

مطالعه تأثیر سویه NADL ویروس BVD بر سلولهای سفید خون گوسفند

دکتر هادی کیوانفرا^۱ دکتر فرید همتزاده^۱

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۱، ۲۰-۱۷، (۱۳۷۹)

به پادگنهای پستی ویروسی دیده می‌شود (۸، ۷، ۶).

در گزارشات سایر محققین افزایش لمفوسیت‌های CD8 در جمعیت لمفوسیت‌های خون گوسفندان مبتلا به عفونت پایدار ذکر شده است. در گزارشی دیگر افت چشمگیر لوکوسیت‌های خون گوسفند به دنبال تزریق ویریدی ویروس بیماری بُردر مشاهده شده است (۱۴، ۱۳، ۴).

آلودگی گوسفندان مادهٔ آبستن با ویروس بیماری بُردر در صورتی که قبل از صلاحیت‌دار شدن لمفوسیت‌های دستگاه ایمنی جنین صورت گرفته باشد و سویه ایجاد کنندهٔ عفونت موجب سقط جنین نشود، برهٔ متولد شده به عفونت پایدار پستی ویروسی مبتلا گردیده و برخی ناهنجاریهای عصبی، اسکلتی و جلدی را از خود نشان می‌دهد. این در حالی است که گوسفندان بالغ علاوه بر داشتن توان پاسخ ایمنی نسبت به عفونت، علائم بالینی خفیف و زودگذری را از خود ظاهر می‌سازند (۱۶، ۱۲، ۱۰، ۹، ۳).

هدف از انجام این قسمت از تحقیق، مشخص نمودن نقش سویه NADL ویروس BVD بر سلولهای سفید خون گوسفند بود که در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام گرفت.

مواد و روش کار

در این تحقیق ۴ رأس گوسفند از بین گوسفندان مرکز تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (امین‌آباد) در محدودهٔ سنی ۳/۵ تا ۵ سال، که قبلاً عاری بودن آنها از عفونتهای پستی ویروسی با استفاده از آزمونهای سرمی SN و ELISA تأیید شده بود، انتخاب گردیدند. تمامی گوسفندان پس از انتقال به بخش حیوانات آزمایشگاهی در باکسهای جداگانه و تحت شرایط تغذیه‌ای و مدیریتی یکسانی در طول دورهٔ بررسی نگهداری شدند. یک روز بعد از انتقال از هر ۴ رأس گوسفند نمونهٔ خون ویریدی جهت شمارش سلولهای خونی تهیه شد و با استفاده از لام هموسیستمتر شمارش گردید.

جهت ایجاد بیماری تجربی، سه رأس از گوسفندان فوق‌الذکر با میزان 2×10^7 TCID50 سویه NADL ویروس BVD تهیه شده در کشت سلول RBK، از راه داخل عضلاتی و در زمانهای مختلفی آلوده گردیدند. گوسفند چهارم به عنوان شاهد در شرایطی کاملاً مشابه ولی به شکل مجزا از سایرین نگهداری گردید (۹).

پس از تلقیح ویروس طبق برنامه‌ای منظم و به‌طور روزانه علائم بالینی شامل درجه حرارت، تعداد ضربان قلب و تنفس و وضعیت دستگاه تنفس خاصه ترشحات آن و وضعیت دستگاه گوارش خاصه وضعیت مدفوع مورد معاینه قرار می‌گرفت و طبق برنامهٔ زمانبندی شده با فواصل ۲ تا ۳ روز تا ۲۰ روز و سپس به‌طور هفتگی تا ۳ ماه، عمل خونگیری و شمارش کلی و تفریقی سلولهای سفید خون در هر چهار رأس گوسفند انجام می‌شد. علاوه بر آن نمونه‌های سرمی هم جهت انجام آزمونهای سرمی SN و ELISA تهیه و آزمایش می‌گردید.

