

## بررسی کشتارگاهی میزان شیوع آلودگی به ویروس لوکوز آنزوتیک گاو و اختلالات بالینی، هما تولوژیک و فلوسایتومتریک همراه در گاوهای هلشتاین در تهران

محمد طلوعی<sup>۱\*</sup>، تقی پور بازرگانی<sup>۲</sup>، غلامرضا نیکبخت بروجنی<sup>۳</sup>، زهره خاکی<sup>۲</sup>، سعید بکائی<sup>۴</sup>، ایرج اشرفی<sup>۳</sup>

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 ۱۳۸۵، پذیرش نهایی: ۷ خرداد ماه ۱۳۸۶)

### چکیده

ویروس لوکوز گاوی، 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 شاخص های بالینی، هما تولوژیک 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 اخذ شده 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 ( $p < 0.001$ ). تفاوت معنی داری بین میزان آلودگی در دام های واجد انواع اختلالات بالینی یا آسیب های درشت بینی و گاوهای به ظاهر سالم وجود داشت ( $p < 0.001$ ). 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 دام های استرس دار، به علت احتمال تغییرات ثانویه در شاخص های خونی آنها، در گاوهای آلوده تعداد کل گلبول های سفید بیشتر ( $p < 0.05$ ) و درصد لمفوسیت های (CD4+)T، کمتر ( $p < 0.05$ ) از دام های غیر آلوده بود. همچنین در دام های آلوده، ارتباط معنی دار مثبتی بین تعداد لمفوسیت های (CD21+)B با تعداد مطلق گلبول های سفید و درصد کل لمفوسیت ها، مشاهده گردید. مطالعه حاضر، شیوع بالای آلودگی با ویروس لوکوز گاو در دام های مورد بررسی و درصد پائین سلول های CD4+ در گاوهای آلوده به این ویروس نسبت به دام های غیر آلوده را نشان داد.

واژه های کلیدی: ویروس لوکوز آنزوتیک، گاو هلشتاین، آزمون الایزا، متغیرهای خونی، فلوسایتومتری.

### مقدمه

لوکوز آنزوتیک گاو، عفونتی سیستمیک می باشد که توسط ویروسی از جنس دلتا رتروویروس متعلق به خانواده رتروویریده ایجاد می شود (۲۷، ۲۳). ژنوم این ویروس، RNA تک رشته ای خطی سنس مثبت به صورت دیپلوئید با دو رشته معکوس بوده که ۱۰-۷ کیلو باز 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 نامشخص بود و تنها آن را به عنوان یک بیماری عفونی می شناختند 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 می گردد (۲۳، ۱۲). ویروس لوکوز، لمفوسیت ها را آلوده کرده و سبب تکثیر، تزیاد و رشد نئوپلاستیک آنها می شود که اغلب ارگان های بدن را در بر می گیرند (۲۳، ۱۵). تومورها در این بیماری ممکن است در عقده های لمفاوی محیطی شکل گرفته یا به ارگان های داخلی بدن محدود گردند (۲۷). توموری شدن بافت ها در این بیماری در گاو تحت اسامی مختلفی مانند لوکوز، لمفوسارکوم و لمفومای بدخیم شناخته می شود (۲۳). لوکوز گاو به دو صورت انفرادی و واگیردار تعریف شده که صورت دوم آن به لوکوز آنزوتیک گاو معروف

است که شکل معمول بیماری در گاوهای بالغ بوده و با انتقال لمفوسیت های آلوده از یک دام به دام دیگر سرایت می کند و می تواند با پاسخ پادتن در تمام دام های آلوده و در موارد کمتر (در حدود ۳۰-۲۰ درصد گاو ان آلوده) شکل گیری لمفوسیتوزیس پایدار و در حدود ۵ درصد موارد با لمفوسارکوم و نئوپلازی که کشنده ترین شکل و مرحله نهایی عفونت با این ویروس می باشد خود نمایی کند (۲۷، ۱). لوکوز انفرادی گاو ان می تواند به شکل لوکوز دام های جوان در گوساله های زیر ۶ ماه، لوکوز تیموسی دام های زیر دو سال یا لوکوز پوستی گاوهای ۳ 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 تیترا پادتن علیه ویروس لوکوز، به عنوان منابع ویروس تلقی می گردند چرا که گاوهای آلوده در طول عمر خود ویروس را در لمفوسیت های محیطی خود حمل می نمایند (۲۷، ۱). روش های انتقال بیماری بصورت افقی از طریق تماس های بسیار نزدیک فیزیکی، مواد یا وسایل آلوده به خون، از جمله: سرنگ های آلوده، وسایل کمکی زایشگاه، لوازم شاخ بری، دستکش های معاینه از راه راست روده ای و عمودی شامل جابجایی ویروس از مادر آلوده به جنین یا مصرف ماک و شیر مادر آلوده، عمده ترین راه های انتقال بیماری هستند. ویروس در لمفوسیت ها موجود بوده و لذا در شیر، خون، توده های توموری، ترشحات واژنی، جفت و ترشحات اکسودایی



