Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸، دوره ۶۴، شماره ۲، ۱۵۶-۱۴۷

بررسی کشتارگاهی میزان شیوع آلودگی به ویروس لوکوز آنزئوتیک گاو و اختلالات بالینی، هماتولوژیک و فلوسایتومتریک همراه در گاوهای هلشتاین در تهران

محمد طلوعی[1]* تقی تقی پور بازرگانی[2] غلامرضا نیکبخت بروجنی[3] زهره خاکی[2] سعید بکائی[4] ایرج اشرافی[3]

۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز - ایران.
۲) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) گروه میکرو بیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۴)بخش اپیدمیولوژی گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۸ بهمن ماه ۱۳۸۵ ، پذیرش نهایی: ۷ خرداد ماه ۱۳۸۶)

چکیده

ویروس لوکوزگاوی، رتروویروسی هست که بصورت اولیه نسوج لمفاوی گاو را درگیر می کند. به منظور مشخص نمودن وضعیت آلودگی با این ویروس در گاوها و تاثیر آن روی برخی شاخص‌های بالینی، هماتولوژیک و فلوسایتومتریک، این تحقیق، روی ۱۹۷ راس گاو هلشتاین ذبحی در یک کشتارگاه صنعتی در تهران انجام گرفت. نتیجه انجام آزمون الایزا gp51 روی نمونه های سرمی اخذشده از دام های مذکور، حاکی از واکنش سرمی مثبت در ۲۲/۳ درصد از گاوهای مورد این مطالعه بود. تنظیم یافته ها بر پایه سن، نشان داد که ارتباط معنی داری بین میزان آلودگی به این ویروس و افزایش سن وجود دارد ($p<0/005$ و $p<0/001$). تفاوت معنی‌داری بین میزان آلودگی در دام‌های واجد انواع اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت بینی و گاوهای به ظاهر سالم وجود داشت ($p<0/005$ و $p<0/001$). بین میزان آلودگی به این ویروس با جنسیت و درجه وضعیت بدنی دامها رابطه آماری معنی داری مشاهده نشد. بعد از حذف گاوهای واجد انواع اختلالات بالینی یا آسیب های درشت بینی و همچنین دام‌های استرس دار، به علت احتمال تغییرات ثانویه در شاخص های خونی آنها، درگاوهای آلوده تعداد کل گلبول‌های سفید بیشتر ($p<0/05$ و $p<0/01$) و درصد لمفوسیت‌های T(CD4+)، کمتر ($p<0/05$ و $p<0/01$) از دام‌های غیرآلوده بود. همچنین در دام‌های آلوده، ارتباط معنی دار مثبتی بین تعداد لمفوسیت‌های B(CD21+) با تعداد مطلق گلبول‌های سفید و درصد کل لمفوسیت‌ها، مشاهده گردید. مطالعه حاضر، شیوع بالای آلودگی با ویروس لوکوزگاو در دامهای مورد بررسی و درصد پائین سلول های CD4+ درگاوهای آلوده به این ویروس نسبت به دام‌های غیر آلوده را نشان داد..

واژه‌های کلیدی: ویروس لوکوز انزئوتیک، گاو هلشتاین، آزمون الایزا، متغیرهای خونی، فلوسایتومتری.

مقدمه

لوکوز آنزوئتیک گاو، عفونتی سیستمیک می‌باشدکه توسط ویروسی از جنس دلتا رتروویروس متعلق به خانواده رتروویریده ایجاد می‌شود(۲۳،۲۷). ژنوم این ویروس، RNA تک رشته ای خطی سنس مثبت به صورت دیپلوئید با دو رشته معکوس بوده که ۱۰-۷ کیلوباز اندازه دارد(۲۳). اولین بار بیماری، در اروپای شرقی در سال ۱۹۰۰ گزارش شد. چگونگی پیدایش تومور از ۱۹۱۲ مورد توجه قرار گرفت ولی تا ۱۹۶۹ هنوز عامل بیماری نا مشخص بود و تنها آن را به عنوان یک بیماری عفونی می‌شناختند ولی در ۱۹۶۹ ویروس عامل بیماری تحت عنوان ویروس لوکوز گاو، شناسایی گردید(۱۳). آلودگی به این ویروس با ورود آن به ژنوم سلول های میزبان دنبال شده و با وجود، تولید پادتن در بدن، این آلودگی تا آخر عمر، ماندگار می‌گردد(۱۲،۲۳). ویروس لوکوز، لمفوسیت‌ها را آلوده کرده و سبب تکثیر، تزاید ورشد نئوپلاستیک آنها می‌شود که اغلب ارگان های بدن را درگیر می‌کنند(۱۵،۲۳). تومورها در این بیماری ممکن است در عقده‌های لمفاوی محیطی شکل گرفته یا به ارگان های داخلی بدن محدود گردند(۲۷). توموری شدن بافت‌ها در این بیماری در گاو تحت اسامی مختلفی مانند لوکوز، لمفوسارکوم و لمفومای بدخیم شناخته می‌شود(۲۳). لوکوز گاو به دو صورت انفرادی و واگیردار تعریف شده که صورت دوم آن به لوکوز آنزئوتیک گاو معروف است که شکل معمول بیماری درگاوهای بالغ بوده و با انتقال لمفوسیت های آلوده از یک دام به دام دیگر سرایت می‌کند و می‌تواند با پاسخ پادتن در تمام دام‌های آلوده و در موارد کمتر (در حدود ۳۰-۲۰ درصد گاوان آلوده) شکل‌گیری لمفوسیتوزیس پایدار و در حدود ۵ درصد موارد با لمفوسارکوم و نئوپلازی که کشنده‌ترین شکل و مرحله نهایی عفونت با این ویروس می باشد خود نمایی کند(۱،۲۷). لوکوز انفرادی گاوان می‌تواند به شکل لوکوز دام‌های جوان در گوساله‌های زیر ۶ ماه، لوکوز تیموسی دام‌های زیر دو سال یا لوکوز پوستی گاوهای ۱ تا ۳ سال تظاهر نماید(۲۷). ابتلا یک دام به بیماری و بروز اشکال متفاوت بالینی آن به ژنتیک و عملکرد سیستم ایمنی او و مقدار ویروس وارد شده به بدن بستگی دارد(۳۵). گاوهای واجد تیتر پادتن علیه ویروس لوکوز، به عنوان منابع ویروس تلقی می‌گردند چرا که گاوهای آلوده در طول عمر خود ویروس را در لمفوسیت‌های محیطی خود حمل می‌نمایند (۱،۲۷). روش‌های انتقال بیماری بصورت افقی از طریق تماس‌های بسیار نزدیک فیزیکی، مواد یا وسایل آلوده به خون، از جمله: سرنگ‌های آلوده، وسایل کمکی زایشگاه، لوازم شاخ بری، دستکش‌های معاینه از راه راست روده‌ای و عمودی شامل جابجایی ویروس از مادر آلوده به جنین یا مصرف ماک و شیر مادر آلوده، عمده‌ترین راه‌های انتقال بیماری هستند. ویروس در لمفوسیت‌ها موجود بوده و لذا در شیر، خون، توده‌های توموری، ترشحات واژنی، جفت و ترشحات اکسودایی

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۴۲۷۵۱۷-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email :Tolouim@Vetmed.ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