نتایج

پس از انجام نمونه‌گیری منظم و شمارش سلولهای خونی گوسفندان مورد

در این تحقیق ۴ رأس گوسفند بالغ در محدودهٔ سنی ۳/۵ تا ۵ سالگی، که قبلاً عاری بودن آنها از عفونتهای پستی ویروسی با توسل به آزمونهای سرمی SN و ELISA تأیید شده بود، انتخاب شده و سلولهای سفید خونی آنها به‌روش معمول شمارش گردیدند. سه رأس از این گوسفندان در زمانهای مختلف با میزان 2×10^7 TCID50 از سویه NADL ویروس عامل اسهال ویروسی گاوان از طریق داخل عضلانی آلوده شده و گوسفند چهارم به عنوان شاهد در محلی جداگانه نگهداری گردید. پس از خونگیری منظم از هر چهار رأس در زمانهای مشابهی اقدام به شمارش سلولهای سفید خونی گوسفندان شد. در هر سه رأس گوسفند آلوده، لوکوپنی از یک روز پس از تزریق ویروس آغاز شد و در روزهای ۵ تا ۸ پس از تزریق به اوج خود رسید. در بین سلولهای خونی بیشترین کاهش را لمفوسیت‌ها نشان داده، و به حدود نصف میزان طبیعی رسیدند، در صورتی که گوسفند شاهد هیچ‌گونه تغییر معنی داری را در جمعیت سلولهای خونی از خود نشان نداد. درجه حرارت هر سه رأس گوسفند آلوده، در روزهای ۳ تا ۴ پس از تزریق به مرز ۴۱ تا ۴۱/۵ درجه سانتیگراد رسید و حدود ۱۰ روز بعد از تلقیح ویروس، به مرز طبیعی نزدیک شد. در روز ۴۴ پس از تلقیح ویروس، هر سه رأس گوسفند تحت تجربه در آزمونهای SN و الیزا پاسخ مثبت داشتند. منهای تغییر در جهت لمفوسیت‌های خون و واکنش حرارتی، علائم بالینی دیگر خاصه در دستگاه گوارش یا تنفس گوسفندان آلوده مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: پستی ویروس، بیماری بُردر، اسهال ویروسی گاوان، گلبولهای سفید گوسفند، سویه NADL.

ویروس عامل بیماری بُردر به همراه ویروس عامل اسهال ویروسی گاوان و ویروس طاعون خوک، اعضاء جنس پستی ویروس را تشکیل می‌دهند. جنسهای پستی ویروس، فلیوی ویروس و هپاتو ویروس (ویروس هپاتیت C انسان) همگی متعلق به خانوادهٔ فلیوی ویروس هستند که اندازهٔ کلیهٔ ویروسهای این خانواده در حدود ۴۰ تا ۵۰ نانومتر، واجد غشا دارای تقارن ۲۰ وجهی و RNA از نوع منفی می‌باشند (۱۱، ۲).

بیماری بُردر به عنوان یک بیماری مهم در گوسفند به علت گسترش بسیار زیاد در جهان و شرکت فعال ویروس عامل بیماری در سندرم سقط جنین در گوسفند، ایجاد بره‌های ناقص‌الخلقه و دخالت مستقیم در سندرم بره‌های ضعیف و نهایتاً اختلال در ساختمان پشم، هر ساله باعث بروز خسارات عمده به صنعت پرورش گوسفند در جهان می‌شود. از سوی دیگر عامل بیماری بُردر به علت شباهت بسیار زیاد به عامل اسهال ویروسی گاوان و چرخهٔ نسبتاً فعال انتقال عوامل این دو بیماری بین گوسفند و گاو مخاطرات چشمگیری را نیز برای جمعیت گاوان در بر دارد (۱۲، ۱۰، ۱).

تجربیات برخی از محققین حاکی از تأثیرات سرکوبگر پستی ویروسها بر دستگاه ایمنی گاو از طریق کاهش لمفوسیت‌های خون است ولی گزارش واضحی از نحوهٔ تأثیر ویروس BVD بر سلولهای سفید خون گوسفند بالغ و سالم در دست نیست. در گوسفندانی که با ویروس بیماری بُردر به‌طور پایدار آلوده شده‌اند، کاهش محسوسی در دفاع ناشی از ایمنی سلولی و همچنین تحمل ایمنی نسبت

۱ گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.



