 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 نامار 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 بانتایج آلودگی و آزمون t نمونه های مستقل، برای ارزیابی ارتباط بین شاخص های هماتولوژیک و فلوسایتومتریک بانتیجه 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 پایی مراز از نوع نستد روی DNA های استخراج شده از سلول های تک هسته ای خون محیطی ۱۹۷ راس گاو مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای ژن gag در PCR دور اول، هیچ باند آشکاری بدست نیامد ولی در 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 آلوودگی به ویروس کمبود ایمنی براساس نتایج آزمون 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=۲/۵-۳/۵) در سه گروه لاغر (BCS=۱-۲)، متوسط (BCS=۲/۵-۴/۵) و چاق (BCS=۴-۵) تقسیم شدند (۱۶).

جنس			درجه وضعیت بدنی				سن		
فرابوی مطلق و نسبی دامهای آلوود	جمع نمونه	جنس	فرابوی مطلق و نسبی دامهای آلوود	جمع نمونه	BCS*	فرابوی مطلق و نسبی دامهای آلوود	جمع نمونه	زوج دندان بالغ	
(۱۱/۱)۱۵	۴۵	نر	(۱۲/۵)۳	۲۴	۱-۲	(۱۳/۵)۲۱	(۱۳/۲)۵	۳۸	.
				۱۲۴	۲/۵-۳/۵			(۱۶/۷)۶	۳۶
(۱۷/۸)۲۷	۱۵۳	ماده	(۱۸/۴)۹	۴۹	۴-۵	(۱۵/۶)	(۹/۵)۴	۴۰	۲
				۱۹۷	جمع			(۲۶/۸)۱۱	۴۲
(۱۶/۲)۳۲	۱۹۷	جمع	(۱۶/۲)۳۲	۱۹۷	جمع	(۱۶/۲)۳۲	(۱۶/۲)۳۲	۱۹۷	جمع
p>0/05			p>0/05			0/01<p<0/05		p>0/05	

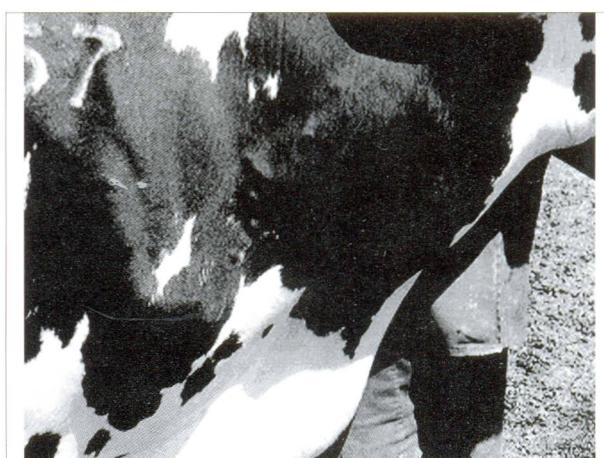
(N=821)	
R29 .REFSEQ	AGATCTGGTCAGACGCCACTGAAAGAATTGGGGTGTACCTTCATGCAGTGAATATATTAGGGGTCAATTACAGCAGAACCTAGTACAGGAAGAAATTAAACT
R29	-----AA-----
F51	-----AA-----
F52	-----AA-----
F53	-----AA-----
R29 .REFSEQ	CCT-CTTGAATACTACACC-CAGTGAGATTAGATGTACAACTTATAGAATCAAAAGTAAAGAGAGAAAATGCCAACAGAACGTGGAAACAGCAGTC
R29	-----A-----
F51	-----A-----
F52	-----A-----
F53	-----A-----
R29 .REFSEQ	ATCCAGAAGCCCCAAAAACAGTGAAATCATCGGTAAAGGGCTTAGTTCTGCTGAAACAGCACCCCTGATCTCAGTAGAATGCAGAGAAACTTCAGACA
R29	-----G-----
F51	-----
F52	-----
F53	-----
R29 .REFSEQ	GTTGGGTGCTGCAGGCAGCTATGGAGGTGGCACAGGCACAAACATGCTACC--CCAGGTCCCATCAGGGACCCAGGCCAGCTCAG
R29	A-----
F51	A-----
F52	A-----
F53	A-----

تصویر ۲- توالی نوکلئوتیدی قطعات آمپلیفای شده ۳۹۲ جفت بازی ژن gag ویروس BIV بدست آمده از سه نمونه گاو آلووده و ردیف بندی و مقایسه آنها (Alignment) با توالی نوکلئوتیدی سوبه های گارش شده R29 BIV. (توالی نوکلئوتیدی در موقعیت ۸۲۱-۱۲۱۳ نشان داده شده و پرایمرها بصورت ایاتلیک و زنگی مشخص شده اند).