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 نمونه‌گیری:** حداقل تعداد نمونه بر اساس سطح اطمینان ۹۵ درصد و میزان شیوع در منابع بررسی شده و دقت (حد اشتباه) ۶ درصد، ۱۸۰ نمونه تعیین گردید. نمونه‌های خونی مورد نیاز برای انجام این تحقیق، در فاصله زمانی اوایل پاییز تا اواخر زمستان ۱۳۸۴، از ورید وداجی، ۱۹۷ گاو هلشتاین کشتار شده در کشتارگاه میثم تهران در پنج گروه سنی واجد صفر الی چهار زوج دندان بالغ بصورت تصادفی خوشه‌ای، به تعداد تقریباً مساوی در هر گروه سنی تهیه شد. برای هر دام، سرنگ و سوزن نو استفاده می‌شد. جهت تهیه سرم، نمونه‌های خونی در لوله‌های ونوجکت بدون ماده ضد انعقاد و به منظور مطالعه هماتولوژیک و فلوسایتومتری در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید (EDTA) جمع‌آوری می‌شدند. در معاینه 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 در سه گروه لاغر، متوسط و چاق، به ترتیب با وضعیت بدنی ۱-۲، ۳/۵-۲/۵ و ۴-۵ تقسیم‌بندی شدند. علاوه بر بررسی شاخص‌های خونی و فلوسایتومتری در گاوهای آلوده و غیر آلوده در کل جمعیت ۱۹۷ راسی مورد مطالعه (جمعیت شماره ۱)، با حذف گاوهای واجد اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت بینی، به علت احتمال تغییر مقادیر طبیعی فاکتورهای خونی در آنها و همچنین گاوهای واجد لکوسیتوزیس توام با نوتروفیلی به عنوان دام‌های استرس دار (۲۷) از کل جمعیت، شاخص‌های 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 شماره ۲)، مجدداً مورد مطالعه قرار گرفتند.

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). در گذشته قبل از شناسایی ویروس عامل و ارایه روش‌های تشخیص آزمایشگاهی مطمئن، تنها ابزار تشخیص دام‌های آلوده، روش‌های هیستوپاتولوژیک و هماتولوژیک بودند در حالی که امروزه از روش‌های سرولوژیک از جمله ایمنوادیفیوزیون روی ژل آگارز (AGID)، رادیو ایمنواسی (RIA)، الایزا (ELISA)، ایمنوپراکسیداز (PLA)، وسترن بلائینگ (WB)، خشتی سازی ویروس (VN) ویا واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) استفاده می‌کنند (۱۰، ۱۶، ۲۲، ۳۱، ۳۶). برای جدا سازی ویروس از لمفوسیت‌های آلوده، باید ویروس در سلول‌های طحال بره کشت داده شده و در صورت رشد، با روش‌هایی چون پادتن فلورسنت (FA)، میکروسکوپ الکترونی، الایزا یا رادیو ایمنواسی، مشخص گردد، البته با توجه به گران تمام شدن آزمایش کشت بافت، معمولاً آزمایش‌های سرمی ترجیح داده می‌شوند (۶، ۲۲، ۳۱). از آنجایی که هیچ واکنش 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 جدا سازی گاوهایی که نسبت به این ویروس، پاسخ پادتنی مثبت دارند، امکان پذیر است (۱، ۲۷). در نتیجه بررسی‌های سرولوژیک، زمینه‌های اساسی برنامه‌ریزی موثر ریشه کنی بیماری را فراهم می‌آورند (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 ایمنوادیفیوزیون روی ژل آگار، ساده‌ترین روش سرولوژیک 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، احتمالاً به علت تغییرات پادگنی ویروس، ردیابی پادتن به این روش امکان‌پذیر نخواهد بود (۶، ۲۲، ۳۱). اخیراً 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 (۱۰، ۲۴، ۳۶). P24 و gp51 اصلی‌ترین 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 در خون 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 منوکلونال لکوسیتی انجام گرفته است،