جدول ۱ - نتایج حاصل از شمارش سلولهای سفید خون گوسفندان مورد مطالعه بعد از تلقیح ویروس NADL

روز	گوسفند ۱	گوسفند ۲	گوسفند ۳	گوسفند ۴*
**	۷۳۵۰	۷۱۰۰	۷۵۰۰	۷۴۵۰
۱	۷۰۰۰	۷۰۵۰	۷۴۵۰	۷۴۰۰
۳	۵۹۵۰	۵۷۵۰	۵۸۵۰	۷۴۰۰
۵	۵۸۰۰	۵۵۰۰	۴۷۰۰	۷۳۰۰
۸	۵۸۰۰	۵۷۰۰	۴۵۰۰	۷۲۵۰
۱۱	۵۷۰۰	۶۳۵۰	۵۱۰۰	۷۲۵۰
۱۴	۶۴۰۰	۶۷۵۰	۵۰۰۰	۷۳۰۰
۱۷	۶۷۵۰	۷۲۰۰	۵۱۰۰	۷۳۰۰
۲۰	۷۰۰۰	۷۱۰۰	۵۴۰۰	۷۴۵۰
۲۳	۷۱۰۰	۷۰۰۰	۵۴۵۰	۷۴۰۰
۳۷	۷۱۵۰	۷۱۵۰	۵۸۰۰	۷۴۰۰
۴۴	۷۰۰۰	۷۲۵۰	۶۱۰۰	۷۴۵۰
۵۱	۷۱۰۰	۷۲۰۰	۶۳۰۰	۷۵۰۰
۵۸	۷۲۵۰	۷۲۵۰	۶۴۵۰	۷۵۰۰
۶۵	۷۳۰۰	۷۱۰۰	۷۰۰۰	۷۴۰۰
۷۲	۷۳۰۰	۷۲۰۰	۶۹۵۰	۷۵۰۰
۸۰	۷۳۵۰	۷۰۵۰	۷۰۰۰	۷۴۵۰
۸۷	۷۴۰۰	۷۰۰۰	۶۵۰۰	۷۳۰۰

*گوسفند شاهد، ** روز تلقیح ویروس.

مطالعه که نتایج آن در جدول و نمودار ۱ و ۲ نیز آمده‌اند مشخص گردید که کاهش تعداد کلی لوکوسیت‌ها از میزان متوسط ۷۳۶۶ لوکوسیت در میلی‌لیتر از روز اول پس از تزریق ویروس شروع و تا روزهای پنجم تا هشتم ادامه داشت و به حدود ۵۰۰۰ لوکوسیت در میلی‌لیتر رسید، این در حالی بود که در تعداد کلی لوکوسیت‌های خون گوسفند شاهد علی‌رغم خونگیری منظم و مشابه با سایر گوسفندان مورد مطالعه، هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در طی دوران مطالعه اتفاق نیفتاد.

پس از شمارش تفریقی لوکوسیت‌های خون گوسفندان مورد مطالعه به روشنی مشخص گردید که ویروس بیشترین تأثیر را بر لمفوسیت‌ها داشته است، تا حدی که میزان کلی لمفوسیت‌ها در هر سه رأس حیوان مورد مطالعه به مرز نصف میزان طبیعی در فاصله زمانی روزهای ۵ تا ۸ پس از تزریق رسید. ولی در میزان نوتروفیل‌های خون گوسفندان مورد مطالعه تغییر مشهودی رخ نداد به طوری که میزان طبیعی لمفوسیت به نوتروفیل که در حد دو به یک می‌باشد به حد یک به یک تقلیل یافت. روند کاهش تعداد لمفوسیت‌ها در هر سه رأس گوسفند آلوده شده از الگوی یکسانی پیروی نمود، بنابراین به جهت مقایسه میزان تأثیر ویروس، میانگین تعداد لمفوسیت‌ها و نوتروفیل‌های هر سه رأس گوسفند تلقیح شده در نمودار ۱ آورده شده است. شمارش تفریقی سلولهای سفید خونی گوسفندان مورد تجربه در جدول ۲ ذکر شده‌اند.