یافت می‌شود(۱۵،۲۷). مطالعات ثابت نموده است که لمفوسیت‌های B، بویژه آنهایی که منشاء ایمنوگلوبولین M هستند، هدف اصلی ویروس لوکوز می‌باشند(۱). بیشتر دام‌های آلوده به لوکوز، فاقد نشانه بالینی بوده و می‌توان آنها را با روش‌های سرولوژی تشخیص داد(۱۲،۲۵). لوکوز خسارات زیادی به صنعت گاو شیری وارد می‌کند، طوری که عفونت مزمن آن به تنهایی سبب کاهش تولید، کاهش راندمان تولید مثلی، کاهش طول عمر مفید گاو، محدودیت در صادرات گاو یا تولیدات آن و افزایش هزینه‌های دامپزشکی می‌گردد(۱۶،۲۵). درگذشته قبل از شناسایی ویروس عامل وارایه روش‌های تشخیص آزمایشگاهی مطمئن، تنها ابزار تشخیص دام‌های آلوده، روش‌های هیستوپاتولوژیک وهماتولوژیک بودند در حالی که امروزه از روش‌های سرولوژیک از جمله ایمنودیفوزیون روی ژل آگارز(AGID)، رادیو ایمنواسی(RIA)، الایزا (ELISA)، ایمنوپراکسیداز (PLA)، وسترن بلاتینگ(WB)، خنثی سازی ویروس(VN) ویا واکنش زنجیره‌ای پلی مراز(PCR) استفاده می‌کنند (۱،۴،۱۶،۲۲،۳۱،۳۶). برای جدا سازی ویروس ازلمفوسیت‌های آلوده، باید ویروس درسلول‌های طحال بره کشت داده شده و در صورت رشد، با روش‌هایی چون پادتن فلورسنت(FA)، میکروسکوپ الکترونی، الایزا یا رادیوایمنواسی، مشخص گردد، البته با توجه به گران تمام شدن آزمایش کشت بافت، معمولا آزمایش‌های سرمی ترجیح داده می‌شوند(۶،۲۲،۳۱). از آنجایی که هیچ واکسن یا درمان قابل دسترسی(حداقل در ایران) برای این بیماری وجود ندارد لذا کنترل و ریشه‌کنی موثر بیماری، با تشخیص سریع عفونت و حذف یا جداسازی گاوهایی که نسبت به این ویروس، پاسخ پادتنی مثبت دارند، امکان پذیراست(۱،۲۷) در نتیجه بررسی‌های سرولوژیکی، زمینه‌های اساسی برنامه‌ریزی موثر ریشه کنی بیماری را فراهم می آورند(۲)، با این حال موفقیت چنین برنامه‌های کنترلی و ریشه کنی به حساسیت و ویژگی تست‌های سرولوژی بکار برده شده، بستگی دارد(۲،۵،۸). روش ایمنودیفوزیون روی ژل آگار، ساده‌ترین روش سرولوژیکی بوده و بطور وسیعی مورد استفاده قرار گرفته است(۲،۶،۲۶،۳۶) با این حال در شناسایی پادتن‌های نمونه‌های سرم یا شیری که در مراحل اولیه عفونت دام گرفته می‌شوند، حساسیت کافی ندارد(۲) و در برخی از گاوهای سرم مثبت نیز پس از سپری شدن مدتی، احتمالا به علت تغییرات پادگنی ویروس، ردیابی پادتن به این روش امکانپذیر نخواهد بود(۶،۲۲،۳۱). اخیرا روش الایزا برای ارزیابی انفرادی و همچنین مقادیر زیاد نمونه‌های سرم یا شیر، جهت جستجوی پادتن‌های ضد ویروس لوکوز گاو، روشی سریع، حساس و مطمئن معرفی می‌گردد(۱،۲،۴،۳۶). P24 و gp51 اصلی ترین پادگن‌های دخیل در روش‌های تشخیص سرولوژی این ویروس، می‌باشند(۶) بکارگیری پادگن gp51 در سیستم الایزا در مقایسه با استفاده از پادگن P24، حساسیت و ویژگی بسیار بهتری را ارائه می‌نماید و با توجه به اینکه پادتن‌های ضد gp51 چندروز زودتر از p24 درخون ظاهر می‌شوند، با ردیابی این پادتن‌ها، بروز عفونت زودتر مشخص خواهد شد(۱۹). در مطالعات مختلفی که با روش فلوسایتومتری و با استفاده از پادتن‌های منوکلنال لکوسیتی انجام گرفته است، علاوه بر تغییرات لمفوسیت‌های B از جمله سلول‌های CD21+، تغییرات زیر گروه‌های لمفوسیت‌های T از جمله سلول‌های CD4+ و CD8+ نیز در گاوهای آلوده به ویروس لوکوز، نشان داده شده است، با این حال هنوز هم توزیع زیر گروه‌های لمفوسیتی، بویژه لمفوسیت‌های T در گاوهای آلوده به این ویروس به روشنی مشخص نشده است(۱۱،۳۲،۳۸).

هدف از این مطالعه که برای اولین بار در ایران در یکی از کشتارگاه‌های استان تهران انجام گردید، علاوه بر تعیین میزان شیوع آلودگی به ویروس عامل لوکوز در گاوهای هلشتاین کشتار شده، به روش سرولوژی الایزا gp51، بررسی اختلالات بالینی، آسیب‌های درشت بینی همراه، تغییرات شاخص‌های مختلف خونی و همچنین فلوسایتومتری (فراوانی نسبی برخی زیر گروه‌های لمفوسیت‌های T و B) در گاوهای آلوده و غیر آلوده مورد مطالعه بود.

مواد و روش کار

الف- دام‌های مورد مطالعه و نمونه گیری: حداقل تعداد نمونه بر اساس سطح اطمینان ۹۵ درصد و میزان شیوع در منابع بررسی شده و دقت(حد اشتباه) ۶درصد، ۱۸۰ نمونه تعیین گردید. نمونه‌های خونی مورد نیاز برای انجام این تحقیق، در فاصله زمانی اوایل پاییز تا اواخر زمستان ۱۳۸۴، از ورید وداجی، ۱۹۷گاو هلشتاین کشتار شده در کشتارگاه میثم تهران در پنج گروه سنی واجد صفر الی چهار زوج دندان بالغ بصورت تصادفی خوشه‌ای، به تعداد تقریبا مساوی در هر گروه سنی تهیه شد. برای هر دام، سرنگ وسوزن نو استفاده می‌شد. جهت تهیه سرم، نمونه‌های خونی در لوله‌های و نوجکت بدون ماده ضد انعقاد و به منظور مطالعه هماتولوژیک و فلوسایتومتری در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد اتیلن دی آمین تترااستیک اسید(EDTA) جمع‌آوری می‌شدند. درمعاینه قبل از کشتار و بازرسی لاشه، مشخصات دام‌ها از جمله سن(تعداد زوج دندان بالغ)، جنس، درجه وضعیت بدنی (B.C.S) و وجود هر گونه اختلال بالینی از جمله زمین‌گیری، لنگش، ورم پستان، اسهال، یا آسیب‌های مختلف درشت بینی در دستگاه‌های ادراری-تناسلی، کبدی- گوارشی، تنفسی، عضلانی-اسکلتی ثبت می‌گردید. گاوهای مورد مطالعه از لحاظ درجه وضعیت بدنی درسه گروه لاغر، متوسط و چاق، به ترتیب با وضعیت بدنی ۲-۱، ۳/۵-۲/۵ و ۵-۴ تقسیم‌بندی شدند. علاوه بر بررسی شاخص‌های خونی و فلوسایتومتری درگاوهای آلوده و غیرآلوده درکل جمعیت ۱۹۷ راسی مورد مطالعه (جمعیت شماره۱)، با حذف گاوهای واجد اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت بینی، به علت احتمال تغییرمقادیر طبیعی فاکتورهای خونی در آنها و همچنین گاوهای واجد لکوسیتوزیس توام با نوتروفیلی به عنوان دام‌های استرس‌دار (۲۷) از کل جمعیت، شاخص های خونی حائز اهمیت در بیماری لوکوز گاوان از جمله تعداد کل لکوسیت‌ها، درصد لمفوسیت، نوتروفیل و نتایج فلوسایتومتری در جمعیت ۱۴۳ راسی باقی مانده (جمعیت شماره۲)، مجددا مورد مطالعه قرار گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID

ب- بررسی سرولوژی: برای شناسایی پادتن‌های ضد ویروس لوکوز در خون محیطی گاوهای مورد مطالعه، از آزمایش الایزا استفاده گردید. برای این منظور تمام نمونه‌ها با کیت الایزای gp51 ویروس لوکوز، ساخت شرکت سووانوویر سوئد مورد آزمایش قرار گرفتند. با این روش، پادتن‌های اختصاصی gp51 ویروس لوکوز در سرم یا شیر دام‌های آلوده، قابل تشخیص هستند. گوده های پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا، قبلا با پادگن‌های gp51 ویروس پوشیده شده‌اند. نمونه‌های سرم مورد آزمایش و سرم‌های مرجع منفی و مثبت پس ازرقیق سازی به نسبت ۴به۱۰۰ با محلول بافر توئین PBS (محلول نمکی بافر فسفات حاوی ۰/۲درصد توئین ۲۰ و ۰/۰۰۱ درصد تیومرسال) به میکرو پلیت های الایزا اضافه شدند. میکرو پلیت های ستون‌های فرد با پادگن gp51 ویروس لوکوز و ستون‌های زوج با پادگن کنترل منفی پوشیده شده‌اند. بدنبال انکوباسیون پلیت الایزا در انکوباتور ۳۷درجه سانتیگراد به مدت ۱ساعت و سه مرتبه شستشوی میکروپلیت ها با محلول رقیق کننده، ابتدا آنتی گلوبولین کونژوگه گاوی با پراکسیداز و سپس محلول سوبسترا (تتراتمیل بنزیدین محلول در بافر حاوی پراکسید هیدروژن) به تمام میکرو پلیت ها اضافه گردیده و با تاثیر کونژوگه آنزیم روی سوبسترا، تغییر رنگ ایجاد شد. با افزودن محلول متوقف کننده (اسید سولفوریک ۴ نرمال) به هر گوده، رنگ‌های تولیدی قابل مشاهده یا قابل قرائت با دستگاه فتومتر خواهند بود. جذب‌های نوری ایجاد شده با استفاده ازدستگاه قرائت کننده الایزا مدل Stat fax 2100, USA روی طول موج ۴۵۰نانومتر، قرائت شدند. با مشخص شدن میزان جذب نوری تمام سرم‌ها و نمونه کنترل مثبت و با استفاده از فرمول خاص موجود در دستورالعمل کارخانه سازنده کیت، نتایج آزمون الایزا مبنی بر مثبت یا منفی بودن نمونه‌ها، مشخص گردیدند.

