✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۵، زمستان ۱۳۷۸

ایجاد و مطالعهٔ تجربی بیماری «بُردر» در گوسفندان ایرانی نژاد شال

مقدمه

«پستی‌ویروس‌ها» ویروس‌های نسبتاً کوچک متعلق به خانوادهٔ فلیوی ویریده و به اندازهٔ ۴۵ نانومتر، واجد نوکلئوکپسیدی با تقارن بیست وجهی هستند که غشائی با منشاء سلول از جنس فسفولیپید و گلیکوپروتئین آن را می‌پوشاند. مادهٔ ژنتیکی این ویروس‌ها یک ملکول تک رشته‌ای RNA با سنس مثبت است که در داخل نوکلئوکپسید جای گرفته است (۳۰، ۳۹ و ۴۰).

اعضاء جنس «پستی‌ویروس» گونه‌های مختلفی از نشخوار کنندگان اهلی و وحشی و خوک را آلوده می‌نمایند. بیماری‌های ایجاد شده توسط «پستی ویروس‌ها» شامل، بیماری اسهال ویروسی گاوان، بیماری «بُردر» در گوسفند و تب کلاسیک خوک می‌باشند (۵، ۲۰، ۳۰، ۳۴، ۳۹ و ۴۰).

بیماری بُردر را با علایم مشخصهٔ لرزش و مویی شدن پشم در بره‌های آلودهٔ متولد شده از میش‌هایی که در دوره خاصی از آبستنی آلوده شده‌اند، مشخص می‌کنند. این بیماری به عنوان یکی از بیماری‌های ویروسی گوسفند با گسترش بسیار زیاد در جهان، شرکت فعال ویروس عامل بیماری در سندرم سقط جنین در گوسفند، ایجاد بره‌های ناقص الخلقه و دخالت تام در سندرم بره‌های ضعیف و همچنین چرخهٔ فعال انتقال عامل بیماری به گاو و ایجاد بیماری اسهال ویروسی گاوان مورد توجه محققین بوده و هست. زمینه‌های مطالعاتی دیگر در زمینه اهمیت بیماری بُردر، مطالعات پایه‌ای در رشته‌های مختلف ایمنی شناسی، جنین‌شناسی، آسیب‌شناسی بیوشیمی و آنزیم شناسی می‌باشند. از آنجایی که یکی از چهره‌های بیماری بُردر در میش‌های آبستن ایجاد بره‌های واجد تحمل ایمنی نسبت به ویروس عامل بیماری می‌باشد، به کارگیری این جرم یکی از ابزارهای مناسب جهت مطالعه پدیده تحمل ایمنی و چگونگی شکل‌گیری و صلاحیت‌دار شدن دستگاه ایمنی و نحوه تاثیر ویروس بر قسمت‌های مختلف دستگاه ایمنی می‌باشد. در همین اثنا می‌توان به تأثیرات جانبی ویروس بر دستگاههای مختلف بدن نیز توجه کرد (۴، ۵، ۱۱، ۱۲، ۱۵، ۲۲، ۴۹ و ۵۰).

ویروس عامل بیماری با شکل‌گیری بسیاری از اعضاء و اندام‌های بدن در تعارض بوده و این تعارض و تداخل را می‌توان در پدیدهٔ مرفوژنز میلین در دستگاه عصبی به خوبی مشاهده نمود به طوری که بسیاری از محققین استفاده از این ویروس را به عنوان الگویی مناسب جهت مطالعهٔ پدیدهٔ هیپومیلینوژنز توصیه نموده‌اند. به علت تأثیر جرم بر اندام‌ها و اعضاء دیگر بدن مثل پوست، دستگاه اسکلتی، غدد داخلی و برخی از آنزیم‌های مهم بدن، پژوهش‌های متعددی در زمینهٔ بازتاب تأثیر ویروس بر اعضاء فوق‌الذکر و نقش احتمالی آنها در پاتوژنز ویروس و مطالعهٔ جنین شناسی این اعضاء به عمل آمده است (۸، ۱۴، ۱۶، ۴۹ و ۵۰).