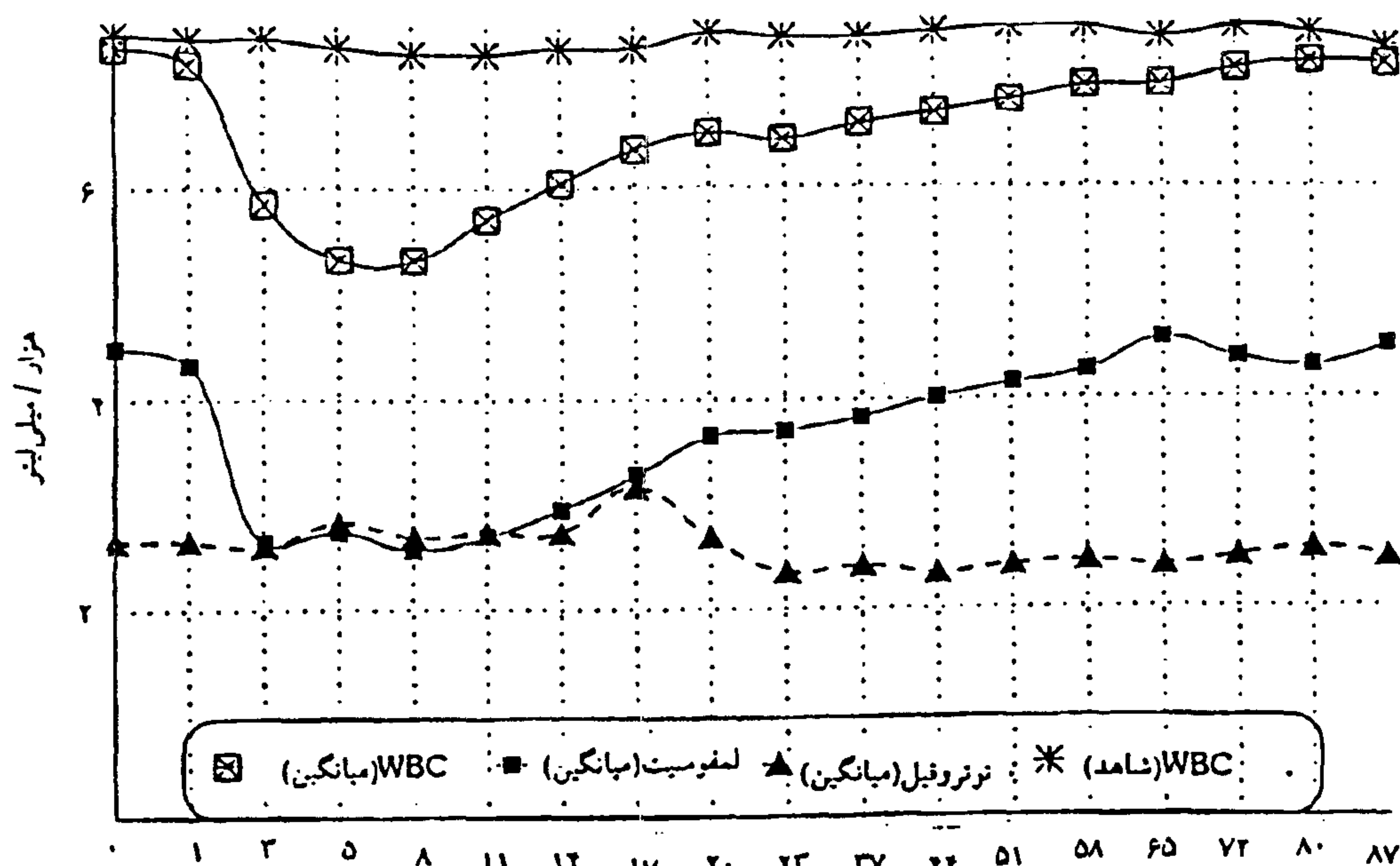
آزمونه‌های سرمی انجام شده روی سرم گوسفندان مورد مطالعه حاکی از آن بود که در روز ۴۴ پس از تلقیح ویروس، هر سه رأس گوسفند ذکر شده واجد عیار پادتنی قابل تشخیص بر علیه پستی ویروسها در خون خود بوده‌اند، اما گوسفند شاهد همچنان فاقد پادتن باقیمانده بود.