پ- بررسی هماتولوژی: شمارش تعداد کل گلبول‌های سفید و تعیین فراوانی نسبی انواع آنها بصورت دستی و بروش استاندارد (۱۸) روی لام توما و گسترش‌های خونی تهیه شده انجام گرفت. میزان هموگلوبین نمونه‌ها با افزودن محلول درابکین به خون کامل و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر Jenway مدل ۶۱۰۰ و درصد هماتوکریت با بهره‌گیری از لوله‌های موئین و دستگاه سانتریفوژ میکرو هماتوکریت مدل Hawksley، سنجیده شدند.

ت- پادتن‌های منوکلونال و بررسی فلوسایتومتری (Flow Cytometry): پانلی ازپادتن های منوکلونال کونژوگه موشی (antibovine:FITC Mouse) شامل: MCA1653F (ضدگیرنده‌های CD4 گاو)، MCA837F (ضدگیرنده‌های CD8 گاو) و MCA1424F (ضد گیرنده‌های CD21 گاو)، به عنوان پادتن‌های اصلی و دو نوع پادتن منوکلونال کونژوگه (CD21 CO.- و Mouse IgG2 negative control CD4,8 CO.-) به عنوان پادتن‌های کنترل منفی، تهیه شده از شرکت Serotec انگلستان، استفاده شدند. این پادتن‌ها، ایمنوگلوبولین G خالص شده موشی (IgG2) کونژوگه با فلورسین ایزوتیوسیانات (FITC) می‌باشند. ویژگی این پادتن‌های منوکلونال، در بررسی‌های مختلفی، مورد تائید قرار گرفته است (۹،۳۴). لیز گلبول‌های قرمز، آماده سازی نمونه‌ها و رنگ آمیزی ایمنوفلورسنت سلول‌ها با استفاده از کیت تهیه شده از شرکت Daco Cytomation امریکا، و دستورالعمل ارائه شده آن انجام گردید: پس از اضافه کردن نمونه‌های خون تازه واجد ماده ضدانعقاد به هر یک از پادتن‌های منوکلنال کونژوگه CD4, CD8, CD21 و کونژوگه‌های کنترل منفی CD21 CO.- و CD4,8 CO.- در لوله‌های مخصوص پلی استیرنی و لیز گلبول های های قرمز خون با بکارگیری محلول لیز A و B، با سانتریفوژ نمودن نمونه‌ها در دور ۳۰۰×g، گلبول های سفید در ته لوله‌ها رسوب و با دوبار شستشوی آنها با محلول ایزوتونیک PBS و هربار ۱۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی، سلول‌های سفید نشاندار شده با پادتن‌های منوکلونال کونژوگه، بدست می‌آیند که با اضافه نمودن محلول فیکساتور (PBS و پارافرمالدئید به نسبت ۱:۶۰)، سلول‌ها، ثابت شده و در دمای ۴درجه سانتیگراد نگهداری شده و حداکثر تا ۲۴ ساعت آنالیز فلوسایتومتری انجام می‌گردید. با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری Becton Dickinson آمریکایی با تکنیک FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) و با کمک نرم افزار آنالیز فلوسایتومتری WinMDI، لمفوسیت‌های هدف از جمله: CD4+ (Tکمکی)، CD8+ (Tسرکوبگر، سیتوتوکسیک)، CD21+ (سلولهای B)، شناسایی و شمارش 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 می‌داد و با مشخص نمودن نواحی منطبق با پادتن‌های کنترل به عنوان ناحیه زمینه‌ای فلورسنس (M1) و نواحی مازاد (M2)، محاسبه می‌شد.

ث- تجزیه وتحلیل آماری: بررسی آماری نتایج با استفاده از نرم افزار spss و بکارگیری آزمون مربع کای با سطح اطمینان ۹۵درصد برای سنجش ارتباط بین متغیرهای سن، حضور اختلال بالینی یا آسیب‌های درشت بینی، درجه وضعیت بدنی و جنس با نتیجه آلودگی و آزمون t نمونه‌های مستقل، برای ارزیابی ارتباط بین شاخص‌های خونی و فلوسایتومتری با نتیجه آلودگی، انجام گردید. قبل از انجام آزمون t، با بکارگیری آزمون کولموگرو اسمیرنو از نرمال بودن توزیع داده‌ها، اطمینان حاصل می‌شد. برای ارزیابی میزان همبستگی بین متغیرهای خونی و فلوسایتومتری از ضریب همبستگی پیرسون و آزمون اختلاف ضریب همبستگی با عدد صفر، استفاده گردید.

نتایج

الف- میزان آلودگی به ویروس لوکوز در گاوها: نتایج آزمایش ۱۹۷ نمونه سرمی اخذ شده در این مطالعه، با آزمون الایزا gp51، در جدول ۱ آمده است.

ب- ارتباط بین سن، جنس و درجه وضعیت بدنی با میزان آلودگی: توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به ویروس لوکوز براساس نتایج حاصل از آزمون الایزا gp51 در گروه‌های سنی، جنسی و درجات مختلف وضعیت بدنی گاوهای مورد مطالعه و همچنین نتایج تجزیه و تحلیل آماری آنها در جدول ۲ خلاصه شده است.

پ - ارتباط بین حضور اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت بینی با

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به ویروس لوکوز بر اساس نتایج حاصل از آزمون الایزا gp51 در گاوهای مورد مطالعه.

آلودگی به ویروس	فراوانی	درصد
دارد	۴۴	۲۲/۳
ندارد	۱۵۳	۷۷/۷
جمع	۱۹۷	۱۰۰

جدول ۲- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به ویروس لوکوز بر اساس نتایج حاصل از آزمون الایزا gp51 در گروه‌های سنی، جنسی و درجات مختلف وضعیت بدنی در گاوهای مورد مطالعه.

سن			درجه وضعیت بدنی			جنس		
زوج دندان بالغ	جمع نمونه	فراوانی مطلق و نسبی دام‌های آلوده	BCS	جمع نمونه	فراوانی مطلق و نسبی دام‌های آلوده	جنس	جمع نمونه	فراوانی مطلق و نسبی دام‌های آلوده
۰	۳۸	۶ (۱۵/۸درصد)	۱-۲	۲۴	۹ (۳۷/۵ درصد)	نر	۴۵	۹ (۲۰ درصد)
۱	۳۶	۳ (۸/۳درصد)						
۲	۴۰	۷ (۱۷/۵درصد)	۲/۵-۳/۵	۱۲۴	۲۲ (۱۷/۷ درصد)			
۳	۴۲	۱۳ (۳۱درصد)	۴-۵	۴۹	۱۳ (۲۶/۵ درصد)	ماده	۱۵۲	۳۵ (۲۳ درصد)
۴	۴۱	۱۵ (۳۶/۶درصد)						
جمع	۱۹۷	۴۴ (۲۲/۳درصد)	جمع	۱۹۷	۴۴ (۲۲/۳درصد)	جمع	۱۹۷	۴۴ (۲۲/۳درصد)
۰/۰۰۱<p<۰/۰۰۵			p>۰/۰۵			p>۰/۰۵		

جدول ۳- توزیع فراوانی نسبی و مطلق آلودگی به ویروس لوکوز با آزمون الایزا gp51 در گاوهای کشتاری در ارتباط با حضور اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت بینی و آنالیز آماری آنها.

اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت بینی / آلودگی	دارد	ندارد	جمع کل
دارد	۱۵ (۴۰/۵درصد)	۲۹ (۱۸/۱درصد)	۴۴ (۲۲/۳درصد)
ندارد	۲۲ (۵۹/۵درصد)	۱۳۱ (۸۱/۹درصد)	۱۵۳ (۷۷/۷درصد)
جمع کل	۳۷ (۱۰۰درصد)	۱۶۰ (۱۰۰درصد)	۱۹۷ (۱۰۰درصد)
آنالیز آماری	۰/۰۰۱<p<۰/۰۰۵		

میزان آلودگی: فراوانی نسبی و مطلق آلودگی به ویروس لوکوز در گاوها در ارتباط با حضور اختلالات بالینی یا آسیب های درشت بینی و آنالیز آماری آنها در جدول ۳ خلاصه شده است.

