



تزریق گردید. در این گوساله روز سوم پس از تزریق افزایش درجه حرارت بدن (۴۰ درجه سانتی‌گراد) و یک هفته بعد ظهور پرخونی و ایجاد ضایعاتی در روی لته‌های بالا و پایین مشخص گردید. از این ضایعات سوآپ تهیه شد که پس از آماده‌سازی به سلول حساس (RBK) تلقیح گردید و مجدداً هرپس و ویروس تیپ دو جدا شد. ضایعات ایجاد شده به تدریج و پس از دو هفته بهبود یافت. تزریق ویروس از طریق پستانی به دو رأس گاو شیرده که حاوی پادتن علیه هرپس ویروس تیپ دو بودند، هیچگونه ضایعاتی ایجاد نکرد.

چکیده
در اسفند ماه ۱۳۷۵ از نمونه زخم پستان گاو مربوط به گاوداری صنعتی اطراف تهران که به بخش ویروس‌شناسی مؤسسه رازی ارسال شده بود، پس از چند پاساژ مکرر روی سلول کلیه گوساله (RBK) ویروسی جدا گردید که مطالعات بعدی نشان داد که ویروس جدا شده از گروه و خانواده هرپس ویروسها می‌باشد. ویروس جدا شده در مرحله بعد با آنتی‌سرم هرپس ویروس تیپ دو گاو مورد آزمایش خنثی شدن سرم (S.N.) قرار گرفته و خنثی گردید. ویروس جدا شده از طریق وریدی به یک رأس گوساله حساس و فاقد پادتن



تصویر شماره ۱ و ۲ - جراحات پستان

پژوهش و سازندگی، شماره ۳۷، زمستان ۱۳۷۶

جداسازی هرپس ویروس تیپ دو از یک گاوداری در اطراف تهران

● روحانی کارگر مؤخر* ● پرویز اهورایی* ● محمد حسامی* ● بهروز قابوسی* ● پرویز هورشتی** ● وحید چایچی***

* اعضاء هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی

** عضو هیأت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

*** کارشناس ارشد ویروس‌شناسی

مقدمه

هرپس ویروس گاوی تیپ دو تاکنون به عنوان تورم قرحدهای پستان ماده گاو^۱، گانگرن پوست پستان، جراحات صورت و پوزه و دهان گوساله، تورم و قرحدهای شدن مخاط مهبل و جراحات داندای پوست و یا دانه‌دار شدن پوست کاذب^۲ شناخته شده است و با وجودی که واجد خاصه‌های مشترک هرپس ویروسها می‌باشد، به مناسبت داشتن ویژگیهای پادگنی بیماریزایی خاص از همه آنها متمایز و بازشناخته می‌شود.

هرپس ویروس گاوی تیپ دو اولین بار در سال ۱۹۵۷ از یک گاو مبتلا به لمپی اسکین دیزیز کاذب یا دانه‌دار شدن پوست کاذب در کشور آفریقای جنوبی جدا گردید. اهمیت شناخت بیماری در این است که بایستی با بیماری لمپی اسکین دیزیز واقعی که عامل مولد آن ویروسی از جنس Capripox و خانواده آبله‌ها (Poxviridae) می‌باشد، تمایز داده شود؛ چراکه بیماری اخیر در صورت بروز در گاو‌داری سبب ایجاد تلفات و خسارات قابل توجه می‌گردد؛ در حالی که بیماری لمپی اسکین دیزیز کاذب خفیف‌تر بوده و زیانهای اقتصادی آن به مراتب کمتر است.

هرپس ویروس تیپ دو در سال ۱۹۶۳ از جراحات پستانی ماده گاوهای مبتلا به تورم قرحدهای پستان از اسکاتلند جدا گردید و اینطور به نظر می‌رسد که اشکال شبیه به لمپی اسکین دیزیز کاذب بیشتر در گاوهای آفریقای در فرمهای پستانی و گوساله‌ای در بقیه کشورها پراکنده می‌باشد.

بررسیهای سرولوژیک روی نمونه‌های سرم از

در هر حال پادتن اختصاصی ویروس را می‌توان در سرم خون این نوع حیوانات یافت. مشابه این بررسی در کشورهای دیگر انجام گردیده و از نظر وجود پادتن در سرم خون گاو می‌توان نتیجه گرفت که هرپس ویروس تیپ دو گاوی در بیشتر نقاط دنیا پراکنده می‌باشد.