بحث

بسیاری از محققینی که در مورد پاتوژنز عفونتهای پستی ویروسی تحقیق کرده‌اند عقیده دارند که پستی ویروسها به نحوی در ایجاد سرکوب ایمنی در نشخوار کنندگان دخالت می‌کنند، این پدیده در مورد عفونت تجربی گاو با ویروس BVD و عفونت گوسفند با ویروس بیماری برادر مورد توجه محققینی مثل بارلو (Barlow) و نلتن (Nettleton) قرار گرفته است (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸، ۱۲، ۱۴). در مورد تأثیرات ویروس BVD بر لوکوسیت‌های خون گوسفند سالم و بالغ به دنبال ایجاد بیماری تجربی استفاده از ویروس BVD تحقیق منتشر شده‌ای

وجود ندارد. لذا با توجه به مستندات قبلی و نتایج حاصل از این تحقیق به روشنی می‌توان ادعان نمود که سویه NADL ویروس BVD با ایجاد اثرات سیتوپاتیک بر لمفوسیت‌های خون گوسفند باعث لمفوپنی مشهود ولی زودگذری در گوسفندان می‌شود، به طوری که جمعیت لمفوسیت‌ها می‌تواند به حد نصف میزان طبیعی تقلیل پیدا کند.

البته به موازات چنین تأثیراتی بر لمفوسیت‌های خون محیطی گوسفند، عوارض بالینی نسبتاً خفیفی در حد افزایش درجه حرارت بدن تا حد ۴۱/۵ درجه سانتیگراد در طی ۴ روز اول پس از تلقیح ویروس، افزایش ضربان قلب و



نمودار ۱ - نتایج حاصل از شمارش سلولهای سفید خون گوسفندان مورد مطالعه بعد از تلقیح ویروس NADL



جدول ۲ - نتایج حاصل از شمارش تفریقی سلولهای سفید خون گوسفندان مورد مطالعه بعد از تلقیح ویروس NADL

گوسفند شماره ۳		گوسفند شماره ۲		گوسفند شماره ۱		روز
نوتروفیل	لمفوسیت	نوتروفیل	لمفوسیت	نوتروفیل	لمفوسیت	
۲۹۲۵	۴۵۷۵	۲۳۴۳	۴۴۷۳	۲۷۲۰	۴۴۱۰	۰
۲۷۵۶	۴۶۱۹	۲۳۹۷	۴۳۰۰	۲۸۰۰	۴۰۶۰	۱
۲۵۴۷	۳۲۱۷	۲۶۴۵	۲۷۰۲	۳۰۹۴	۲۶۲۸	۳
۲۴۴۴	۳۴۷۸	۲۴۷۵	۲۴۷۵	۳۱۲۲	۲۲۶۲	۵
۲۳۴۰	۲۰۲۵	۲۵۶۵	۲۵۰۰	۳۱۹۰	۲۲۰۴	۸
۲۵۵۰	۲۴۴۸	۲۵۴۰	۳۴۲۹	۳۰۷۸	۲۲۲۳	۱۱
۲۴۵۰	۲۴۵۰	۲۵۶۵	۳۸۴۷	۳۵۲۰	۲۵۶۱	۱۴
۲۳۹۷	۲۵۵۰	۲۵۹۲	۳۴۲۰	۳۵۱۰	۲۹۷۰	۱۷
۲۴۳۰	۲۷۰۰	۲۵۶۵	۴۴۷۳	۳۰۸۰	۳۷۸۰	۲۰
۲۲۸۸	۲۷۰۴	۲۱۷۰	۴۳۰۰	۲۶۲۷	۴۱۱۸	۲۳
۲۱۸۰	۲۹۹۷	۲۴۳۱	۴۴۳۳	۲۶۴۶	۴۰۵۷	۳۷
۲۲۶۲	۳۳۶۴	۲۳۹۲	۴۵۶۷	۲۶۸۰	۴۱۳۰	۴۴
۲۳۱۸	۳۸۴۳	۲۵۲۰	۴۳۲۰	۲۴۱۴	۴۲۶۰	۵۱
۲۲۶۹	۳۷۸۲	۲۶۸۲	۴۳۵۰	۲۵۹۳	۴۴۴۰	۵۸
۲۳۸۶	۳۸۰۵	۲۳۴۳	۴۳۳۱	۲۴۸۲	۴۵۲۶	۶۵
۲۴۵۰	۴۴۱۰	۲۳۱۰	۴۳۴۰	۲۷۰۱	۴۳۸۰	۷۲
۲۵۷۱	۴۱۷۰	۲۳۹۷	۴۳۷۱	۲۷۱۹	۴۳۳۶	۸۰
۲۵۲۲	۴۲۲۰	۲۳۱۰	۴۳۴۰	۲۵۱۶	۴۵۸۸	۷۸

حرکات دستگاه تنفس، عوارض دیگری مشاهده نگردید. همچنین با توجه به آزمونهای سرمی و دریافت پاسخ مثبت در حدود روزهای ۴۴ پس از آلودگی می توان دخالت مستقیم ویروس را در ایجاد لمفوبنی ذکر شده تأیید نمود.