جدول ۴- توزیع فرابوی نسبی و مطلق آلوودگی به ویروس کمبود ایمنی براساس نتایج آزمون PCR در گاوهای کشاورزی در ارتباط با حضور اختلالات بالینی یا آسیب های درشت بینی و آنالیز آماری آنها. * ورم پستان، متربت، اختلالات گوارشی مثل چسبندگی، اسهال، عوارض کبدی، ریوی، از پا فتدگی و لنگش از اختلالات مشاهده شده، بودند.

جمع کل	ندارد	دارد	اختراعات بالینی یا آسیب های درشت بینی × وضعیت آلوودگی
۳۲ (۱۶/۲)	۲۳ (۱۴/۴)	۹ (۲۴/۳)	دارد
۱۶۵ (۸۳/۸)	۱۳۷ (۸۵/۶)	۲۸ (۷۵/۷)	ندارد
۱۹۷ (۱۰۰)	۱۶۰ (۱۰۰)	۳۷ (۱۰۰)	جمع کل
p>0/05			

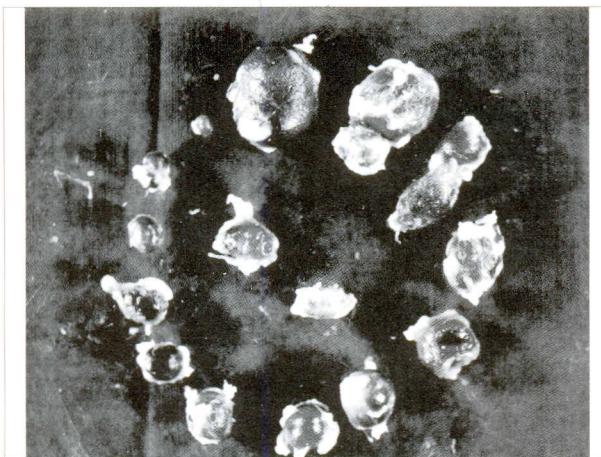
نودها در گاوهای مختلف بصورت توده های کروی یا بیضوی شکل با قوام سفت و به رنگ قرمز تیره تا سیاه به اندازه های متفاوت از قطر ۱/۰ تا ۲/۰ سانتیمتر و به تعداد متغیر از یک تا بیش از ۵۰ عدد، بصورت پراکنده یا در یک ردیف خطی و



تصویر ۳- بزرگ شدن گی همال نودهای ناحیه گردنی رادر یک گاو آلووده BIV نشان می دهد.

عضلات این ناحیه و در برخی موارد در زیر پوست ناحیه تهیگاهی و تنه یا اطراف عقده های لمفاوی پیش رانی و فوق پستانی مشاهده می شدند. این همال





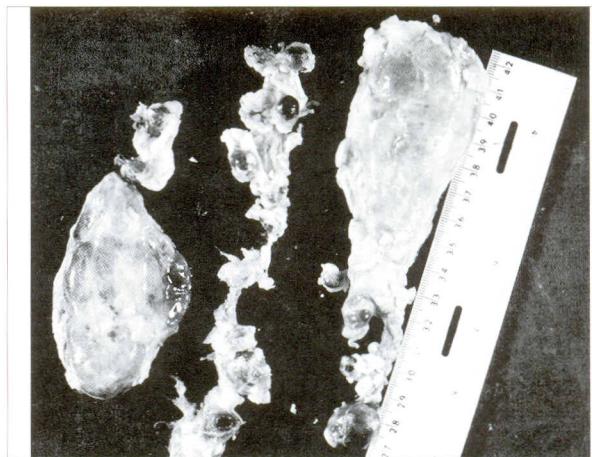
تصویر ۵- همال نودهای موجود در چربی های اطراف عقده لمفاوی پیش کتفی یک گاو آلوده به HIV از این چربی ها جدا سازی شده اند.

مورد(۱۶درصد) راکتیو و مبتلا به لمفادنیت و بقیه(۳ مورد) طبیعی. همچنین یافته های ریزینی در همال نودهای همان گاو های آلوده شامل موارد زیر بودند: ۲ مورد(۳/۳درصد) واحد هیپرپلازی و هیپرتروفی فولیکول های لمفاوی (تصویر۶)، ۳ مورد(۵درصد) مبتلا به تخیله لمفوئیدی فولیکول های لمفاوی (تصویر۷) و ۱مورد(۷/۱۶درصد) طبیعی.