ت- ارزیابی شاخص های هماتولوژیک و فلوسایتومتریک درجمعیت شماره۱: نتایج بررسی هماتولوژیک، آنالیزفلوسایتومتری از جمله: درصد زیر گروه‌های CD4+, CD8+, CD21+ لمفوسیت‌ها و نتایج تجزیه و تحلیل آماری آنها در۱۹۷راس گاو آلوده و غیر آلوده به ویروس لوکوز(جمعیت شماره۱) در جدول۴، آمده است.

جدول ۴- نتایج حاصل از شمارش کلی و تفریقی گلبول های سفید، ارزیابی سایر شاخص های هماتولوژیک و بررسی فلوسایتومتریک لمفوسیت‌ها در کل گاوهای کشتاری و تجزیه و تحلیل آماری آنها در گاوهای آلوده و غیر آلوده به ویروس لوکوز.

شاخص هماتولوژیک یا فلوسایتومتریک	واجد آلودگی با الایزا (n=۴۴)			فاقد آلودگی با الایزا (n=۱۵۳)			آنالیز آماری
	Mean± SE	Min	Max	Mean± SE	Min	Max	
هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	۱۲/۴۹±۰/۵۲	۶/۸	۲۵/۶	۱۱/۶۳±۰/۱۹	۶/۸	۱۸/۵	p>۰/۰۵
هماتوکریت(درصد)	۳۱/۴۰±۰/۸۲	۲۱	۴۵	±۰/۴۱ ۳۲/۳۷	۲۰	۴۶	p>۰/۰۵
شمارش لکوسیت (درمیکرولیتر)	±۱۲۳۶ ۱۳۰۰۲/۲۷	۳۲۵۰	۴۶۵۰۰	±۳۷۰/۷ ۱۱۱۴۸/۳۷	۱۰۰۰	۲۷۵۰۰	p>۰/۰۵
لمفوسیت(درصد)	±۲/۲۷ ۵۳/۹۵	۱۶	۸۰	۵۲/۶۶±۱/۱۵	۲۲	۹۰	p>۰/۰۵
لمفوسیت CD21 B)درصد)	۷/۱۷±۰/۹	۰/۵	۲۵/۴	۶/۸±۰/۴	۱	۲۳/۸	p>۰/۰۵
لمفوسیت r(CD4 helpe Tدرصد)	۳۴/۲±۱/۹	۸/۹	۵۶/۴	۳۶/۵±۰/۸	۰/۲	۵۸	p>۰/۰۵
لمفوسیت CD8). T supp درصد)	۲۵/۷±۱/۷	۳/۳	۴۴/۹	۲۷/۹±۰/۸	۹/۲	۶۴/۸	p>۰/۰۵
نوتروفیل(درصد)	±۲/۲۷ ۴۳/۱۶	۱۴	۸۳	۴۳/۱±۱/۲۱	۵	۷۶	p>۰/۰۵
مونوسیت(درصد)	۱/۸۴±۰/۲۷	۰	۷	۱/۷۹±۰/۱۴	۰	۱۰	p>۰/۰۵
ائوزینوفیل(درصد)	۱/۷±۰/۳	۰	۸	۲/۳۴±۰/۲۱	۰	۱۸	p>۰/۰۵

جدول ۵- نتایج حاصل از شمارش کلی و تفریقی گلبول‌های سفید و بررسی فلوسایتومتریک لمفوسیت‌ها در جمعیت شماره ۲ گاوهای مورد مطالعه و تجزیه و تحلیل آماری آنها در گاوهای آلوده و غیر آلوده به ویروس لوکوز.

شاخص هماتولوژیک یا فلوسایتو متریک	واجد آلودگی با الایزا (n=۲۵)			فاقد آلودگی با الایزا (n=۱۱۸)			آنالیز آماری
	Mean± SE	Min	Max	Mean± SE	Min	Max	
شمارش لکوسیت (در میکرولیتر)	۱۲۰۹۴±۱۱۵۳	۵۵۰۰	۲۸۵۰۰	۱۰۲۳۸±۳۵۴	۱۵۰۰	۲۷۵۰۰	۰/۰۱<p<۰/۰۵
لمفوسیت (درصد)	۵۹/۳±۲/۳	۳۳	۸۰	۵۶/۲±۱/۱	۲۲	۸۱	p>۰/۰۵
نوتروفیل (درصد)	۳۶/۵±۲/۳	۱۴	۶۴	۳۹/۵±۱/۲	۱۳	۷۴	p>۰/۰۵
لمفوسیت D21 B(C درصد)	۶/۳±۰/۹	۱/۵	۱۵/۱	۷/۸±۰/۵	۱	۲۳/۸	p>۰/۰۵
لمفوسیت D4 helper(C Tدرصد)	۳۰/۳±۲/۵	۸/۹	۴۴/۶	۳۵/۶±۱	۰/۲	۵۸	۰/۰۱<p<۰/۰۵
لمفوسیت D8 T supp .(C درصد)	۲۵/۲±۲/۹	۳/۳	۴۳/۱	۲۶/۲±۰/۹	۹/۲	۶۴/۸	p>۰/۰۵

ث- ارزیابی شاخص های هماتولوژیک و فلوسایتومتریک درجمعیت شماره ۲: با حذف گاوهای واجد اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت‌بینی (۳۷راس) و گاوهای استرس دار (۱۷راس) از جمعیت کل دام‌ها، نتایج ارزیابی هماتولوژیک، فلوسایتومتری و نتایج آنالیز آماری آنها در۱۴۳راس گاو باقیمانده آلوده و غیر آلوده به ویروس (جمعیت شماره۲) در جدول۵ خلاصه

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۶- نتایج مربوط به درصدهای تحت گروه‌های مختلف لمفوسیتی در گاوهای سالم جوان، سالم بالغ و بالغ آلوده به ویروس لوکوز.

گروه دام‌ها شاخص فلوسایتومتری	گاوهای جوان غیر آلوده Mean± SE	گاوهای بالغ غیر آلوده Mean± SE	گاوهای بالغ آلوده Mean± SE
لمفوسیت CD4)T درصد)	۳۶/۸±۱/۲	۳۶/۴±۱/۱	۳۵/۸±۲
لمفوسیت CD8). T درصد)	۲۷/۹±۱/۴	۲۷/۶±۱	۲۷±۱/۹
لمفوسیت CD21)B درصد)	۶/۹±۰/۷	۶/۶±۰/۴	۶/۳±۰/۹

جدول ۷- نتایج مربوط به شمارش گلبول‌های سفید و درصد لمفوسیت‌های گروه دام‌های آلوده به ویروس لوکوز - واجد لمفوسیتوز با دام‌های آلوده فاقد لمفوسیتوز و دام‌های غیر آلوده درجمعیت ۱ و ۲ و نتایج تجزیه و تحلیل آماری آنها. داده‌های جدول بصورت {(تعداد) انحراف معیار ± میانگین} مشخص شده‌اند.

گروه دام‌ها شاخص خونی	گروه۱ گاوهای آلوده واجد لمفوسیتوز	گروه۲ گاوهای آلوده فاقد لمفوسیتوز	گروه۳ گاوهای غیر آلوده	آنالیز آماری
تعداد گلبول سفید درجمعیت۱ (۱۹۷)	(۹) ۱۴۷۵۰±۲۰۳۶	(۳۵) ۱۳۴۱۰±۱۳۴۰	(۱۵۳) ۱۱۱۴۸±۳۷۰	بین گروه۱ و ۲: ۰/۰۵<p بین گروه۱ و ۳: ۰/۰۱<p<۰/۰۵
درصد لفوسیت درجمعیت۱ (۱۹۷)	(۹) ۷۴±۱/۲	(۳۵) ۴۸±۲	(۱۵۳) ۵۲/۶±۱/۱	بین گروه۱ و ۲: p<۰/۰۰۱ بین گروه ۱ و ۳: ۰/۰۰۱<p<۰/۰۰۵
تعداد گلبول سفید درجمعیت۲ (۱۴۳)	(۶) ۱۶۵۰۰±۲۸۴۵	(۱۹) ۱۰۷۰۲±۱۰۸۴	(۱۱۸) ۱۰۲۳۸±۳۵۴	بین گروه۱ و ۲: ۰/۰۱<p<۰/۰۵ بین گروه۱ و ۳: ۰/۰۰۱<p<۰/۰۰۵
درصد لفوسیت درجمعیت۲ (۱۴۳)	(۶) ۷۳/۳۳±۱/۶	(۱۹) ۵۴/۸±۲/۸	(۱۱۸) ۵۶/۲۲±۱/۱	بین گروه۱ و ۲: ۰/۰۰۱<p<۰/۰۰۵ بین گروه۱ و ۳: ۰/۰۰۱<p<۰/۰۰۵

شده است.

