

اولین گزارش جداسازی هرپس ویروس تیپ ۴ گاوی از نمونه‌های مرضی در ایران

● دکتر روحانی کارگر* ● دکتر بهروز قابوسی* ● دکتر محمد حسامی* ● دکتر تقی تقی پور بازرگانی*
● دکتر کمال‌الدین خدمتی* ● عوض اسدیان*** ● رضا سرمست*** ● عباس بختیاری***
* اعضاء هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی، ** عضو هیأت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، *** مؤسسه تحقیقاتی رازی

چکیده

هرپس ویروس تیپ ۴ از یک گاوداری در اطراف تهران جدا گردید. ویروس مذکور با ویروس تیپ ۱ گاوی عامل مولد بیماری IBR قرابت پادگنی نداشته، در عوض با ویروس ایشترین بار ۱ که ایجاد کننده سرطانه‌های گوناگون در انسان است قرابت و تشابهات پادگنی فراوان دارد. نشانیهای بالینی گاو در اثر آلودگی با این ویروس تورم ملتحمه چشم، بیماری تنفسی، سقط جنین، منژیت، آندومتريت و بروز دانه‌های جلدی و لنفوساکوم می‌باشد.

مقدمه

هرپس ویروس‌ها، گروه بزرگی از ویروس‌های بیماری‌زا را تشکیل می‌دهند که تقریباً از تمام نقاط دنیا گزارش شده‌اند. دامنه میزبانی این گروه از ویروس‌ها وسیع بوده و از حیوانات پست از قبیل صدف و دوزیستان تا پستانداران عالی را در بر می‌گیرد.

هرپس ویروس‌ها به سه تحت خانواده تقسیم می‌گردند که هر یک دارای خواص متفاوتی می‌باشند، به طوریکه از نظر بالینی از یک عارضه تنفسی زودگذر تا ایجاد سرطانه‌های خطرناک را شامل می‌شود. بیشترین ویروس‌های بیماری‌زای انسان و حیوانات در ویروس‌های تحت خانواده الفا قرار دارند که از جمله ویروس IBR^۱ یا هرپس ویروس تیپ ۱ گاوی در این تحت خانواده قرار می‌گیرد.

ویروس جدیدی که در سالهای اخیر از تمام نقاط دنیا جدا شده است هرپس ویروس گاوی تیپ ۴ است که این ویروس اخیراً از ایران نیز جدا شده است. ویروس مذکور دارای ساختار ژنومی مشابه ویروس ایشترین بار می‌باشد که در تحت خانواده گاما قرار دارد. این ویروس از موارد گوناگونی مانند تورم ملتحمه چشم، بیماریهای تنفسی، واژنیت و متريت، دانه‌های جلدی و بالاخره لنفوساکوم گاو جدا شده است (۱).

تزریق هرپس تیپ ۴ به گاوهای حساس و سالم هیچگونه بیماری را تولید نکرده است، همچنین ویروس از کشت بافتهای به ظاهر سالم و یا از منی گاوهای نر سالم نیز جدا گردیده است.

مواد و روش کار یافته‌های بالینی

در آذرماه سال ۱۳۷۳ در یکی از گاوداریهای اطراف تهران بیماری شیوع پیدا نمود که بنا به گفته دامدار ۲ رأس حیوان بیمار در آن دامداری وجود داشت و علاوه بر

هماتولوژی

پاسخ آزمایش حاصل از بررسی نمونه خون دام بیمار به قرار ذیل بود: $WBC = 8000$ (Neut = 70%, Lymph = 30%)
 $PCV = 52\%$

کالبدگشایی

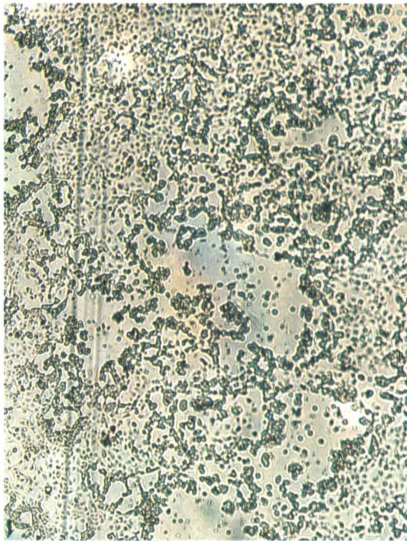
در آزمایش کالبدگشایی ضایعات عبارت بودند از: مری واجد زخم به صورت موضعی، شکمبد و نگاری و هزارلا پر خون و دارای زخم، شیردان متورم، خونریزی و نکروز در پلاک‌های پی‌یر^۴ (ژوژنوم)، آنتریت کاتارال، سیستیت‌های موکوبیدی در ناحیه دریچه ایلئومگال، وجود خطوط گورخری در رکتوم بعلاوه بزرگی عقده‌های لنفاوی این منطقه، لب آپیکال ریه راست دارای منطقه کوچک کیدی شده، نای واجد ترشحات موکوسی و قلب و مثانه طبیعی.