بحث

ویروس کمبود ایمنی گاولنتی ویروسی هست که با توجه به توانائی آن در ایجاد خسارات اقتصادی به صنعت گاوداری پایستی در صنعت پرورش گاو، از مسائل مهم تلقی شده و لذا توجه متناسب رامی طلبید. کنترل آلودگی این ویروس بستگی به فهم چگونگی انتقال و توانائی شناسائی 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 ۱۶/۲درصد می باشد. بیشترین میزان



تصویر ۴- ردیفی از همال نودهای در چربی های اطراف عقده های لمفاوی پیش کتفی یک گاو آلوده به HIV آشکار شده اند.

در موارد کمی بصورت خوشه ای و متراکم دیده می شدند(تصویر۵). ارزیابی شاخص های هماتولوژیک و فلوسایتومتریک: نتایج بررسی هماتولوژیک، فلوسایتومتریک و نتایج آنالیز آماری آن هادر ۱۹۷ راس گاو مورد مطالعه(جمعیت شماره ۱) در جدول ۶، آمده است. البته با حذف گاو های واحد اختلالات بالینی یا آسیب های درشت بینی، به علت احتمال تغییر مقادیر طبیعی فاکتورهای خونی در آن ها و همچنین گاو های واحد لکوسیتوزیس توأم 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).

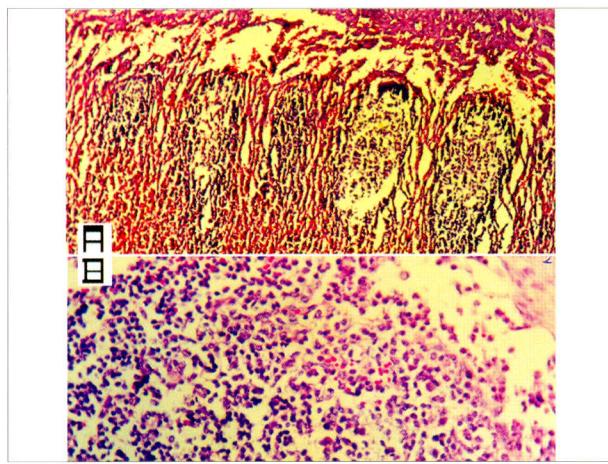
ث- نتایج هیستوپاتولوژی: در بازرسی پس از کشتار، به منظور بررسی هیستوپاتولوژی، ۴۳ راس گاو، مورد نمونه برداری نسجی قرار گرفتند که ۶ راس از آن ها آلوده به ویروس کمبود ایمنی گاو، بودند.

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

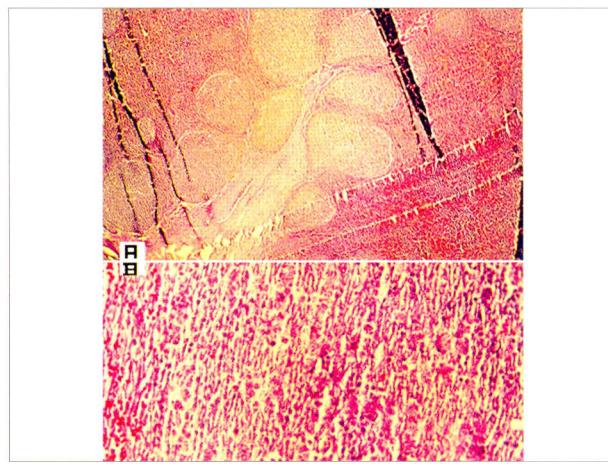
جدول ۶- نتایج ارزیابی شاخص های هماتولوژیک و فلوسایتومتریک در کل گاو های کشتاری آلوده و غیر آلوده و آنالیز آماری آن ها.