از کیت تهیه شده از شرکت Daco Cytomation آمریکا، و دستورالعمل ارائه شده آن انجام گردید: پس از اضافه کردن نمونه‌های خون تازه واجد ماده ضدانعقاد به هر یک از پادتن‌های منوکلنال کوئزوگه CD4، CD8، CD21 و کوئزوگه‌های کنترل منفی CD21 CO- و CD4، CO- در لوله‌های مخصوص پلی استیرنی و لیز گلبول‌های های قرمز خون با بکارگیری محلول لیز A و B، با سانتریفوژ نمودن نمونه‌ها در دور ۳۰۰×g، گلبول‌های سفید در ته لوله‌ها رسوب و با دو بار شستشوی آنها با محلول ایزوتونیک PBS و هر بار ۱۰ دقیقه آنکوباسیون در تاریکی، سلول‌های سفید نشاندار شده با پادتن‌های منوکلنال کوئزوگه، بدست می‌آیند که با اضافه نمودن محلول فیکساتور (PBS) و پارافرمالدئید به نسبت ۱:۶۰، سلول‌ها، ثابت شده و در دمای ۴ درجه 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+ (T کمکی)، CD8+ (T سرکوبگر، 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 و تحلیل آماری: بررسی آماری نتایج با استفاده از نرم افزار spss و بکارگیری آزمون مربع کای با سطح اطمینان ۹۵ درصد 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 کولموگوراسمیرنواز 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 الیزا gp51، در جدول آمده است. ب- ارتباط بین سن، جنس و درجه وضعیت بدنی با میزان آلودگی: توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به ویروس لوکوز بر اساس نتایج حاصل از آزمون الیزا 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

ب- بررسی سرولوژی: برای شناسایی پادتن‌های ضد ویروس لوکوز در خون محیطی گاوهای مورد مطالعه، از آزمایش الیزا استفاده گردید. برای این منظور تمام نمونه‌ها با کیت الیزای 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. گوده‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای الیزا، قبلاً با پادگن‌های gp51 ویروس پوشیده شده‌اند. نمونه‌های سرم مورد آزمایش و سرم‌های مرجع منفی و مثبت پس از رقیق سازی به نسبت ۴ به ۱۰۰ با محلول بافر توئین PBS (محلول نمکی بافر فسفات حاوی ۲/۰ درصد توئین ۲۰ و ۰/۰۱ درصد تیومرسال) به میکرو پلیت‌های الیزا اضافه شدند. میکرو پلیت‌های ستون‌های فرد با پادگن gp51 ویروس لوکوز و ستون‌های زوج با پادگن کنترل منفی پوشیده شده‌اند. بدنبال آنکوباسیون پلیت الیزا در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت و سه مرتبه شستشوی میکروپلیت‌ها با محلول رقیق کننده، ابتدا آنتی گلوبولین کوئزوگه گاوی با پراکسیداز و سپس محلول سوپسترا (تترامیتیل بنزیدین محلول در بافر حاوی پراکسید هیدروژن) به تمام میکرو پلیت‌ها اضافه گردیده و با تاثیر کوئزوگه آنزیم‌روی سوپسترا، 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 از دستگاه قرائت کننده الیزا مدل Stat fax 2100, USA روی طول موج ۴۵۰ نانومتر، 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 الیزامینی 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 توماو 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 مؤین و دستگاه سانتریفوژ میکرو هماتوکریت مدل Hawksley، سنجیده شدند.

ت- پادتن‌های منوکلونال و بررسی فلوسایتومتری (Flow Cytometry): پانلی از پادتن‌های منوکلونال کوئزوگه موشی (antibovine:FITC) (Mouse) شامل: MCA1653F (ضدگیرنده‌های CD4 گاوی)، MCA837F (ضدگیرنده‌های CD8 گاوی) و MCA1424F (ضدگیرنده‌های CD21 گاوی)، به عنوان پادتن‌های اصلی و دو نوع پادتن منوکلونال کوئزوگه (-CD21 CO- و CD4، CO- Mouse IgG2 negative control) به عنوان پادتن‌های کنترل منفی، تهیه شده از شرکت Serotec انگلستان، استفاده شدند. این پادتن‌ها، ایمنوگلوبولین G خالص شده موشی (IgG2) کوئزوگه با فلورسین ایزوتیوسیانات (FITC) می‌باشند. ویژگی این پادتن‌های منوکلونال، در بررسی‌های مختلفی، مورد تأیید قرار گرفته است (۹، ۳۴). لیز گلبول‌های قرمز، آماده سازی نمونه‌ها و رنگ آمیزی ایمنو فلورسنت سلول‌ها با استفاده