یافته‌های میکروسکوپی

در آزمایش میکروسکوپی از نمونه‌ها ضایعات زیر دیده شد: سطوح پیش معده دارای آروزایون، وجود گاستریت و آنتریت در بسیاری از نقاط معده ورودی، اتساع کیستیک غدد شیردان و روده‌ها به همراه کریپتایتیس، نکروز خمل‌های روده و اپیتلیوم کریپت‌ها، بعلاوه در نقاطی او بافت ریه برونکوپنومونی چرکی وجود داشته و پرخونی و خونریزی در اغلب نقاط دستگاه گوارش دیده می‌شد.

یافته‌های ویروس و سرم شناسی

در آزمایش ویروس شناسی از عقده‌های لنفاوی



تصویر شماره ۱- آثار تخریب سلولی حاصل از رشد ویروس تیپ ۴ گاوی روی سلول BK در پاساژ دوم بعد از ۳ روز

گوساله تلف شده که مورد کالبدگشایی قرار گرفته بود هرپس ویروس جدا گردید. بدین ترتیب که عقده‌های لنفاوی این گوساله پس از صلابه و خوردن سنانتریفوژ، مایع رویی آن به کشت تیره سلول گوساله BK برده شد و در پاساژ دوم ضایعات سلولی CPE مشاهده گردید. برخلاف ویروس IBR که معمولاً در

این در خلال چند هفته گذشته ۱۰ رأس از گوساله‌های وی نیز تلف شده بودند. لازم به ذکر است که در این گاوداری جمعاً ۴۰ رأس گاو شیری، ۲۰ رأس تلیسه، ۲۰۰ رأس گوساله و ۲ رأس گاو نر موجود بوده است.

علایم بیماری در یک رأس گوساله نر ده ماهه که مورد معاینه قرار گرفت عبارت بود از: بی اشتها، آبریزش از دهان و بینی، اسهال (که دو روز قبل از معاینه خون آلوده شده بود)، تنسم و لاغری پیش رونده. دام مذکور طبق برنامه سازمان دامپزشکی به طور مرتب با واکسن‌های طاعون گاوی و بروسلوز واز جیره غذایی زیر استفاده می‌کرده است: سبوس، آردجو، کنجاله، تفاله چغندر و یونجه.

گله این دامدار حدود ۴۰ روز قبل درگیر بیماری تب برقی بوده که در زمان معاینه بنا به ادعای دامدار، آن مشکل برطرف شده بود. لازم به ذکر است که داروهای ذیل جهت درمان گوساله بیمار به کار رفته بود که همگی بدون اثر بوده‌اند: شربت مولتی‌ویتامین، اکسی تتراسیکلین و تایلوزین.

درجه حرارت دام بیمار برابر ۳۶/۷ درجه سانتی‌گراد و تعداد ضربان قلب ۱۲۰ بار در دقیقه بود، ضمن اینکه دستگاه گردش خون مشکل خاصی را نشان نداد.

تعداد تنفس ۱۹ بار در دقیقه و صدای مخاطی تنفس کمی افزایش یافته و ترشحات فراوان موکوسی در منخرین دام جلب توجه می‌کرد. در محوطه دهانی و پای دندانها آروزایون و پرخونی و بر روی پرزهای زبان نیز پرخونی و خونریزی مشاهده گردید.

بالای نوک زبان زخم بود. در معاینه دستگاه گوارش علایم درمانگاهی خاصی بجز مدفوع خون آلوده دیده نشد. دام از نظر بالینی کمی دهیدراته شده و وضع پوست نا مطلوب، خشن و ژولیده بود. ملتحمه چشم نیز پرخون به نظر می‌رسد.