مواد و روش کار

۱- یافته‌های بالینی

در اسفند ماه سال ۱۳۷۵ در یکی از گاو‌داریهای اطراف تهران بیماری شیوع پیدا نمود که بنا به گفته مسئول آن دامداری تعداد زیادی از گاوهای شیروار (حدود ۱۵ رأس) و گوساله‌های جوان (حدود ۴۰ رأس) به ترتیب مبتلا به تورم قرحدهای پستان و جراحات پوزه و دهان شده بودند. گرچه بیماری تلفاتی را سبب نشده بود، ولی میزان تولید شیر در دامداری تا حدود ۲۰٪ کاهش یافته بود.

در بازرسی از گله جراحات ناشی از ویروس را در مراحل مختلف پیشرفت در گاوهای مختلف مشاهده نمودیم. شکل پستانی آلودگی بیشتر در بین ماده گاوهای شیری به خصوص ماده گاوهای جوان تازه‌زا در اولین دوره شیروری مشاهده گردید. جراحات محدود به سر پستانها و گاهی در غده پستانی و یا پوست پستان بود (تصاویر شماره ۱ و ۲). این جراحات تک تک و محدوده به سر پستانها، بیشتر در ماده گاوهای مسن و یا آنهایی که تازه دوره شیروری را پشت سر گذاشته بودند، دیده می‌شد.

لمس سر پستان، ماده گاو احساس درد می‌کرد. تاولها که واجد مایع زردکاهی رنگی است، به خودی خود و یا به علت عمل شیردوشی پاره شده و فرچه قرمز تیره یا متمایل به سیاهی را از خود باقی می‌گذاشت. عمق و وسعت قرحدها بستگی به شدت جراحات اولیه دارد؛ گاهی کوچک و به اندازه ۲ تا ۳ میلی‌متر و زمانی بزرگتر بوده و بیشتر سطح پستان را فرا گرفته بود. بعضی از قرحدها سطحی و بسیاری از آنها عمقی بوده و به هر حال دیواره مشخصی داشتند. قرحدهای بزرگ وقتی که عمیق باشند دردناک بوده و عمل دوشیدن شیر را مشکل می‌ساختند. در این حالت به ویژه وقتی جراحات در اطراف سوراخ سر پستان می‌بود، دام دچار تورم پستان می‌شد، ولی در حالت خفیف به مرور و در مدت ۱۰ روز ترمیم می‌یافت و دلمه می‌افتاد و زخم کوچک قرمز رنگی بر جای می‌ماند که آن هم به تدریج با رویش پوست التیام پیدا می‌کرد و حتی مو در می‌آورد. ولی در حالت شدید بیماری گاهی بهبودی ۱۰ تا ۱۵ هفته طول می‌کشید و ظاهراً در مانهای متداول در کاهش دوره بیماری و محدود کردن آن اثر چندانی نداشت.

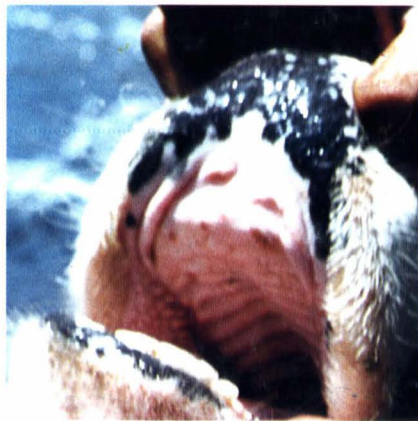
آلودگی با تظاهرات بالینی در این گله حدود ۳ تا ۱۰ ماهه ادامه داشت (از زمان شیوع بیماری تا زمان بازدید ما از دامداری) و تقریباً رو به اتمام بود و می‌توان گفت که زیانهای اقتصادی ناشی از بیماری عبارت بودند از:

۱- کاهش تولید شیر تا حدود ۲۰٪

۲- آمیخته شدن شیر با خون

۳- اشکال در شیردوشی و بالا رفتن هزینه درمان و

شیردوشی



تصویر شماره ۵- جراحات لته در شکل مخاطی و دهان



تصویر شماره ۴- جراحات لته در شکل مخاطی و دهان



تصویر شماره ۳- جراحات لته در شکل مخاطی و دهان

۴- اجباراً کشتار ۷ رأس از ماده گاوهای مبتلا به علت وسعت و شدت در اثر پیدایش تورم پستان حاد غیر قابل درمان. یکی دیگر از اشکال بالینی آلودگی که مشاهده شد، آلودگی گوساله‌ها با نشانه‌های بالینی شامل جراحات پوستی مخاطی دهان و به خصوص لته‌ها بود. این جراحات به شکل سایش لته و یا قرحه مشاهده می‌گردید (تصاویر شماره ۳، ۴ و ۵).