جدول ۴- نتایج حاصل از شمارش کلی و تفریقی گلبول‌های سفید، ارزیابی سایر شاخص‌های 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)		
	Max	Min	Mean±SE	Max	Min	Mean±SE
هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	۱۲/۴۹±۰/۵۲	۶/۸	۲۵/۶	۱۱/۶۳±۰/۱۹	۶/۸	۱۸/۵
هماتوکریٹ (درصد)	۳۱/۴۰±۰/۸۲	۲۱	۴۵	±۰/۴۱ ۳۲/۳۷	۲۰	۴۶
شمارش لکوسیت (در میکرولیتر)	±۱۲۳۶ ۱۳۰۰۲/۲۷	۳۲۵۰	۴۶۵۰۰	±۳۷۰/۷ ۱۱۱۴۸/۳۷	۱۰۰۰	۲۷۵۰۰
لمفوسیت (درصد)	±۲/۲۷ ۵۲/۹۵	۱۶	۸۰	±۱/۱۵ ۵۲/۶۶	۲۲	۹۰
لمفوسیت CD21 (درصد)	۷/۱۷±۰/۹	۰/۵	۲۵/۴	۶/۸±۰/۴	۱	۲۳/۸
لمفوسیت CD4 (درصد)	۳۴/۲±۱/۹	۸/۹	۵۶/۴	۳۶/۵±۰/۸	۰/۲	۵۸
لمفوسیت CD8 (درصد)	±۲/۲۷ ۴۳/۱۶	۱۴	۴۴/۹	±۰/۸ ۲۷/۹	۹/۲	۶۴/۸
نوتروفیل (درصد)	±۲/۲۷ ۴۳/۱۶	۱۴	۸۳	±۱/۲۱ ۴۳/۱	۵	۷۶
مونوسیت (درصد)	۱/۸۴±۰/۲۷	۰	۷	۱/۷۹±۰/۱۴	۰	۱۰
اوتروفیل (درصد)	۱/۷±۰/۳	۰	۸	۲/۳۴±۰/۳۱	۰	۱۸

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 فلوسایتومتریک	واجد آلودگی با الایزا (n=۲۵)			فاقد آلودگی با الایزا (n=۱۱۸)		
	Max	Min	Mean±SE	Max	Min	Mean±SE
شمارش لکوسیت (در میکرولیتر)	۱۲۰۹۴±۱۱۵۳	۵۵۰۰	۲۸۵۰۰	۱۰۲۳۸±۳۵۴	۱۵۰۰	۲۷۵۰۰
لمفوسیت (درصد)	۵۹/۳±۲/۳	۳۳	۸۰	۵۶/۲±۱/۱	۲۲	۸۱
نوتروفیل (درصد)	۳۶/۵±۲/۳	۱۴	۶۴	۳۹/۵±۱/۲	۱۳	۷۴
لمفوسیت D21 (درصد)	۶/۳±۰/۹	۱/۵	۱۵/۱	۷/۸±۰/۵	۱	۲۳/۸
لمفوسیت D4 helper (درصد)	۳۰/۳±۲/۵	۸/۹	۴۴/۶	۳۵/۶±۱	۰/۲	۵۸
لمفوسیت D8 T supp (درصد)	۲۵/۲±۲/۹	۳/۳	۴۳/۱	۲۶/۲±۰/۹	۹/۲	۶۴/۸

ث- ارزیابی شاخص‌های هماتولوژیک و فلوسایتومتریک در جمعیت شماره ۲: با حذف گاوهای واجد اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت‌بینی (۳۷ راس) و گاوهای استرس دار (۱۷ راس) از جمعیت کل دام‌ها، نتایج ارزیابی هماتولوژیک، فلوسایتومتری و نتایج آنالیز آماری آنها در ۱۴۳ راس گاو باقیمانده آلوده و غیر آلوده به ویروس (جمعیت شماره ۲) در جدول ۵ خلاصه

جدول ۱- 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	
زوجه	مطلق و نسبی فراوانی دام‌های آلوده	جمع نمونه	مطلق و نسبی فراوانی دام‌های آلوده	جمع نمونه	جنس	جمع نمونه
۰	۶ (۱۵/۸ درصد)	۳۸	۹ (۳۷/۵ درصد)	۲۴	نر	۴۵
۱	۳ (۸/۳ درصد)	۳۶	۲۲ (۱۷/۷ درصد)	۱۲۴	ماده	۱۵۲
۲	۷ (۱۷/۵ درصد)	۴۰	۱۳ (۲۶/۵ درصد)	۴۹	جمع	۱۹۷
۳	۱۳ (۳۱ درصد)	۴۲	۳۶ (۲۶/۵ درصد)	۱۹۷	جمع	۱۹۷
۴	۱۵ (۳۶/۶ درصد)	۴۱	۴۴ (۲۲/۳ درصد)	۱۹۷	جمع	۱۹۷
جمع	۴۴ (۲۲/۳ درصد)	۱۹۷	۴۴ (۲۲/۳ درصد)	۱۹۷	جمع	۱۹۷

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 درشت‌بینی و آنالیز آماری آنها.