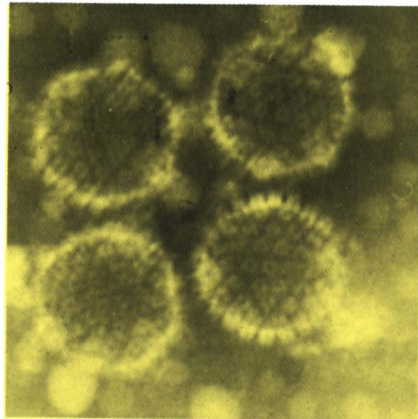
در سال ۱۹۸۸ شیوع هرپس ویروس تیپ ۴ گاوی در کشور مصر گزارش شده است. در این کشور این ویروس به طور همزمان با ویروس لمپی اسکین ۶ دبیز (جنس پاراپاکس از خانواده آبله) ایجاد بیماری نموده و هر دو ویروس از دام‌های مبتلا جدا گردیده است (۲).
در مورد عوارض ناشی از آلودگی گاو با هرپس تیپ ۴، گزارش‌های مختلفی وجود دارد. به طوریکه بررسی‌های انجام شده در نقاط مختلف جهان نشان داده است که مهمترین عوارض حاصله از این آلودگی در گاو عبارتست از: سقط جنین، ضایعات پوستی ندولی، آندومتريت و عوارض تنفسی و اسهال می‌باشد.

پاورقی‌ها

1- Epstein Barr 2- Host range 3- Infectious bovine rhinotrachitis 4- Peyer patches 5- Leighton tube 6- Lumpy skin disease

منابع مورد استفاده

1- Fenner, F., et al, 1991. Veterinary virology, Academic press
2- House, JA, et al, 1990. The isolation of lumpy skin disease virus and bovine herpesvirus-4 from cattle in Egypt. J.of vet. Diag. In Vest. 2: 2, 111-115.
3- Belluzzi, S. et al, 1988. Outbreak of early abortions and reproductive disorder in a daily herd. Isolation of bovine herpes virus 4 (BHV-4).



تصویر ۴- هرپس ویروس تیپ ۴ گاوی بدون پوشش پس از تغلیظ و رنگ آمیزی منفی با فسفوتنگستیک اسید (PTA)

4- Maldren, G. Van, et al, 1987. Bovine herpes virus type 1 and 4. A serological and epidemiological survey of their occurrence among Belgian cattle. Vlaams-Diergeneeskundig-Tijdschrift. 56:5, 364-371.
5- Flammini, C.F., et al, 1985. Isolation of viral agents from cattle with chronic ulcerative glossitis. Atti-Della-Societa-Italiana-di-Buiatria, 17, 597-607.

پژوهش و سازندگی ۱۲۱

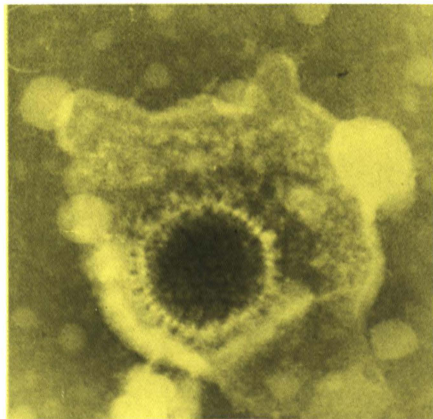
سرم آن از نظر وجود پادتن ضد BVD-MD,IBR, هرپس ویروس تیپ ۴ بررسی گردید که از این نظر هم فاقد پادتن بود.

۲۱ روز پس از تزریق ویروس، از دام مذکور مجدداً خونگیری به عمل آمده و سرم آن در برابر ۵۰/ml TCID₅₀ از ویروس جدا شده آزمایش SN هیچ نوع علائم درمانگاهی خاص دال بر بیماری در گوساله مشاهده نگردید.

هرپس ویروس جدا شده برای بررسی دقیق‌تر و تعیین هویت و نوع آن پس از خشک کردن در ویالهای ۵ ml در کنار یخ خشک به مؤسسه توسعه همکاریهای بین‌المللی ویروس شناسی فرانسه واقع در شهر مونپولیه CIRAD/Emvt ارسال گردید و پس از انجام آزمایش long fragment PCR هرپس ویروس تیپ ۴ گاوی تشخیص داده شد.

نتیجه و بحث

هرپس ویروس تیپ ۴ گاوی به راحتی روی سلول BK رشد و تخریب سلولی ایجاد می‌نماید، ولی مدت زمان لازم برای ظهور CPE در پاساژ اول ۵ روز و در پاساژ دوم ۳ روز می‌باشد. در حالیکه ویروس IBR در مدت ۲۴ ساعت رشد نموده و سپس باعث لای سلولی می‌گردد. در آزمایش سرونترالیزاسیون مشخص گردید که این ویروس با ویروس IBR ارتباط پادگنی ندارد، به طوریکه آزمایش نشان می‌دهد ویروس جدا شده قادر به خنثی نمودن سرم هیپرایمن ضد IBR نمی‌باشد که این نشانگر عدم وجود قرابت پادگنی بین این دو ویروس است.