۲- یافته‌های ویروس شناسی

نمونه‌های تاول و بثورات پستانی که از دام مبتلا تهیه شده و بلافاصله به آزمایشگاه ویروس شناسی رسیده بود، بدون اینکه یخ زده شود، سریعاً آماده سازی

به گفته کارکنان دامداری عمل شیردوشی همراه با تورم دردناک و از بین رفتن حالت نرمش و ارتجاعی سر پستان و بیقراری دام بوده و از این طریق متوجه بیماری شده بودند. تعداد معدودی از دامها علائمی مانند تب و بی‌اشتهایی را نشان می‌دادند. جراحات پس از دوره کمون چند روزه در سر پستان یا تمام پستان به صورت تورم و برجستگی مشاهده می‌گردید. پوست در ناحیه آلوده به صورت پلاک برآمده، بیشتر به شکل بیضی یا کروی به قطر ۱ تا ۲/۵ سانتی‌متر در می‌آمد و در مدت یک روز به علت تراوش مایع سرورزی از بافت زیر جلدی و جدا شدن طبقه سطحی پوست از قسمتهای زیرین خود، صورت تاول درخشانی را به خود می‌گرفت و در صورت

دامداریهای نقاط مختلف کشور چه در داخل (مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی بخش ویروس شناسی) و چه در خارج از کشور (مؤسسه پیربرایت انگلستان که نمونه‌های سرمی کرمان، ارسالی توسط سازمان دامپزشکی را در سال ۱۳۷۴ مورد بررسی قرار دادند) انجام گرفته نشان می‌دهد که تعداد قابل توجهی از نمونه‌ها دارای پادتن اختصاصی هرپس ویروس تیپ دو می‌باشند. این نتیجه معرف پراکنده بودن ویروس هرپس تیپ دو در کشور است. بایستی توجه داشت که آلودگی گاو با هرپس ویروس تیپ دو غالباً بدون نشانه بیماری بوده و در صورت بروز عوارض چنانچه به عوامل ثانوی آلوده نگردد، بهبودی سریع حاصل می‌شود؛ ولی

۳- یافته‌های سرولوژیک

دام ایجاد نکند نیز وجود دارد. همچنین مشخص می‌گردد که با حضور ویروس در یک دامداری پس از چند ماه تمام دامها به فرم بانسانی یا بدون نشانی مبتلا گشته و از نظر سرمی نیز مثبت می‌شوند. در حالی که در دامداری که در آن بیماری وجود ندارد، هیچیک از سرمها حاوی پادتن نبوده و تمامی دامها سرم منفی می‌باشند. نظیر این بررسی نیز در سال ۱۳۷۱ انجام گردیده است. تعدادی نمونه سرم خون گاوها به ظاهر سالم به مؤسسه Pirbright از طریق سازمان دامپزشکی کشور ارسال و تعداد قابل توجهی از آنها دارای پادتن ضد هرپس ویروس تیپ دو بوده‌اند. نکته نامشخصی که وجود دارد این است که ویروس مذکور مانند هرپس ویروس تیپ ۴ به چه نحوی وارد کشور شده و یا به عبارت دیگر اپیدمیولوژی آن هنوز مشخص نیست. البته این احتمال وجود دارد که ویروس مذکور از دامهای وارداتی و از طریق دیگری (مانند اسپرم و غیره) وارد کشور شده باشند همانطور که مطالعات انجام شده نشان می‌دهد، این ویروس به فرمهای مختلف در کشورهای مختلف ایجاد بیماری می‌کند. مثلاً در آفریقا بیشتر به فرم لمبی اسکین دیزیز کاذب همراه با جراحات جلدی است و در انگلستان به فرم پستانی و در ایتالیا به فرم بثورات دستگاه تناسلی دیده شده است. مطالعات ما نشان می‌دهد که بیماری در کشور ما به فرم پستانی و فرم ضایعات دهان و پوزه در گوساله‌ها وجود دارد و فرم جلدی و تناسلی آن تاکنون دیده نشده است.