P-Value	فاقد آلودگی (n=۱۶۵)			واحد آلودگی (n=۳۲)			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	۲۲	۲۲	۴۳	۳۱	هماتوکریت (درصد)
p>۰/۰۵	۱۵۰۰	۴۶۵۰۰	۱۰۵۰۰	۲۲۵۰	۲۳۷۵۰	۱۰۸۷۵	گلوبول 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	(ZCD21) B لمفوسیت
p>۰/۰۵	۷/۷۸	۵۸	۳۵/۹۵	۰/۲۱	۵۸	۴۲/۱۳	(%CD4) T لمفوسیت
p>۰/۰۵	۶/۱	۶۴/۸	۲۷/۲۴	۳/۳	۴۲/۳	۲۳/۱۵	(ZCD8) T لمفوسیت
۰/۱<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	انوزیتونوفیل (درصد)





تصویر ۷- همال نودهای مبتلا به تخلیه لمفاوی لمفاوی (کاهش تراکم سلول های لمفوئیدی 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 کمبوود ایمنی از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز از نوع نستد استفاده شد و همانند برخی مطالعات دیگر (۸) مشکل مانیزدر بکارگیری این روش، عدم دسترسی به نمونه پلasmid یا نمونه مثبت بود که از کشور کانادا تهیه گردید. شایان ذکر است که با تعیین توالی DNA تکثیر یافته در این بررسی و مقایسه آنها با توالی های موجود در بانک ژن (۴، ۹، ۱۷)، معلوم شد که این قطعه، DNA، مربوط به ژنوم ویروس کمبوود 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 R29 BIV سویه رفرانس (۴) و سویه ۱ (L04974) (۱۷)، به ترتیب تشابه (همولوگی) ۹۸/۷-۹۸/۹ درصدی و ۹۰-۹۹/۷ درصدی وجود داشت (تصویر ۲).

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

تصویر ۶- مشاهدات ریز بنی 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 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 ۲۵-۳۵ درصد (۱۴)، کره ۳۵ درصد (۳)، پاکستان ۸/۱۵ 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 نزوئلا ۲۶-۶۰ 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 ۵-۱۰ درصد (۲۰)، در کشورهای اروپائی از جمله آلمان ۶/۶ درصد، فرانسه ۴ درصد (۱۹)، هلند ۱۱/۴ درصد و ایتالیا ۸/۵ درصد (۲) بوده که در مقایسه با نتایج بدست آمده در بررسی ما، میزان آلودگی پایین 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 فلورسایتوometریک در جمعیت شماره ۲ گاوها مورد مطالعه و آنالیز آماری آنها.

P-Value	(n = ۱۲۴) فاقد آلودگی			(n = ۱۹) وجود آلودگی			شاخص هماتولوژیک یا فلورسایتوometریک
	Min	Median	Max	Min	Median	Max	
p>0/05	۱۵۰۰	۲۸۵۰	۹۷۵۰	۵۰۰۰	۱۶۵۵۰	۱۰۵۰۰	گلوبول های سفید (در میکرو لیتر)
p>0/05	۲۲	۸۱	۵۷	۳۸	۸۰	۵۳	لمفوسيت (درصد)
p>0/05	۱۳	۷۴	۳۸/۵	۱۳	۵۸	۳۹	نوتروفیل (درصد)
p>0/05	۰	۹	۱	۰	۶	۱	مونوسیت (درصد)
p>0/05	۰	۱۴	۲	۰	۱۸	۲	انوزینوفیل (درصد)
p>0/05	۱	۲۳/۸	۶/۳۹	۱/۱۳	۱۷/۹	۸/۷۳	لمفوسيت B (%CD21)
p>0/05	۷/۷	۵۸	۲۵/۰۴	۰/۲	۵۸/۷	۳۹/۸۷	لمفوسيت T (%CD4)
۰/۰۱<p<0/05	۹/۲	۶۴/۸	۲۶/۱۱	۳/۳۶	۳۲/۴۷	۲۰/۸۵	لمفوسيت T (%CD8)
۰/۰۰۱<p<0/۰۰۵	۰/۳	۴	۱/۳	۰	۱۳/۲	۱/۸۰	CD4/CD8



۱۶،۲۲)، که نتایج بررسی حاضر نیز با این موضوع هم راست است. اراس از ۶۴ گاوی که همال نودهای آن‌ها، بزرگ و قابل تشخیص بودند(۵/۲۳، درصد)، آلوده به ویروس BIV تشخیص داده شدند (جدول ۵) بین میزان آلودگی به این ویروس و حضور بالینی همال نودها، رابطه معنی‌داری وجود داشت ($p<0.01$) که این نتیجه همانند یافته‌هایی است که بزرگ شدگی همال نودهار به عنوان یکی از نشانه‌های قابل توجه در گاوهای آلوده‌این ویروس ذکر کرده‌اند (۲۱، ۲۱). در مطالعه‌ای متداولترین یافته پس از کشتار در گاوهای آلوده‌به‌این ویروس رادرگیری عقده‌های لمفاوی بدن دانسته‌اند که تبدیل به همال نودهای گردوبزرگ به رنگ سیاه شده و پایدار درون خود حاوی این همال نودها می‌شوند (۱۶). در این بررسی همال نودهای بزرگ شده، عمدتاً در ناحیه گردن یا هم‌درنایی‌های گردن و هم‌ناحیه تهیگاهی و گاهی پهلوهابصورت قرینه‌قابل ملامسه یا مشاهده بودند. ارتباط معنی‌داری بین میزان آلودگی و ناحیه آناتومیک همال نودهار در معاینه بالینی، مشاهده نشد.