اختلالات بالینی یا آسیب‌های درشت‌بینی	دارد	ندارد	جمع کل
دارد	۱۵ (۴۰/۵ درصد)	۲۹ (۱۸/۱ درصد)	۴۴ (۲۲/۳ درصد)
ندارد	۲۲ (۵۹/۵ درصد)	۱۳۱ (۸۱/۹ درصد)	۱۵۳ (۷۷/۷ درصد)
جمع کل	۳۷ (۱۰۰ درصد)	۱۶۰ (۱۰۰ درصد)	۱۹۷ (۱۰۰ درصد)

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

ت- ارزیابی شاخص‌های هماتولوژیک و فلوسایتومتریک در جمعیت شماره ۱: نتایج بررسی هماتولوژیک، آنالیز فلوسایتومتری از جمله: درصد زیر گروه‌های CD21+, CD8+, CD4+ لمفوسیت‌ها و نتایج تجزیه و تحلیل آماری آنها در ۱۹۷ راس گاو آلوده و غیر آلوده به ویروس لوکوز (جمعیت شماره ۱) در جدول ۴ آمده است.



جدول ۶- نتایج مربوط به درصد های تحت گروه های مختلف لمفوسیتی در گاو های سالم جوان، سالم بالغ و بالغ آلوده به ویروس لوکوز.

گروه دام ها شاخص فلوسایتومتري	گاو های جوان غير آلوده Mean± SE	گاو های بالغ غير آلوده Mean± SE	گاو های 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 گلبول های سفید و درصد لمفوسیت های گروه دام های آلوده به ویروس لوکوز- واجد لمفوسیتوز با دام های آلوده فاقد لمفوسیتوز و دام های غیر آلوده در جمعیت ۱ و ۲ و نتایج تجزیه و تحلیل آماری آنها. داده های جدول بصورت { (تعداد) انحراف معیار ± میانگین } مشخص شده اند.

گروه دام ها شاخص خونی	گروه آ گاو های آلوده واجد لمفوسیتوز	گروه آ گاو های آلوده فاقد لمفوسیتوز	گروه ۳ گاو های غير آلوده	آنالیز آماری
تعداد گلبول سفید در جمعیت ۱ (۱۹۷)	۱۴۷۵۰±۲۰۳۶ (۹)	۱۳۴۱۰±۱۳۴۰ (۳۵)	۱۱۱۴۸±۳۷۰ (۱۵۳)	بین گروه ۱ و ۲: ۰.۰۵ < p < ۰.۰۱ بین گروه ۱ و ۳: ۰.۰۱ < p < ۰.۰۰۱
درصد لمفوسیت در جمعیت ۱ (۱۹۷)	۷۴±۱/۲ (۹)	۴۸±۲ (۳۵)	۵۲/۶±۱/۱ (۱۵۳)	بین گروه ۱ و ۲: ۰.۰۰۱ < p < ۰.۰۰۱ ۱ و ۳: ۰.۰۰۱ < p < ۰.۰۰۱
تعداد گلبول سفید در جمعیت ۲ (۱۴۳)	۱۶۵۰۰±۲۸۴۵ (۶)	۱۰۷۰۲±۱۰۸۴ (۱۹)	۱۰۲۳۸±۳۵۴ (۱۱۸)	بین گروه ۱ و ۲: ۰.۰۱ < p < ۰.۰۰۵ بین گروه ۱ و ۳: ۰.۰۰۱ < p < ۰.۰۰۵
درصد لمفوسیت در جمعیت ۲ (۱۴۳)	۷۳/۳۳±۱/۶ (۶)	۵۴/۸±۲/۸ (۱۹)	۵۶/۲۲±۱/۱ (۱۱۸)	بین گروه ۱ و ۲: ۰.۰۰۱ < p < ۰.۰۰۵ بین گروه ۱ و ۳: ۰.۰۰۱ < p < ۰.۰۰۵

شده است.