ج- مقایسه شاخص‌های فلوسایتومتری (درصد تحت گروه‌های مختلف لمفوسیتی) در گاوهای جوان غیر آلوده، بالغ غیر آلوده و بالغ آلوده به ویروس لوکوز: نتایج حاصل از مقایسه درصدهای تحت گروه‌های مختلف لمفوسیتی در گاوهای سالم جوان، سالم بالغ و بالغ آلوده به ویروس لوکوز در جدول ۶ خلاصه شده‌اند.

د- مقایسه تعداد گلبول‌های سفید و درصد لمفوسیت‌ها در گاوهای غیر آلوده و آلوده واجد و فاقد لمفوسیتوزیس: نتایج حاصل از مقایسه تعداد گلبول‌های سفید و درصد لمفوسیت‌های گروه دام‌های آلوده به ویروس واجد لمفوسیتوز با دام‌های آلوده فاقد لمفوسیتوز و دام‌های غیر آلوده در هر دو جمعیت ۱ و ۲ در جدول ۷ خلاصه شده‌اند.

بحث

در بررسی سرواپیدمیولوژیکی که توسط همکاران موسسه رازی در سال ۱۳۷۵ روی سرم‌های گاو های اصیل کشتار شده استان‌های مختلف ایران بروش ایمنودیفوزیون انجام پذیرفت، ۱/۷ درصد از کل نمونه‌های اخذ شده از استان‌های مختلف کشور، آلوده به ویروس لوکوز گاو بودند که بیشترین آلودگی نیز در استان تهران و آذربایجان‌شرقی (هر دو استان ۳ مورد از ۴۷ نمونه یعنی ۶ درصد) اعلام گردید(۱۷). در بررسی دیگر در استان مرکزی در سال ۱۳۷۸، ۳ درصد از گاوهای اصیل، دو رگ و بومی مورد مطالعه، واجد آلودگی سرولوژیک با آزمایش ایمنودیفوزیون بودند، که بیشترین شیوع در گاوهای اصیل با ۱۷/۵ درصد آلودگی (۱۶ مورد مثبت از ۹۶ راس گاو) مشاهده گردید(۱۰). در مطالعه ممتاز و همکاران در گاوداری‌های استان چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۸۲، ۵/۷ درصد گاوها با آزمون الایزا gp51، نسبت به ویروس لوکوز آلودگی داشتند(۲۲). در مطالعه حاضر میزان آلودگی به ویروس لوکوز با آزمون الایزا gp51 ۲۲/۳ درصد برآورد شد (جدول۱). در اکثر کشورهای دنیا عفونت با ویروس لوکوز گاوها، گزارش شده است و با توجه به پنهان بودن چهره بالینی آن، گسترش نسبتا وسیعی در کشورهای مختلف بویژه در سیستم های صنعتی پرورش گاو داشته و عموما گزارش‌های گسترش آلودگی در هر کشوری بر اساس آزمون‌های سرولوژی بوده است(۱۵). امروزه بیماری در کانادا، استرالیا، نیوزلند، آمریکا، آمریکای جنوبی از جمله آرژانتین، برزیل، ونزوئلا برخی کشورهای آسیایی مثل اندونزی، ترکیه، اروپایی مثل فرانسه، آلمان، هلند، برخی نواحی آفریقا مثل تانزانیا، شیوع بالایی (از ۱۵ تا بالای ۵۰ درصد) دارد (۲، ۱۵، ۱۶، ۳۰، ۳۳، ۳۶، ۳۷). میزان شیوع آلودگی به ویروس لوکوز دراین مطالعه (۲۲/۳ درصد)، مشابه گزارش‌های منتشر شده ازاین کشورهاست. البته دربرخی نقاط دنیا ازجمله بعضی ازکشورهای اروپای غربی، بیماری ریشه کن شده است یا میزان شیوع آن بسیار پایین بوده و به ندرت به بالای ۱/۵ درصد می‌رسد (۱،۱۵،۲۷،۳۶) بطور مثال در لهستان در ۲۰ سال اخیر میزان شیوع از ۲۷ درصد به ۲ درصد کاهش یافته است(۲۸)، در حالی که نتیجه این مطالعه حکایت از آن دارد که میزان آلودگی با ویروس لوکوز در محدوده این بررسی در حال افزایش است، شایان ذکر است که اولا بررسی‌های قبلی در کشور از نظر منطقه یا استان مورد نظر با این مطالعه متفاوت بوده و اکثرا در سطح فارم صورت گرفته‌اند که می‌توانند از علل این اختلاف نتایج شمرده شوند و ثانیا در بررسی‌های قبلی جهت جستجوی پادتن‌های ضد ویروس لوکوز، بیشتر از روش سرولوژیکی ایمنودیفوزیون روی ژل آگار بهره برده‌اند، در حالی که در این مطالعه از روش الایزا استفاده گردیده است و با توجه به اینکه الایزا در بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک روی لوکوز، نسبت به سایر روش‌های سرولوژی از جمله ایمنودیفوزیون روی ژل آگار، بسیار حساس‌تر عمل کرده و حتی دام‌هایی را که در مراحل ابتدایی عفونت هستند، تشخیص می‌دهد (۴،۱۶،۳۰،۳۳)، لذا میزان نسبتا بالای آلودگی در این بررسی احتمالا به علت حساسیت آزمون بکار گرفته شده نیز باشد، چنانکه در مقایسه دو روش ایمنودیفوزیون روی ژل آگار و الایزا، در تشخیص آلودگی سرولوژی گاوها در یک مطالعه، ۱۹/۲ درصد گاوان با روش الایزا و تنها ۴/۹ درصد آنها بروش اول، واجد پادتن علیه ویروس لوکوز بودند(۱۶). البته برخی از محققان، بالا بودن میزان شیوع بیماری را در بررسی‌های خویش، با دلایلی همچون، سیستم یا

www.SID.ir

Archive of SID

مدیریت پرورش متراکم و بسته گاوها و درنتیجه تماس های فیزیکی بسیار نزدیک ناشی از آن، واردات گاو از کشورهایی مثل آمریکا، آلمان، استرالیا، کانادا، هلند که لوکوز در آنها شایع بوده و عدم رعایت نکات بهداشتی و یاتروژنیک مهم مرتبط دانسته‌اند(۲،۱۰،۳۰)،که احتمالاحضور تعداد زیاد گاوداری‌های صنعتی بزرگ با سیستم پرورش بسته در کل و کم تا بی توجهی به بهداشت در این ارتباط درنواحی اطراف تهران ،که بخشی از این دام‌ها نیز در کشتارگاه میثم، کشتار می‌شوند، در بالا بودن میزان آلودگی در این بررسی بدون نقش نبوده‌اند. نظر به میزان شیوع بالای آلودگی درگاوهای کشتاری در این مطالعه و مقایسه آن با مطالعات قبلی در ایران، احتمال این نیز می‌رود که درعرض سال‌های اخیر، میزان آلودگی گاوها به ویروس لوکوز در کشور و بویژه استان تهران، بصورت حقیقی افزایش یافته باشد. میزان آلودگی به ویروس لوکوز در گاوهای اصیل نژاد هلشتاین بالاتر از سایر نژادهای بومی و دورگ، درکشور گزارش شده است(۱۷،۲۲)، در این بررسی سرولوژی کشتارگاهی نیز با توجه به بالا بودن شیوع بیماری در گاوهای نژاد هلشتاین و با توجه به کاهش شدید واردات گاو اصیل در سالیان اخیر و رعایت نکات کنترلی در دام‌های وارداتی، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش شیوع آلودگی لوکوز در نژاد هلشتاین در کشور اصالتا با شرایط مساعد جابجا شدن ویروس در داخل و بین گله‌ها در سطح کشور، مرتبط می گردد و با واردات دام، ارتباطی ندارد.