جهت روشن شدن مسیر بیماری، مطالعات بررسیهای بیشتری نیاز است که به صورت طرحهای تحقیقاتی در آینده نزدیک اجرا خواهد شد و نتایج آن در دسترس علاقه‌مندان قرار خواهد گرفت.

پاورقی‌ها

- 1- Razi Bovine Kidney
- 2- Bovine mamillitis
- 3- Pseudo lumpy skin disease
- 4- Differential centrifugation

منابع مورد استفاده

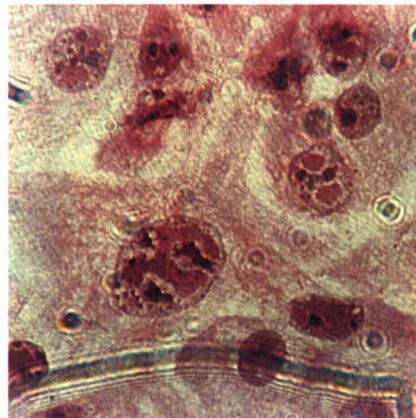
- ۱- حضرتی، عباس، ۱۳۵۶. هرپس ویروسهای گاوی و نقش بیماریزایی آنها، نشریه شماره ۲۲ انستیتو رازی.
- ۲- کارگر، روحانی و همکاران، ۱۳۷۵. اولین جداسازی هرپس ویروس تیپ ۴ گاوی پژوهش و سازندگی، شماره ۳۱.
- ۳- شیمی، احمد، ۱۳۷۵. ویروس شناسی دامپزشکی، ص ۱۶۸.
- 4- Fenner F., et al. Veterinary virology, 351, 1993, Second edition.
- 5- Casterruci G., et al. Kinetic study of serum neutralization of strains of bovid herpesvirus 2. Comparative immunology, microbiology & infectious disease. 1979, 2:2/3, 305-311.
- 6- Casterruci G., Bovid herpesvirus 2 infection of cattle in Italy. Proceeding of the 20th world veterinary congress, 1975, 2:13.
- 7- Ranucci S., Haematological & haematochemical studies in cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 2., Clinical Veterinaria, 1975, 98: 5, 194-199.

تعداد ۲۰۰ نمونه سرم خون به طور کاملاً اتفاقی از سنین مختلف دامهای مربوط به مؤسسه علوم دامی کشور که ویروس از آن جدا شده بود، تهیه و پس از سانتریفوژ و جدا شدن سرم در رقت نهایی ۱/۱۰ به طور هم حجم با ۲۵ الی ۵۰ واحد TCID50/ml از ویروس هرپس جدا شده مخلوط و به روی سلول حساس RBK برده شده و به روش SN مورد آزمایش قرار گرفت (سرم ۱ ml + محیط ۴ ml) ویروس در رقت ۱/۱۰ به میزان ۵ ml، که به هر لوله کشت، ۲ ml از این مخلوط اضافه گردید. تمام سرمهای مورد آزمایش این دامداری حاوی پادتن ضد هرپس ویروس تیپ دو بوده و از ظهور CPE جلوگیری نمودند.

از دامداری دیگری در اطراف تهران که بنا به گفته دامپزشک مسئول آن در چند سال گذشته هیچ موردی از بیماری مشکوک به هرپس تیپ دو در آن دیده نشده بود نیز تعداد ۱۰۰ نمونه سرم تهیه و مورد آزمایش SN قرار گرفت. در این آزمایش نیز از ویروس جدا شده استفاده گردید و در هیچیک از نمونه‌های سرم پادتن مشاهده نگردید و تمام لوله‌ها CPE کاملاً مشخصی را نشان دادند.