**ج- مقایسه شاخص های فلوسایتومتري (درصد تحت گروه های مختلف لمفوسیتی) در گاو های جوان غير آلوده، بالغ غير آلوده و بالغ آلوده به ویروس لوکوز:** نتایج حاصل از مقایسه درصد های تحت گروه های مختلف لمفوسیتی در گاو های سالم جوان، سالم بالغ و بالغ آلوده به ویروس لوکوز در جدول ۶ خلاصه شده اند.

**د- مقایسه تعداد گلبول های سفید و درصد لمفوسیت ها در گاو های غير آلوده و آلوده واجد و فاقد لمفوسیتوز یس:** نتایج حاصل از مقایسه تعداد گلبول های سفید و درصد لمفوسیت های گروه دام های آلوده به ویروس واجد لمفوسیتوز با دام های آلوده فاقد لمفوسیتوز و دام های غير آلوده در هر دو جمعیت ۱ و ۲ در جدول ۷ خلاصه شده اند.

### بحث

در بررسی سرواپیدمیولوژیکی که توسط همکاران موسسه رازی در سال ۱۳۷۵ روی سرم های گاو های اصیل کشتار شده استان های مختلف ایران بروش ایمنودیفوزیون انجام پذیرفت، ۱/۷ درصد از کل نمونه های اخذ شده

از استان های مختلف کشور، آلوده به ویروس لوکوز گاو بودند که بیشترین آلودگی نیز در استان تهران و آذربایجان شرقی (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 گاو های اصیل، دو رگ و بومی مورد مطالعه، واجد آلودگی سرولوژیکی با آزمایش ایمنودیفوزیون بودند، که بیشترین شیوع در گاو های اصیل با ۱۷/۵ درصد آلودگی (۱۶ مورد مثبت از ۹۶ راس گاو) مشاهده گردید (۱۰). در مطالعه ممتاز و همکاران در گاو داری های استان چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۸۲، ۵/۷ درصد گاو ها با آزمون الیزا gp51، نسبت به ویروس لوکوز آلودگی داشتند (۲۲). در مطالعه حاضر میزان آلودگی به ویروس لوکوز با آزمون الیزا gp51 ۲۲/۳ درصد برآورد شد (جدول ۱). در اکثر کشورهای دنیا عفونت با ویروس لوکوز گاو ها، 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 گزارش های گسترش آلودگی در هر کشوری بر اساس آزمون های 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 در این مطالعه (۲۲/۳ درصد)، مشابه گزارش های منتشر شده از این کشورهاست. البته در برخی نقاط دنیا از جمله بعضی از کشورهای اروپای غربی، بیماری ریشه کن شده است یا میزان شیوع آن بسیار پایین بوده و به ندرت به بالای ۱/۵ درصد می رسد (۳۶، ۲۷، ۱۰، ۱۵). 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 اولاً بررسی های قبلی در کشور از نظر منطقه یا استان مورد نظر با این مطالعه متفاوت بوده و اکثرا در سطح فارم صورت گرفته اند که می توانند از علل این اختلاف نتایج شمرده شوند و ثانیاً در بررسی های قبلی جهت جستجوی پادتن های ضد ویروس لوکوز، بیشتر از روش سرولوژیکی ایمنودیفوزیون روی ژل آگار بهره برده اند، در حالی که در این مطالعه از روش الیزا استفاده گردیده است و با توجه به اینکه الیزا در بررسی های سرواپیدمیولوژیکی روی لوکوز، نسبت به سایر روش های سرولوژی از جمله ایمنودیفوزیون روی ژل آگار، بسیار حساس تر عمل کرده و حتی دام هایی را که در مراحل ابتدایی عفونت هستند، تشخیص می دهد (۳۳، ۱۶، ۴). 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 الیزا، در تشخیص آلودگی سرولوژی گاو ها در یک مطالعه، ۱۹/۲ درصد گاوان باروش الیزا 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 بررسی های خویش، با دلایلی همچون، سیستم یا



از گاوهای ریز جثه 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 آنتی بادی 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 پروراندی‌ها، تماس فیزیکی نزدیک آنها و بهداشت پایین می‌باشد. در این بررسی، با اینکه دام‌های لاغر با درجه وضعیت بدنی ۲-۱/۵، بیشترین درصد آلودگی به ویروس را در بین گاوها دارا بودند (جدول ۲)، ولی در تجزیه و تحلیل آماری، رابطه معنی داری 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 (۴۰/۵ درصد) آلوده به ویروس لوکوز تشخیص داده شدند (جدول ۳)، تجزیه و تحلیل آماری حاکی از حضور رابطه معنی داری بین وجود اختلال بالینی یا آسیب درشت بینی در گاوها و آلودگی آنها با ویروس لوکوز بود ( $p < 0.001$ ).