در این مطالعه، میزان آلودگی درگاوهای نر ۲۰درصد و درگاوهای ماده ۲۳ درصد بر آورد گردید(جدول۲)، که در تجزیه و تحلیل آماری، رابطه معنی‌داری بین آلودگی و جنسیت دام مشاهده نشد($p>0/05$). در مطالعات دیگر نیز ارتباط معنی‌داری بین جنسیت گاو و آلودگی سرمی به ویروس لوکوز مشاهده نشده است (۵، ۱۵، ۲۲، ۳۶). البته شیوع بیماری در گاوهای شیری را بیشتر دانسته اند که احتمالا این اختلاف با بالاتر بودن سن متوسط گاوهای شیری و نزدیک بودن آنها به یکدیگر در جایگاههای پروشی، مرتبط بوده و ارتباطی با جنسیت دام نداشته باشد(۲۷، ۳۷). بیشترین وکمترین شیوع آلودگی به ترتیب درگروه سنی واجد۴زوج دندان بالغ (با بیش از ۵ سال سن) (۳۶/۶درصد) و یک زوج دندان بالغ (۸/۳درصد) مشخص گردید(جدول ۲) و به جزدرگاوهای بدون دندان بالغ، با افزایش سن دام شیوع آلودگی نیز افزایش یافته بود($0/005>p>0/001$) دربررسی های انجام گرفته دیگران نیزبه موازات افزایش سن، افزایش آلودگی مشاهده شده است(۵،۷،۱۵،۲۲،۲۶،۳۹). در مطالعه حاضر میزان شیوع آلودگی در گاوهای زیر۲ سال (بدون دندان بالغ) بیشتر از دام‌های ۲ساله (واجد یک زوج دندان بالغ) بود (جدول۲)، این در حالی است که آلودگی در گاوهای زیر ۲ سال را کمتر گزارش می‌نمایند (۱،۱۷،۲۷)، در برخی مطالعات انجام یافته، میزان شیوع آلودگی سرولوژی گوساله‌های تا ۶ماه سن، بیشتر از گاوان جوان زیر ۲ سال بوده است که ناشی ازعبور پادتن‌های مادری از طریق آغوز و شیر به گوساله می‌باشد(۵،۷). شایان ذکر است معیار تشخیص سن گاوها در این مطالعه تعداد جفت دندان بالغ بوده است و دربررسی دام‌های کشتاری این مطالعه سعی می‌شد برای خارج کردن جمعیت گوساله‌های زیر۶ماه از مطالعه، در دام‌های بدون دندان بالغ از گاوهای ریزجثه استفاده نشود و با عنایت به این نکته که همه دام‌های آلوده فاقد دندان بالغ،گوساله‌های نر پرواری بودند(۶ راس)، لذا حضور گوساله‌های واجد آنتی‌بادی مادری زیر ۶ ماه سن در این مطالعه رد شده و دلیل بالا بودن شیوع سرمی عفونت در گروه سنی فاقد دندان بالغ ناشی از آلودگی واقعی دام‌های این گروه با ویروس لوکوز، به علت تراکم بسیار بالای گوساله‌ها در پرواربندی‌ها، تماس فیزیکی نزدیک آنها و بهداشت پایین می‌باشد. در این بررسی، با اینکه دام‌های لاغر با درجه وضعیت بدنی۲-۱/۵، بیشترین درصد آلودگی به ویروس را در بین گاوها دارا بودند(جدول ۲)، ولی در تجزیه و تحلیل آماری ،رابطه معنی‌داری بین آلودگی گاوها و درجه وضعیت بدنی آنها مشاهده نشد($p>0/05$). در سایر مطالعات تجربه‌ای در این خصوص انجام نگرفته است با این حال، لاغری و کاهش وزن به عنوان یکی از نشانه‌های بالینی لوکوز گاوان بویژه فرم متداول آن (تحت حاد و مزمن) و در مراحل پیشرفته، ذکر می‌گردد(۲۵،۲۷). ۳۷ راس از گاوهای مورد مطالعه واجد اختلال بالینی یا آسیب درشت بینی بودند که ۱۵ راس از آنها (۴۰/۵درصد) آلوده به ویروس لوکوز تشخیص داده شدند(جدول۳)، تجزیه و تحلیل آماری حاکی از حضور رابطه معنی‌داری بین وجود اختلال بالینی یا آسیب درشت بینی درگاوها و آلودگی آنها با ویروس لوکوز بود($0/005>p>0/001$).

تجزیه و تحلیل آماری نتایج بررسی هماتولوژی نشان داد که در ۱۹۷ گاو مورد مطالعه (جمعیت شماره۱)، متوسط تعداد کل گلبول‌های سفید و درصدکل لمفوسیت‌ها، درگاوهای آلوده به لوکوز، بطور جزیی بیشتر از گاوهای غیر آلوده بودند (جدول۴) با این حال با آزمون آماری T-Test هیچ اختلاف معنی‌داری بین شاخص‌های مذکور و همچنین درصد نوتروفیل، ائوزینوفیل، مونوسیت، هماتوکریت و میزان هموگلوبین در این دو دسته از گاوها مشاهده نگردید. در مطالعات سایر محققان نیز فراوانی نسبی مونوسیت، ائوزینوفیل، هماتوکریت و میزان هموگلوبین در دام‌های واجد آلودگی سرمی به ویروس لوکوز، تفاوتی با دام‌های غیر آلوده نداشته‌اند، در حالی که متوسط تعداد کل گلبول‌های سفید و درصد لمفوسیت‌ها درگاوهای آلوده، بیشتر و درصد نوتروفیل‌ها کمتر از گاوهای غیر آلوده بودند(۱۶،۳۶). با توجه به حضور گاوهای استرس‌دار یا واجد اختلالات بالینی و آسیب‌های درشت بینی در بین دام‌های کشتاری ونظر به تاثیر این عوارض در شاخص‌های هماتولوژیک چنین دام‌هایی(۱،۲۷)، فقدان اختلاف معنی‌دار در مقایسه نتایج شاخص‌های خونی دام‌های آلوده و غیر آلوده، بعید بنظر نمی‌رسد.

آنالیز آماری نتایج نشان داد که پس از حذف این گاوهای عارضه‌دار از جمعیت مورد مطالعه، تعداد گلبول‌های سفید در گاوهای آلوده به ویروس لوکوز با تعداد آنها در گاوهای غیر آلوده، اختلاف معنی‌داری پیدا نمودند طوری که درگروه اول بیشتر از گروه دوم بود($p=0/049$) ولی باز هم اختلافی در درصد لمفوسیت و نوتروفیل دیده نشد(جدول۵). بیشتر بودن میانگین تعداد کل گلبول‌های سفید در دام‌های آلوده نسبت به دام‌های غیر آلوده، مشابه با یافته‌های سایر محققان بود(۱۶،۳۶). البته با توجه به اینکه در