هدف از انجام این تحقیق مطالعه چگونگی تاثیر پستی ویروس بر گوسفندان ایرانی نژاد شال و مطالعهٔ چگونگی پاسخ‌های سرولوژیک، کلینیکال پاتولوژیک، بالینی و آزمون‌های ویروس شناسی در گوسفندان آبستن بوده است. از جمله اهداف دیگر این تحقیق مطالعه چگونگی ایجاد تحمل ایمنی ناشی از عفونت‌های پستی ویروسی و عوارض ناشی از آن در بره‌های متولد شده از گوسفندان آلوده بود که در ادامه به شرح چگونگی این وقایع پرداخته خواهد شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده

محیط کشت سلولی MEM[1]، محیط کشت سلولی هنکس[2]، سرم جنین گاو (FCS)، پنی‌سیلین K، استرپتومایسین، کلرور سدیم، کلرور منیزیم، کلرور کلسیم، سولفات منیزیم، فسفات دی‌سدیک و منوسدیک، فسفات منوپتاسیک، بی‌کربنات سدیم، آب مقطر، لاکتالبومین[3] هیدرولیز شده، عصاره مخمر[4]، تریپسین[5]، اکستران، الکل صنعتی، ورسینات سدیم، اتانل، آگار نوبل، فرمالین ۱۰٪، رنگ تری‌پان بلو[6]، رنگ گیمسا[7]، محلول مارکانو[8]، تیره سلولی R.BK[9] سویه NADL ویروس BVD و سویه BD جدا شده از ایران[10].

وسایل

پیپت‌های دقیق در حدود ۴ تا ۲۰۰ میکرولیتری. سرپیپت. ظروف شیشه‌ای. سانتریفوژ و لوله سانتریفوژ، فتومترمیکروپلیت (قرائت کننده الیزا)[11] لامینارفلو، بن‌ماری، یخچال معمولی، فریزر ۲۰-، فریزر ۸۰-، پیپت در اندازه‌های مختلف، میکروسکوپ معکوس،

تصویر ۱- سونوگرافی رحم و جنین گوسفند شماره ۱ در سن حدود ۲۵ روزگی.

گرمخانه ۳۷ درجه، پلیت ۹۶ گوده کشت سلولی، فیلترسایتز[12] فیلتر میلی‌پور[13]، لوله آزمایش در اندازه‌های مختلف، بطری‌رو[14]، پمپ خلاء، ترمومتر و گوشی، ترازو، لام هموسیتومتر (نئوبار) و ملانژور شمارش سلول‌های سفید خون لوله ونوجکت و سرنگ یکبار مصرف.

ایجاد و مطالعه بیماری «بُردر» در گوسفندان ایرانی (نژاد شال)

برای ایجاد بیمار به شکل تجربی روی گوسفندان ایرانی از گوسفندان نژاد شال مؤسسه تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی تهران (امین‌آباد) استفاده شد. از آنجائیکه اساس پاتوژنز ویروس بُردر روی گوسفندان آبستن اعمال می‌شود اولین قدم، شناسایی گوسفندان آبستن در سن مناسب بود. به این منظور ۴ رأس گوسفند از گله‌ای که حدود ۴۰ روز از قوچ اندازی آن گذشته بود به روش سونوگرافی شناسایی و انتخاب گردیدند. در روز معاینه گوسفند اول دارای آبستنی حدود ۲۰ الی ۲۵ روز، گوسفند دوم ۲۵ الی ۳۰ روزه، گوسفند سوم ۳۰ الی ۳۵ روزه و گوسفند چهارم (شاهد) هم حدود ۳۵ روزه تشخیص داده شد. از هر ۴ گوسفند جهت انجام آزمون شمارش سلولهای خونی (CBC) و آزمونهای سرمی خونگیری به عمل آمد روی نمونه‌های سرمی بلافاصله آزمون الیزا انجام شد و پس از اطمینان از منفی بودن هر چهار مورد از نظر پادتن‌های ضد ویروس بُردر، گوسفندان فوق‌الذکر مطابق برنامه‌ای از پیش تعیین شده با میزان 2×10^7 $TCID_{50}$ از سویه NADL ویروس BVD، تهیه شده روی کشت سلول R-BK از طریق داخل عضلانی مورد تلقیح قرار گرفتند (۳۳، ۳۴ و ۵۰).

گوسفند شاهد که گوسفندی به ظاهر سالم و از نژاد مشابه بود و سن آبستنی مشابه گوسفندان مورد مطالعه را داشت در محلی جداگانه ولی مشابه با سه گوسفند مورد آزمایش نگهداری شده و بجز تلقیح ویروس کلیهٔ اعمال انجام شده روی سه رأس گوسفند تحت تجربه روی آن نیز انجام گرفت.

متعاقب تلقیح ویروس به گوسفندان فوق‌الذکر هر گوسفند به طور روزانه معاینه شده و وضعیت بالینی شامل میزان درجه حرارت رکتال، وضعیت عمومی قلب و تنفس و وضعیت مدفوع و ترشحات دستگاه تنفسی مورد توجه قرار می‌گرفت و علاوه بر آن مطابق برنامه‌ای مشخص حدود ۵ میلی‌لیتر از خون وریدی گوسفند مورد مطالعه، جهت شمارش سلول‌های سفید خونی (WBC) و انجام آزمون سرمی، به آزمایشگاه منتقل می‌گردید.