تجزیه و تحلیل آماری نتایج بررسی هماتولوژی نشان داد که در ۱۹۷ گاو مورد مطالعه (جمعیت شماره ۱)، متوسط تعداد کل گلبول‌های سفید و درصد کل لمفوسیت‌ها، در گاوهای آلوده به لوکوز، بطور جزئی بیشتر از گاوهای غیر آلوده بودند (جدول ۴) با این حال با آزمون آماری T-Test هیچ اختلاف معنی داری 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 در گاوهای 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 و نظر به تاثیر این عوارض در شاخص‌های هماتولوژیک چنین دام‌هایی (۱، ۲۷)، فقدان اختلاف معنی دار 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 معنی داری پیدا نمودند طوری که در گروه اول بیشتر از گروه دوم بود ( $p = 0.049$ ) ولی باز هم اختلافی در درصد لمفوسیت و نوتروفیل دیده نشد (جدول ۵). 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

مدیریت پرورش متراکم و بسته گاوها و در نتیجه تماس‌های 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 یا تروئیک مهم مرتبط دانسته‌اند (۲۰، ۳۰)، که احتمالاً حضور تعداد زیاد گاوهای صنعتی بزرگ با سیستم پرورش بسته در کل و کم‌تایی توجهی به بهداشت در این ارتباط در نواحی 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 در گاوهای کشتاری در این مطالعه و مقایسه آن با مطالعات قبلی در ایران، احتمال این نیز می‌رود که در عرض سال‌های اخیر، میزان آلودگی گاوها به ویروس لوکوز در کشور 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، در کشور 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 اصالتاً با شرایط مساعد جابجا شدن ویروس در داخل و بین گله‌ها در سطح کشور، مرتبط می‌گردد و با واردات دام، ارتباطی ندارد.

در این مطالعه، میزان آلودگی در گاوهای نر، ۲۰ درصد و در گاوهای ماده ۲۳ درصد بر آورد گردید (جدول ۲)، که در تجزیه و تحلیل آماری، رابطه معنی داری بین آلودگی و جنسیت دام مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). در مطالعات دیگر نیز ارتباط معنی داری بین جنسیت گاو و آلودگی سرمی به ویروس لوکوز مشاهده نشده است (۵، ۱۵، ۲۲، ۲۶). البته شیوع بیماری در گاوهای شیری را بیشتر دانسته‌اند که احتمالاً این اختلاف با بالاتر بودن سن متوسط گاوهای شیری و نزدیک بودن آنها به یکدیگر در جایگاه‌های پروری، مرتبط بوده و ارتباطی با جنسیت دام نداشته باشد (۲۷، ۳۷). بیشترین و کمترین شیوع آلودگی به ترتیب در گروه سنی واجد زوج دندان بالغ (با بیش از ۵ سال سن) (۶/۳۶ درصد) و یک زوج دندان بالغ (۳/۸ درصد) مشخص گردید (جدول ۲) و به جز در گاوهای بدون دندان بالغ، با افزایش سن دام شیوع آلودگی نیز افزایش یافته بود ( $p < 0.001$ ) در بررسی‌های انجام گرفته دیگران نیز به موازات افزایش سن، افزایش آلودگی مشاهده شده است (۳۹، ۲۶، ۲۲، ۱۵، ۷، ۵). در مطالعه حاضر میزان شیوع آلودگی در گاوهای زیر ۲ سال (بدون دندان بالغ) بیشتر از دام‌های ۲ ساله (واجد یک زوج دندان بالغ) بود (جدول ۲)، این در حالی است که آلودگی در گاوهای زیر ۲ سال را کمتر گزارش می‌نمایند (۲۷، ۱۷، ۱). در برخی مطالعات انجام یافته، میزان شیوع آلودگی سرولوژی گوساله‌های تا ۶ ماه سن، بیشتر از گاوان جوان زیر ۲ سال بوده است که ناشی از عبور 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 در بررسی دام‌های کشتاری این مطالعه سعی می‌شد برای خارج کردن جمعیت گوساله‌های زیر ۶ ماه از مطالعه، در دام‌های بدون دندان بالغ



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 (جدول ۵ و ۴)، حاکی از افزایش درصد سلول های B در دام‌های آلوده به ویروس لوکوز با افزایش تعداد مطلق گلبول های سفید و افزایش لمفوسیت‌ها در آنها می‌باشد ( $p < 0.005$ ). چون سلول های B تنها سلول های 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 لمفوسیت های 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 معنی داری در درصد سلول های مذکور در گروه‌های مربوطه مشاهده نشد، ولی مقایسه میانگین درصد های این سلول‌ها در گروه‌های دامی (جدول ۶) 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 می‌دهد (۳۸).