نتیجه و بحث

نتایج به دست آمده از آزمایشات انجام شده نشان می‌دهد که ویروس جدا شده هرپس تیپ دو می‌باشد. این ویروس به راحتی روی سلول RBK رشد نموده و



تصویر شماره ۷- گنجیدگیهای داخل هسته

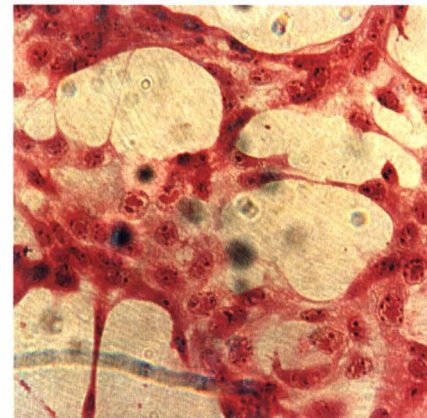
تخریب سلولی ایجاد می‌نماید. مدت زمان لازم برای ظهور CPE در پاساز اول حدود ۵ روز و در پاسازهای دوم و سوم ۳ روز می‌باشد. در آزمایش سروئوتراپیزاسیون مشخص گردید که این ویروس با ویروس IBR و هرپس تیپ ۴ ارتباط پادگنی ندارد زیرا که به هیچ وجه با آنتی سرم IBR و هرپس تیپ ۴ خنثی نمی‌گردد.

آزمایش سروئوتراپیزاسیون بر روی ۲۰۰ نمونه سرم که از کاوداری الوده گرفته شده بود، نشان داد که تمامی سرمها حاوی پادتن می‌باشند و از آنجا که همه این گاوها عوارض و نشانیهای بیماری را نشان نداده بودند، معلوم می‌گردد که ابتلا به بیماری به فرمی که علائم و نشانی در

گردید. بدین معنی نمونه‌ها پس از خورد و صلایه شدن توسط همونایزیر و اضافه نمودن آنتی بیوتیک توسط سانتریفوژ یخچالدار در دور ۳۰۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و از آن سوسپانسیون ۱/۱۵ تهیه گردید. مایع فوقانی در شرایط کاملاً استریل با بیپیت برداشت و به مقدار ۵ ml/۵۰ به سلول حساس اضافه گردیده و پس از یک ساعت به منظور جذب سریع ویروس ۱/۵ ml محیط کشت حاوی ۲٪ سرم جنین گوساله به آن اضافه گردید. سلول RBK آلوده شده مرتباً روزانه با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. پس از ۹۶ ساعت تغییرات مختصری در یکی از لوله‌ها مشاهده گردید. لوله کشت حاوی CPE پاساز مجدد داده شد و این بار پس از ۴ روز ویروس کاملاً روی سلول رشد نمود. در پاساز سوم CPE پس از سه روز مشاهده گردید. ویروس جدا شده در مرحله بعد عیارسنجی گردید و پس از ۵ روز به روش Reed & Muench عیاری برابر با ۱۰^{۶.۵} TCID50/ml داشت.

در مرحله بعد ۱۰ عدد لوله لایتن تیوب با رقت ۱/۱۰۰۰ از ویروس (حدود ۱۰۰۰ ذره ویروسی) الوده گردیده و هر ۱۲ ساعت یک لوله همراه با یک لوله شاهد برداشت و فیکس گردیدند. پس از ۵ روز که تمام لوله‌ها برداشت و فیکس شدند همگی به روش همتوکسیلین - انوزین رنگ آمیزی شدند.

در لایتن تیوبهای ۲۴ و ۲۶ ساعته مشاهده گنجیدگیهای داخل هسته‌ای کاملاً واضح میسر گردید که هرپس ویروسها در داخل هسته رشد کرده و سبب پیدایش گنجیدگی می‌شوند. تصاویر گرفته شده از گنجیدگیها در بزرگنمایی ۲۰۰× و ۴۰۰× به



تصویر شماره ۶- گنجیدگیهای داخل هسته

ترتیب در تصاویر شماره ۶ و ۷ مشاهده می‌گردد. هرپس ویروس جدا شده پس از خالص سازی نسبی^۴ با میکروسکوپ الکترونی مورد مشاهده قرار گرفته و فرم کامل و مشخص هرپس ویروس مشاهده گردید. در پایان ویروس جدا شده با آنتی سرم هرپس تیپ دو موجود در مؤسسه رازی که از منابع خارجی (مؤسسه ویبریج انگلستان) تأمین شده بود، مورد آزمایش سروئوتراپیزاسیون قرار گرفته (رقت ۱/۱۰۰۰ ویروس و رقت ۱/۱۰۰ آنتی سرم) و کاملاً خنثی گردید. در صورتی که با آنتی سرم IBR و هرپس ویروس تیپ ۴ هیچگونه واکنشی اتفاق نیفتاد و CPE کامل در حضور دوانتی سرم ذکر شده مشاهده گردید.