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه‌ای تعداد لکوسیت‌های گاوهای آلوده به لوکوز در مناطق واجد آلودگی‌های صنعتی بویژه با فلورین، حتی کمتراز محدوده طبیعی نیز بوده است(۲۴)، لذا ممکن است بالا نبودن زیاد تعداد لکوسیت‌های گاوهای آلوده به ویروس لوکوز در این مطالعه نیز (p=۰/۰۴۹)، به علت حضور چنین آلودگی‌های صنعتی در مناطق مربوط به زندگی این گاوها باشد که در این خصوص نیاز به پژوهش‌های بیشتری حس می‌گردد. با توجه به کشتارگاهی بودن این مطالعه، امکان تشخیص گاوهای مبتلا به لمفوسیتوز پایدار وجود نداشت، با این حال با توجه به اینکه گاوهای واجد ۷۵درصد لمفوسیت در شمارش تفریقی سلول‌های خونی به‌عنوان دام‌های مبتلا به لمفوسیتوزیس محسوب می‌گردند(۱،۲۷)، تعدادگلبول‌های سفید خون و درصد لمفوسیت‌های دام‌های آلوده به ویروس واجد لمفوسیتوزیس، بالاتر از دام‌های آلوده بدون لمفوسیتوزیس و دام‌های غیر آلوده بودند(جدول۷). این نتایج مشابه با یافته های گزارش‌های دیگر می‌باشد(۲،۳). آنالیز آماری نتایج بررسی فلوسایتومتری در جمعیت شماره۲ گاوهای مورد مطالعه (جدول ۵)، نشان داد که درصد لمفوسیت‌های T(+CD4) در گاوهای آلوده به ویروس لوکوز، کمتراز دام‌های غیر آلوده بود(۰/۰۵>p>۰/۰۱) و هیچ اختلافی دردرصد لمفوسیت‌های T(+CD8) و B(+CD21) بین این دو گروه از دام‌ها مشاهده نشد. در بررسی‌های متعددی افزایش فراوانی نسبی سلول‌های B و کاهش سلول‌های T در دام‌های واجد آلودگی سرولوژیک نسبت به ویروس لوکوز، مشاهده شده است که به علت آلودگی اولیه لمفوسیت‌های B با ویروس می‌باشد(۱،۲،۱۶،۲۱،۳۶). کاهش درصد لمفوسیت‌های T(+CD4) در گاوهای آلوده به ویروس لوکوز در این مطالعه نیز، منطبق با گزارش‌های مذکور می‌باشد. شایان ذکر است که افزایش درصد لمفوسیت‌های B در دام‌های آلوده به ویروس را عمدتا در گاوهای آلوده مبتلا به لمفوسیتوزیس پایدار، گزارش نموده‌اند(۱،۲۰،۲۱،۳۲)، طوری که در خون محیطی گاوهای آلوده فاقد لمفوسیتوزیس پایدار، عدم تغییر قابل توجه یا کاهش تعداد لمفوسیت‌های B و T(+CD4) نسبت به گاوهای غیر آلوده و حتی شکل‌گیری لمفوپنی پایدار در اثر کاهش سلول‌های B را اعلام کرده‌اند(۳،۳۲) علت کاهش جمعیت سلول‌های B در دام‌های آلوده فاقد لمفوسیتوزیس پایدار مشخص نیست ولی ممکن است لمفوسیت‌های T سیتوتوکسیک در این کاهش دخیل باشند(۳) لذا با توجه به شدیدا پایین بودن تعداد گاوهای آلوده مبتلا به لمفوسیتوز در این مطالعه (۲راس برابر با ۰/۵درصد کل جمعیت و۴/۵درصد گاوهای آلوده)، بالا نبودن درصد سلول‌های B در دام‌های آلوده نسبت به دام‌های غیر آلوده کاملا قابل توجیه می‌باشد. در برخی بررسی‌ها نیز هیچ اختلاف معنی‌داری در درصد سلول‌های B و T در دام‌های آلوده و غیر آلوده بویژه در زمانی که جهت شناسایی دام‌های آلوده از آزمون ایمنودیفوزیون روی ژل آگار استفاده شده، وجود نداشته است (۱۶) البته اختلاف در فراوانی این سلول های لمفوسیتی در مطالعات مختلف می تواند ناشی از تفاوت در میزان گسترش ویروس لوکوز در بدن دام‌های مختلف باشد. علت این تفاوت‌ها، ریشه در نژاد، تغذیه، ژنتیک و وضعیت ایمنولوژیک دام‌ها دارد(۲۱،۳۵). همانند نتایج ارائه شده توسط برخی محققان دیگر (۱۱،۲۰) مقایسه فراوانی نسبی لمفوسیت های B با تعداد مطلق گلبول های سفید و درصد کل لمفوسیت‌ها در این مطالعه نیز (جداول۴و۵)، حاکی از افزایش درصد سلول‌های B در دام‌های آلوده به ویروس لوکوز با افزایش تعداد مطلق گلبول‌های سفید و افزایش لمفوسیت‌ها در آنها می‌باشد(۰/۰۱>p>۰/۰۰۵). چون سلول‌های B تنها سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی هستند که در آلودگی به لوکوز بطور قابل توجه درگیر می‌شوند(۲،۲۱). در مطالعه‌ای نشان داده شده است که تعداد و درصد لمفوسیت‌های T از جمله +CD4 و +CD8 در خون محیطی گاوهای نابالغ غیر آلوده بیشتر از گاوهای بالغ غیر آلوده و در آنها نیز بیشتر از گاوهای بالغ آلوده می‌باشند(۳۸)، که در بررسی حاضر نیز با اینکه تفاوت معنی‌داری در درصد سلول‌های مذکور در گروهای مربوطه مشاهده نشد، ولی مقایسه میانگین درصدهای این سلول‌ها در گروه‌های دامی (جدول۶) با مطالعه مذکور همخوانی داشت. اعتقاد بر آنست که تعداد سلولهای T در خون محیطی گاو با افزایش سن کاهش می‌یابد و همچنین به تدریج با پیشرفت بیماری و نزدیک شدن به مراحل انتهایی آن (لمفوسیتوزیس پایدار و لمفوم) از فعالیت سیتوتوکسیکی این سلول‌ها نیز در گاوهای آلوده به ویروس لوکوز کاسته می‌شود(۳۸). البته در بررسی مذکور، نشان داده شده بود که توزیع این سلول‌ها در نسوج لمفاوی از جمله طحال در این دام‌ها، برعکس توزیع ذکر شده در خون محیطی آنها بوده که اتفاق افتادن روند ایمنی توموری را در طحال نشان می دهد(۳۸).

آزمون الایزا و تست هماتولوژیک، بصورت توام روش قابل اطمینان و حساسی در مطالعات سرواپیدمیولوژیکی آلودگی به ویروس لوکوز هستند (۱۶)، البته باید مد نظر قرار داد که ممکن است علارغم آلودگی و وجود ویروس در سلول‌ها، پادتن تولید نشده و چنین دام‌هایی در آزمون سرولوژی پاسخ منفی نشان دهند(۸)، لذا استفاده توام آزمون‌های سرولوژی برای ارزریابی پادتن‌های سرمی و تست های مولکولی برای شناسایی پادگن‌های ویروسی در مطالعات اپیدمیولوژی توصیه می‌گردد(۸). بررسی حاضر نشان داد که آلودگی با ویروس لوکوز گاو در دام‌های مورد مطالعه، شیوع بالایی دارد و همچنین درصد لمفوسیت‌های T(+CD4) در گاوهای آلوده به ویروس لوکوز، کمتراز دام‌های غیر آلوده بود لذا با عنایت به قابل توجه بودن میزان شیوع آلودگی، سهولت انتقال ویروس به دام‌های دیگر و درمان ناپذیری و خسارات ناشی از آن، لازم است پس از مطالعات کافی در سایر نواحی کشور نیز، برای جلوگیری از انتشار آلودگی وکنترل آن، اقدامات کنترلی و حتی برنامه‌های ریشه کنی بیماری در ایران و حتی سایر کشورهای در حال توسعه، بعمل آید. در غیاب واکسیناسیون موثر، اساس ریشه کنی بیماری که در کشورهای دیگر استفاده می‌شود، تست سرولوژی و جداسازی (حذف) دام‌های مثبت، تست سرولوژی دام‌های تازه وارد به گله‌ها و رعایت روش‌های صحیح اقدامات و کارهای دامپزشکی از جمله بکارگیری صحیح سوزن‌های واکسیناسیون، تزریق، دستکش‌های معاینه راست روده‌ای و سایر روش‌های

www.SID.ir

Archive of SID

یاتروژنیک می باشد(۱۴،۲۹،۳۶). قابل توجه آن که سیاست تست سرولوژی و حذف دام‌های مثبت در ریشه کنی آلودگی و بیماری لوکوز در برخی کشورهای اروپایی بسیار موفقیت آمیز بوده است(۱۴،۱۵،۳۶) علت کاهش جمعیت سلول‌های B در دام‌های آلوده (بویژه دام‌های آلوده فاقد لمفوسیتوزیس) هنوز هم کاملا مشخص نشده و در این مورد نیاز به بررسی‌های بیشتری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت‌های مالی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و بنیاد مستضعفان برای انجام این پژوهش قدردانی می‌شود. بعلاوه نگارندگان از زحمات آقایان مظاهری، خرمالی 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.

References

1. Andrews, A.H., Blowy, W., Boyd, H., Eddy, R.G. (2003) Bovine medicine. (2th ed.) Blackwell Sci.Ltd. Oxford. pp. 693-700.
2. Batmaz, H., Carli, K.T., Kahraman, M., Kennerman, E. (1995) Serological and hematological diagnosis of enzootic bovine leucosis in cattle in Turkey. Vet. Rec. 36: 42-44.
3. Beyer, J., Kollner, B., Teifke, J. P., Starick, E., Beier, D., Reimann, I., Grunwald, U., Ziller M. (2002) Cattle infected with Bovine leukemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B- cell lymphopenia. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. 49: 270-7.
4. Buzala, W., Rulka, J. (2003) The value of peroxidase linked assay in detection of bovine leukemia virus infection. Vet. Bull. 73: 1416.
5. Carneiro, P. A. M., Araujo, W. P. DE., Birgel, E. H., Souza, K.W. DE. (2003) prevalence of infections with bovine leucosis virus, in dairy cattle raised in Amazonas state, Brazil. Acta Amazonica. 33: 111-125.
6. Choi, K.Y., Lin, R. B., Buehring, G. C. (2002) Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay and immunoblating for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. J. Virol. Method. 104: 33-39.
7. D'Angelino, J.L., Garcia, M., Birgel, E.H. (1998) epidemiological study of Enzootic bovine leukosis in Brazil. Trop. Anima. Hlth. Prod. 30: 13-15
8. Dus Santos, M.J., Trono, K., Lager, I., Wigdorovitz, A. (2007) Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. Vet. Microbiol. 119: 10-18.
9. Eskra, L. (1991) Effect of monoclonal antibodies on in vitro function of T- cells subsets. Vet. Immunol. Immunopathol. 27: 215-231.
10. Ghaem Maghami, Sh., Oliyai, M., Nirumandi, H., Phirouzi, M., Bakhshesh, M. (1999) Serologic Survery on enzootic bovine leukesis in Central province. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 54: 11-13.
11. Guglielmino, R., Roatis, L., Cagnasso, A., Peirone, B., Genetta, C. (1996) Identification of T and B lymphocyte cytochemical reactions in cattle seropositive and seronegative for the Bovine leucosis virus. Vet. Bull. 66: 250.
12. Heuvel, M.V., Portetella, D., Jefferson, B., Jacobs, R.M. (2003) Adaptation of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to determine the concentration of bovine leukemia virus P24 and optimal conditionds for P24 expression in short term cultures of peripheral blood mononuclear cells. J. Virol. Method. 111: 61-67.
13. Howard, J.L. (1986) Current veterinary therapy. Animal practice, W.B.Saunders, Philadelphia. USA. pp. 640-649.
14. Hyun, S.G., Chi, L.J., Young, H.T., Seo, S.D., Seog, A.B., Chul, K.N., Gil, L.C. (2005) Establishment of a bovine leukemia virus free dairy herds in Korea. J. Vet. Sci. (Suwon-Si, Korea). 6: 227-230.
15. Johnson, R., Kaneene, J.B. (1992) Bovine leukemia virus and Enzootic bovine leukosis.Vet. Bull. 62: 287.