آزمون الیزا و تست هماتولوژیک، بصورت توأم روش قابل اطمینان و حساسی در مطالعات سرواپیدمیولوژیکی آلودگی به ویروس لوکوز هستند (۱۶)، البته باید مد نظر قرار داد که ممکن است علائم آلودگی و وجود ویروس در سلول‌ها، پادتن تولید نشده و چنین دام‌هایی در آزمون سروولوژی پاسخ منفی نشان دهند (۸)، لذا استفاده توأم آزمون‌های سروولوژی برای ارزیابی پادتن‌های سرمی و تست‌های 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، کمتر از 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 و کنترل آن، اقدامات کنترلی و حتی برنامه‌های ریشه‌کنی بیماری در ایران و حتی سایر کشورهای در حال توسعه، بعمل آید. در غیاب واکسیناسیون موثر، اساس ریشه‌کنی بیماری که در کشورهای دیگر استفاده می‌شود، تست سروولوژی و جداسازی (حذف) دام‌های مثبت، تست سروولوژی دام‌های تازه وارد به گله‌ها و رعایت روش‌های صحیح اقدامات و کارهای دامپزشکی از جمله بکارگیری صحیح سوزن‌های واکسیناسیون، تزریق، دستکش‌های معاینه‌راست روده‌ای و سایر روش‌های

مطالعه‌ای تعداد لکوسیت‌های گاوهای آلوده به لوکوز در مناطق واجد آلودگی‌های صنعتی بویژه با فلورین، حتی کمتر از محدوده طبیعی نیز بوده است (۲۴)، لذا ممکن است بالا نبودن زیاد تعداد لکوسیت‌های گاوهای آلوده به ویروس لوکوز در این مطالعه نیز ( $p = 0.049$ )، 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 ۷۵ درصد لمفوسیت در شمارش تفریقی سلول‌های خونی به عنوان دام‌های مبتلا به لمفوسیتوزیس محسوب می‌گردند (۱،۲۷)، تعداد گلبول‌های سفید خون و درصد لمفوسیت‌های دام‌های آلوده به ویروس واجد لمفوسیتوزیس، بالاتر از دام‌های آلوده بدون لمفوسیتوزیس و دام‌های غیر آلوده بودند (جدول ۷). این نتایج مشابه با یافته‌های گزارش‌های دیگر می‌باشد (۲،۳). آنالیز آماری نتایج بررسی فلوسایتومتری در جمعیت شماره ۲ گاوهای مورد مطالعه (جدول ۵)، نشان داد که درصد لمفوسیت‌های T (CD4+) در گاوهای آلوده به ویروس لوکوز، کمتر از دام‌های غیر آلوده بود ( $p < 0.05$ ) و هیچ اختلافی در درصد 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 سروولوژیک 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 عمدتاً در گاوهای آلوده مبتلا به لمفوسیتوزیس پایدار، گزارش نموده‌اند (۱،۲،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 لمفونی 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 شدیداً پایین بودن تعداد گاوهای آلوده مبتلا به لمفوسیتوز در این مطالعه (۲ راس برابر با ۵/۵ درصد کل جمعیت ۴/۵ درصد گاوهای آلوده)، بالا نبودن درصد سلول‌های B در دام‌های آلوده نسبت به دام‌های غیر آلوده کاملاً 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 سلول‌های لمفوسیتی در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت در میزان گسترش ویروس لوکوز در بدن دام‌های مختلف باشد. علت این تفاوت‌ها، ریشه در نژاد، تغذیه،



## References

1. Andrews, A.H., Blowy, W., Boyd, H., Eddy, R.G. (2003) Bovine medicine. (2<sup>th</sup> 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 immunoblotting 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 leukosis 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 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 کاملاً 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 می‌نمایند.

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 conditions 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.





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*. (2<sup>nd</sup>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*. (3<sup>rd</sup>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*. (9<sup>th</sup>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 antibodies lack of transatlantic 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., Zerim, 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.



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.



# 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.<sup>1\*</sup>, Bazargani, T.T.<sup>2</sup>, Broujeni, G.N.<sup>3</sup>, Khaki, Z.<sup>2</sup>, Bokaei, S.<sup>4</sup>, Ashrafeei, I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.

<sup>2</sup>Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

<sup>4</sup>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 cytometry.

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