اگر چه در این بررسی، شمارش کل گلbulوں‌های سفید و بویژه درصد لمفوسيت در دامهای آلوده بصورت جزئی، بیشتر از دامهای غیر آلوده بودند، ولی آنالیز آماری نتایج، هیچ اختلاف معنی‌داری را بین شمارش کل گلbulوں‌های سفید، درصد نوتروفیل، لمفوسيت، مونوسیت، اتوژینوفیل، میزان هموگلوبین، درصد هماتوکربت و درصد زیر گروه‌های لمفوسيتی (سلول‌های CD4+، CD8+، CD4+، CD21+)، مابین دوسته از گاوهای آلوده و غیر آلوده‌به‌این ویروس، نشان ندادند ولذا نتایج این مطالعه، با گزارشاتی که حاکی از ایجاد لمفوسيتوزیس (موقعی) در گاوهای آلوده به این ویروس، می‌باشند (۶، ۲۵، ۲۷). در این مورد مخواهی ندارد. با این حال نسبت سلول‌های CD4+ به CD8+ در گاوهای آلوده نسبت به غیر آلوده، افزایش معنی‌داری داشت ($p<0.01$) که عمدتاً بدلیل کاهش قابل توجه درصد سلول‌های CD8+ در دامهای آلوده بوده‌این وضعیت در رابطه با جمعیت شماره ۲ نیز، مصدق داشت ($p<0.005$) (۶، ۷). منشأ لمفوسيتوزیس گزارش شده در مطالعات مختلف، افزایش هردو نوع لمفوسيت‌های T و B (۶)، افزایش لمفوسيت‌های B یا افزایش لمفوسيت‌های T گزارش گردیده که نوع سلول‌های T افزایش یافته (T کمکی یا T سایپرسور) مشخص نشده‌اند (۲۹)، در این بررسی نه تنها هیچ کدام از لمفوسيت‌های T یا B، در دامهای آلوده افزایشی را نشان نمی‌دادند، بلکه لمفوسيت‌های 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 گاوهای، مشخص گردید که هیچ اختلاف معنی‌داری در درصد این سلول‌ها و نسبت CD4+/CD8+ در گاوهای آلوده و غیر آلوده با وجود ندارد. همانند این بررسی، مطالعاتی مختلفی نیز هستند که نشان می‌دهند در آلودگی گاوهای گوساله‌های این ویروس چه پس از سپری شدن مدت زمان کوتاه‌پس از آلودگی (۲) یامدت زمان طولانی مثلاً ۵ سال (۶)، در هیچ کدام از شاخص‌های خونی وزیر گروه‌های لمفوسيتی، تغییر معنی‌داری در مقایسه با دام‌های کنترل منفی ایجاد نمی‌شود (۶، ۲۴، ۲۹). در حالی که برخلاف نتایج

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

در این بررسی، اختلاف میزان آلودگی بین جنس نر و ماده معنی‌دار نبود (جدول ۳). البته در مقایسه بین گاوهای شیری ماده با گاوهای نرتخمی در چند مطالعه محدود، میزان آلودگی در گاوهای نرتخمی بیشتر گزارش شده است از جمله در کانادا و ایتالیا میزان وقوع آلودگی در گاوهای نرتخمی 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 گوشتشی، وقوع آلودگی به این ویروس در گاوهای گوشتشی پائین تراز گله‌های شیری بوده است که احتمالاً 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 سیپی نشان داده شد که میزان آلودگی با افزایش سن گاوها افزایش معنی‌داری می‌باشد (۲۴). با اینحال علیرغم این‌که در این بررسی در تجزیه و تحلیل کلی همه گروه‌های سنی با هم‌دیگر رابطه معنی‌داری 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 صفر الی سه زوج دندان بالغ تقریباً در یک سطح بوده که پس از آن، در سن چهار زوج دندان، افزایش معنی‌داری ($p<0.05$) 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 ولذا وقوع آلودگی به این ویروس و نشانه‌های بالینی حاصله نیز اصولاً باید در دامهای مسن بیشتر باشد (۲).