www.SID.ir

Archive of SID

16. Kale, M., Ozturk, F. (2004) An investigation of enzootic bovine leucosis (EBL) infection by Agar gel immunodiffusion (AGID), Enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) tests and haematological applications on the dairy cows in the Burder region. Acta Vet. (Beograd). 54: 163-173.
17. Kargar Moakhar, R., Hessami, M., Ahourai, P., Ghaboussi, B., Khedmati, K., Ezi, A., Pourzahedi, R., Sarmast, R. (1996) Seroepidemiology Survery on enzootic bovineleukosisy (EBL) in Iran. Pajouhesh and Sazandegi. 24: 164-166.
18. Kerr, M.G. (2002) Veterinary laboratory medicine. (2nd ed.) Black Well Sci. pp. 123.
19. Kittellberegerm, R., Reichel, M.P., Meynell, R.M. (1996) Detection of antibodies against the core protein P24 BLV in cattle. J. Virol. Method. 77: 109-114.
20. Lewin, H.A., Wu, M.C., Nolan, T.J., Stewart, J.A. (1988) Peripheral B lymphocyte percentage as an indicator of subclinical progression of Bovine leukemia virus infection. J. Dairy Sci. 71: 2526-2534.
21. Mirsky, M.L., Olmstead, C.A., Yang, D.A., Lewin, H.A. (1996) The prevalence of proviral Bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. J. Virol. 70: 2178-2183.
22. Momtaz, H., Hemmatzadeh, F. (2003) Serologic on infection with bovine leukosis virus in Chaharmahal and Bakhtyari Province. Iranian J. Vet. Res. 9: 37-44.
23. Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., studdert, M.J., (1996) Veterinary Virology. (3rd ed.) Academic press. London, UK. pp. 363-389.
24. Murvatulloev, S.A., Burba, L.G. (1994) Effect of industrial fluorine pollution on haematological and immunological characteristics of bovine leukosis. Vet. Bull. 64: 778.
25. Otta, S.L., Johnson, R., Wells, S.J. (2003) Association between bovine leukosis virus seroprevalence and herd- level productivity on US dairy farms. Prev.Vet. Med. 61: 249-262.
26. Puchian, G., Cosma, A. (1998) The incidence of Lymphosarcomatous changes in Enzootic bovine leucosis. Vet. Bull. 68: 1425.
27. Radostitis, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. (2000) Veterinary medicine. (9th ed.) W. B. Saunders, London, UK. pp. 1046-1058.
28. Salwa, A., Arent, Z., Kamionowska, E., Barancewicz, M. (2002) Epidemiology of Bovine leukemia virus in the Gdansk region in 1983-2001. Vet. Bull. 72: 1526.
29. Sandev, N., Sizov, I., Pandarov, S., Alexanderova, S., Dojchev, T. (2002) Prevalence of EBL in south-eastern Bulgaria during the period 1998-2000. Vet. Bull. 72: 1526.
30. Schoepf, K.C., Kapaga, A.M., Msami, H.M., Hyera, J.M.K. (1997) Serological evidence of the occurrence of Enzootic bovine leucosis virus infection in cattle in Tanzania. Trop. Anim. Hlth. Prod. 29: 15-19.
31. Simard, C., Richardson, S., Dixon, P. (2000) AGID test for detection of BLV antibodieas lack of trans-atlontic standardization. Can. J.Vet. Res. 64: 69-100.
32. Taylor, B. C., Stott, J. L., Thurmond, M.A., Picanso, J.D. (1992) Alteration of lymphocyte subpopulations in Bovine leukemia virus infected cattle. Vet. Immunol. Immunopathol. 31: 35-47.
33. Trono, K.G., Perz-Filgueira, D.M., Duffy, S., Borca, M.V., Carrillo, C. (2001) Serprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. Vet. Microbiol. 83: 235-248.
34. Twizere, J. (2000) Discordance between Bovine leukemia viruses tax immortalization in vitro and oncogenicity in vivo. J. Virol. 74: 9895-9902.
35. Ungan Waron, H. (1990) Reduced immuno competence of antibodies produced in leukemic cattle. Vet. Bull. 58: 91.
36. Uysal, A., Yilmaz, H., Bilal, T., Berriatua, E., Bakirel, U., Arslan, M., Zerin, M., Tan, H. (1998) Seroprevalence of Enzootic bovine leucosis in Trakya district (Marmara region) in Turkey. Prev. Vet. Med. 37: 21-128.
37. Vanleeuwen, J.A., Tiwari.A, Plaizier, J.C., Whiting, T.L. (2006) Seroprevalence of antibodies against Bovine leukemia virus, Bovine viral diarrhea, Mycobacterium avium Para tuberculosis and Neospora caninum in beef and dairy cattle in Manitoba. Can. Vet. J. 47: 783-786.

www.SID.ir

Archive of SID

38. Wu, D., Takahashi, K., Lin, N., Koguchi, A., Makara, M. (1999) Distribution of T lymphocyte subpopulation in blood and spleen of normal cattle and cattle with Enzootic bovine leucosis. J. Comp. Pathol. 120: 117-127.
39. Zaghava, A., Beier, D., Abd EL- Rahim, I.H. A., Karim, I., EL-Ballal, S., Conraths, F.J., Marquardt, O. (2002) An outbreak of Enzootic bovine leukosis in upper Egypt: clinical, laboratory and molecular-epidemiological studies. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. 49: 123-129.

www.SID.ir

Archive of SID
J.Vet.Res. 64,2: 147-156,2009

AN ABATTOIR SURVEY ON PREVALENCE OF ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS VIRUS INFECTION AND ASSOCIATED CLINICAL, HAEMATOLOGICAL AND FLOW CYTOMETRIC FINDINGS IN HOLESTEIN CATTLE IN TEHRAN

Tooloei, M.[1]*, Bazargani, T.T.[2], Broujeni, G.N.[3], Khaki, Z.[2], Bokaei, S.[4], Ashrafei, I.[3]

[1]*Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.*

[2]*Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

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

[4]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

(Received 6 February 2006 , Accepted 27 April 2007)

Abstract:

Bovine leukosis virus (BLV) is a retrovirus that primarily affects lymphoid tissue of cattle. To determine the seroprevalence of Enzootic Bovine Leukosis Virus infection and its effects on some clinical, hematological and flow cytometric indications, this study was conducted on 197 Holstein cattle slaughtered in an abattoir in Tehran province. ELISA gp51 test of the obtained serums of the animals showed that the mean of infection rates was 22.3%. Age arrangement of the relative frequencies of the infection showed a significant correlation between EBLV infection and age increasing ($0.001<p<0.005$). There was a significant difference between the infection rates in cattle with any clinical problems or macroscopic pathological lesions and in apparently normal animals ($0.001<p<0.005$). There weren't any significant correlation between EBLV infection and sex and body condition score. With omitting the animals with any clinical problems or macroscopic pathological lesions and stressed ones, because of probability of the secondary changes in hematological indications of them, seropositive cattle had higher total leukocyte counts ($0.01<p<0.05$) and lower T-lymphocyte (CD4+) percentage ($0.01<p<0.05$) than seronegative cattle. In addition there was a positive correlation between the number of B-lymphocyte (CD21+) and total leukocyte counts and lymphocyte percentage in seropositive cattle. Results of this study depicted high seroprevalence rate of Enzootic Bovine Leukosis Virus infection in the surveyed animals and lower CD4+-cells percentage in seropositive cattle than seronegative ones.

Key words: bovine leukosis virus, holstein cattle, Elisa, hematology, flow cytometriy.

***Corresponding author's email: Tolouim@Vetmed.ut.ac.ir, Tel: 021-66427517, Fax: 021-66933222**

www.SID.ir