References

1. Barlow. R.M. Gardiner, A.C, Nettleton. P.F, The Pathology of spontaneous and experimental mucosal disease like syndrome in sheep recovered from clinical Border disease Journal of Comparative Pathology. 93.3.451, (1983).
2. Becher. P. Orlich. M, Thiel, H.J - Complete genomic sequence of Border disease virus, a pestivirus from sheep - Journal of virology., 72 (6) 5165-5173, (1998).
3. Blood, D.C. and Radostits O.M. Veterinary Medicine 7th edition. Baillier Tindall London, (1989).
4. Burrells. c, Nettleton, P.F, Reid. H.W, Miller. H.R.P, Hopkins. J, McConnell. I - Lymphocyte subpopulations in the blood of sheep persistently infected with Border disease virus - Clinical and experimental immunology - 76. 3. 446, (1989).
5. Entrican G. Hopkins J. MacLean M. McConnell I. Nettleton P.F, Cell phenotypes in the efferent lymph of sheep persistently infected with Border disease virus - clinical and experimental immunology - , 87. 3. 393, (1992).
6. Hussin A.A. Woldehiwet. Z - Replication of Border disease virus in cvine lymphocyte and monocytes invitro - Res in Vet Sci. 95. 2, (1994).
7. Hussin A.A. Woldehiwet. Z - Lymphocyte response to viral antigens phytohaemagglutinin in persistently viremic sheep and lambs experimentally infected with Border disease virus - Veterinary Microbiology - 39. 1/2. 89, (1994).
8. Hussin A.A. Woldehiwet. Z - Effects of experimental infection with Border disease virus on lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of lambs - Res Vet Sci 56. 2. 201, (1994).
9. Loken T. - Border disease in sheep - Vet clinics of north america. food animal practice - Vol 11 3. 576, (1995).
10. Nettleton P.F. Entrican. G. - Ruminant pestivirus - Br Vet J. 151, (1995).
11. Meyers J. Theiel H.J. Molecular characterization of Pestiviruses. Advance in Virus research. 47 53 118, (1996).
12. Nettleton P. F. Gilray J.A. Russo P. Delssi E. - Border disease of sheep and goats - Veterinay research - 29 (3/4), 327 - 340, (1998).
13. Thur B. Hilbe M. Srrasser M. Enresperger F. Immunohistochemical dignosis of pestivirus infection associated with bovine



and ovine abortion and prenatal death. American Journal of Veterinary research., 58. 12, (1997).

14. Woldhewit. A. Hussin A.A. - Distribution of Border disease antigens in lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of experimentally infected lambs - Veterinary immunology and immunopathology - 43 (4), 389 - 400 (1994).

15. Woldhewit Z. Hussin A.A. - Cytotoxic T cell response in lambs experimentally infected with Border disease virus - Veterinary immunology and immunopathology - 41 (3 - 4,) 201 - 209, (1994).

16. Zaghawa A. Prevalence of antibodies to bovine viral Diarrhoea virus and/or border disease virus in domestic ruminants. Journal of Veterinary medicine Series B. 45. 6. (1998).

Effects of NADL strain of BVD virus on sheep white blood cells

Keyvanfar, H.,¹ Hemmatzadeh, F.¹

¹*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran-Iran.*

This research was carried out on 4 seronegative native sheep to pestiviruses around the age of 3.5 - 5 years. 3 of animals were injected via. I.M with amount of 2×10^7 TCID₅₀ NADL strain of BVD virus, one sheep was kept as control. In all three infected sheep the leukopenia started the day after injection and reached a peak on 5-8 days post infection. The lymphocytes were the mostly affected cells. Also an elevated temperature (41.5° C) was seen in infected sheep and lasted for 3-4 days. There was no obvious effects of the virus on respiratory and digestive tracts. The control sheep didn't show any abnormality in WBC count and clinical examination. 44 days post infection all 3 sheep under experiment had developed antibodies against pestivirus (SN and ELISA test).

Key words: Pesti virus, Border disease, Bovine viral diarrhea, White blood cells, NADL strain.