ارتباط معنی‌داری بین آلودگی گاوهای این ویروس و درجه وضعیت بدنی آن هامشاهده 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 ارتباط معنی‌داری بین میزان آلودگی گاوهای حضور اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت بینی و همچنین واکنش ظاهری عقده‌های لمفاوی در آن هامشاهده 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 گاوهای، مستند نکرده و نقش آن را در ایجاد بیماری در گاو، نامعلوم اعلام می‌نمایند (۲۰، ۲۴). با این‌که در برخی بررسی‌ها، درجات متفاوت لمفادنوياتی عمومی یا موضعی را در این آلودگی ذکر کرده‌اند (۱، ۲۱) ولی عموماً معتقدند که هیچ ارتباط معنی‌داری بین واکنش و بزرگ شدگی عقده‌های لمفاوی و آلودگی به این ویروس، وجود ندارد (۲۳،



References

- Andrews, A. H., Blowy, W., Boyd, H., Eddy, R. G. (2003) Bovine medicine. (2thed.) Blackwell Science Ltd. Oxford, UK.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Herds of Moscow Region and Stavropol Krai, Russian Agri. Sci. 1: 54-56.
- Lew, A. E., Back, R. E., Miles, J., Cuttell, 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 probes. *J. Virol. Meth.* 116: 1-9.
- 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 آلووده کردن تجربی گاوها با BIV، لمفوئیت های کاکا هش می یابند (۲۰، ۲۲)، وضعیت اخیر نشان دهنده آنست که اختلال عملکرد سیستم ایمنی در گاو دقیقاً مثل اثروویروس HIV می باشد. احتمالاً این تغییرات و کاهش سلول های ایمنی در اوایل آلوودگی به ویروس کمبود ایمنی گاو مشهود می باشند (۶، ۲۱). در عقده های لمفاوی و همال نوده ای نمونه برداری شده از گاو های آلووده به ویروس BIV، هیپرپلازی و هیپرتروفی فولیکول های لمفاوی (در ۳/۳ درصد) و تخلیه لمفوئیدی فولیکول های لمفاوی (در ۵/۵ درصد) مشخص گردیدند. در گزارش های مختلف نیز در آلوودگی گاو ها با این ویروس عمدتاً به این دونوع 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 آلوودگی، انفاق می افتدند، طوری که در مراحل اولیه آلوودگی، هیپرپلازی اولیه لمفوئیدی در نسوج لمفاوی از جمله عقده های لمفاوی و همال نوده ای در مراحل بعدی و انتهائی آلوودگی 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 گاو های هلشتاین کشتار شده در استان تهران، واحد آلوودگی نسبتاً بالا نیز توالي نوکلئوتیدی و ویروس درگیر در ایران، تقریباً این میزان آلوودگی بالا و نیز توالي نوکلئوتیدی و ویروس درگیر در ایران، متشابه برخی کشور های دیگر آسیائی، افریقائی و امریکای جنوبی، می باشد. دوماً بزرگ شدگی همال نوده ای بدن گاو های آلووده با این ویروس، معنی دار بوده و همچنین نسبت سلول های CD4+ به CD8+ در علاوه بر خصوصیات گسترش ده دیگر روی گاو های صنعتی و بومی کشور به منظور مشخص کردن وضعیت آلوودگی با این ویروس، در طی یک مطالعه نسبتاً مدت دارد رستح دامداری های آلووده نیز، ارتباط بین نشانه های بالینی گزارش شده و آلوودگی و همچنین میزان خسارات اقتصادی احتمالی ایجاد شده بررسی گردد. شایان ذکر است که با توجه به اهمیت ویروس کمبود ایمنی گاو در ایجاد اختلال در سلامتی گاو و امکان پره بره گیری از آلوودگی گاوها به این ویروس، به عنوان یک مدل حیوانی در عفونت با ویروس ایدز انسان، نیاز به تحقیقات بسیار زیادتری در خصوص اثرات آلوودگی 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 می شود. بعلاوه نگارندهای از رزمات آقایان مظاہری، 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 تشکرمی 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., Vsui, 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., Lyons, R., Venables, C., Horigan, M., Jeffery, M., Dawson, M. (1998) Lymphadenopathy and non-suppurative meningo-encephelitis 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.* (10th ed.) 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., Pruitt, 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. Surarez, 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 HOLSTEIN 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

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

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

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

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

⁵Department 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+ 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- hypertrophy 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