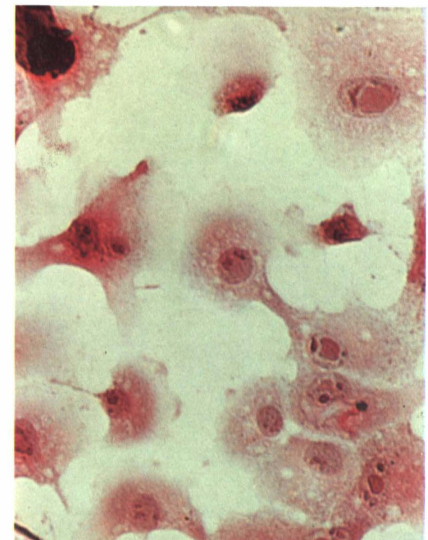
تصویر شماره ۳- هرپس ویروس تیپ ۴ گاوی همراه با پوشش پس از رنگ آمیزی منفی با فسفوتنگستیک اسید

نکته نامشخصی که وجود دارد این است که ویروس مذکور به چه نحوی وارد کشور شده و یا به عبارت دیگر اپیدمیولوژی آن هنوز روشن نمی‌باشد. البته این احتمال وجود دارد که ویروس مذکور از دام‌های وارداتی و یا از طرق محتمل دیگر وارد کشور شده باشد. همانگونه که طی بررسی انجام شده در کشور بلژیک ۲۲ درصد از دام‌های این کشور دارای پادتن ضد هرپس ویروس تیپ ۴ می‌باشند. مشابه این بررسی در کشور ایتالیا نیز انجام گرفته است و در این کشور پادتن اختصاصی ضد ویروس به طریقه SN مشاهده گردیده است (۳ و ۵).

فاصله ۲۴ ساعت روی سلول حساس رشد کرده و آثار تخریب سلولی ایجاد می‌کند، ویروس جدا شده بار اول بعد از ۵ روز، در پاساژ دوم پس از ۳ روز کشت رشد و ایجاد CPE نمود. این تفاوت زمانی در پیدایش CPE وجه تفریق این دو ویروس می‌باشد. نوع CPE هرپس ویروس تیپ ۴ به شکل سلول‌های گرد بوده و سپس سلول‌ها از سطح شیشه‌کننده می‌شدند (شکل شماره ۱).
در بررسی گنجیدگی سلولی ویروس جدا شده در لیتن تیوب^۵ و روی سلول BK کشت داده شد و سپس با روش هماتوکسیلین انوزین رنگ آمیزی گردیده و گنجیدگی درون هسته که معرف رشد هرپس ویروس در هسته است مشاهده گردید (تصویر شماره ۲).

نمونه ویروسی در مرحله بعد، اولتراسانتریفوژ شده و از رسوب پس از تهیه گرید با میکروسکوپ الکترونی شکل ظاهری ویروس مطالعه گردید. همانطور که در شکل‌های شماره ۳ و ۴ ملاحظه می‌گردد ویروس هرپس همراه با پوشش و بدون پوشش پس از تغلیظ مشخص می‌باشد.

به منظور تعیین قرابت پادگنی ویروس جدا شده با ویروس IBR از آزمایش سرونترالیزاسیون استفاده گردید. برای این منظور مقدار ۵۰/ml TCID₅₀ ۱۰۰ از ویروس در برابر رقت یکدهم سرم هیپرایمن IBR با حجم مساوی به مدت یک ساعت مجاور گردید تا در صورت وجود قرابت خنثی گردد، سپس مخلوط ویروس و سرم ضد به لوله‌های حاوی سلول BK اضافه و پس از انجام آزمایش سرونترالیزاسیون مشخص گردید که سرم ضد IBR قادر به خنثی نمودن ویروس جدا شده نمی‌باشد و یا به عبارت دیگر این دو ویروس با



تصویر شماره ۲- گنجیدگی حاصل از رشد هرپس ویروس تیپ ۴ درون هسته سلول BK.

یکدیگر قرابت پادگنی ندارند.

تزریق ویروس جدا شده به دام حساس

نمونه‌ای از ویروس جدا شده به یک رأس گوساله حساس تزریق گردید تا بیماری‌زایی ویروس بررسی گردد. البته خون گوساله قبل از تزریق ویروس گرفته شده و

ش ۳۱/۷۵