نمونه خونی که جهت تهیه سرم اخذ شده بود، پس از جداسازی سرم و ثبت مشخصات مربوطه در فریزر

● هادی کیوانفر،
● فرهید همت‌زاده،
گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی
دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
● روحانی کارگرمؤخر،
بخش ویروس شناسی،
مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی
تاریخ دریافت: آبان ماه ۱۳۷۸

۳۰- درجه آزمایشگاه، تا هنگام انجام آزمونهای سرمی نگهداری می‌شد. نمونه‌های خون به طور معمول به فاصله هر ۲ تا ۳ روز یکبار تا ۲۰ روز و پس از آن به طور هفتگی تا حدود ۳ ماه و سپس هر ماه پس از تلقیح ویروس به روش فوق‌الذکر اخذ و آزمایش می‌شدند (جدول ۱).

آزمون خنثی سازی سرم یا SN

از آنجائی که پستی ویروس‌های نشخوار کنندگان به خوبی در کشت‌های سلولی با منشاء گاو و گوسفند تکثیر می‌یابند و سویه‌های سیتوپاتیک آنها پس از چند روز CPE واضحی را در این کشت‌ها ایجاد می‌نمایند، در این تحقیق از تیره سلولی R-BK و عیار حاوی $TCID_{50}$ ۲۰۰، از سویهٔ NADL ویروس BDV جهت انجام آزمون SN به روش میکرونوترالیزاسیون استفاده شد (۵، ۲۶، ۳۴ و ۳۵).

عیار مثبت برای نمونه‌های سرم در این آزمون عیار $\frac{1}{8}$ و بالاتر در نظر گرفته می‌شد، البته برخی محققین عیارهای بالای $\frac{1}{10}$ را به عنوان عیار مثبت فرض می‌نمایند ولی به جای $TCID_{50}$ ۲۰۰ ویروس، از عیار $TCID_{50}$ ۱۰۰ ویروس استفاده می‌کنند، ولی اگر قرار باشد از عیار $TCID_{50}$ ۲۰۰ ویروس استفاده شود بهتر است رقت $\frac{1}{8}$ به بالای سرم به عنوان مثبت تلقی گردد (۴۰ و ۴۳).

آزمون الیزا

کیت الیزای تهیه شده به وسیلهٔ مؤسسه «سووانوویر [15]» سوئد برای تشخیص پادتن‌های ایجاد شده علیه ویروس BD در بدن گوسفندان استفاده می‌گردد. این کیت براساس الیزای فاز جامد و سنجش ایمنی به وسیلهٔ آنزیم [16] استوار است. گوده‌های میکروپلیت الیزا با پادگن غیرعفونی ویروس BD قبلاً پوشانده شده‌اند. نمونه‌های سرم مورد آزمایش با پادگن‌های موجود در گوده‌ها مجاور نموده و در صورت وجود پادتن‌های ضد BDV در نمونه‌های سرم، این پادتن‌ها به پادگن‌ها متصل شده و در اثر شستشو کنده نمی‌شوند، سپس آنتی‌گلبولین کنژوگه با پراکسیداز [17] به پادتن‌های موجود در گوده‌ها متصل شده و در اثر شستشوی مجدد کنده نمی‌شوند سپس به این مجموعه سوبسترا [18] اضافه می‌گردد و تغییر رنگ‌ها به علت تأثیر کنژوگهٔ آنزیم روی سوبسترا بوده و پس از اضافه کردن اسید سولفوریک به عنوان ماده متوقف کنندهٔ [19] واکنش، رنگ‌های تولید شده با چشم یا فتومتر (قرائت کنندهٔ الیزا) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت می‌گردند.

سلول‌های سفید خون پس از اخذ نمونهٔ خون

چکیده

بیماری «بُردر» به عنوان یکی از بیماریهای ویروسی گوسفند، با گسترش نسبتاً وسیعی در جهان و شرکت در سندرم‌های سقط جنین و ایجاد بره‌های ضعیف و ناقص الخلقه در کشورهایی که صنعت پرورش گوسفند در آنها اهمیت دارد همواره مورد توجه بوده است. جهت ایجاد و مطالعهٔ تجربی بیماری، ۳ رأس گوسفند آبستن (که آبستنی آنها قبلاً به روش سونوگرافی تأیید شده بود) انتخاب گردیدند. یک رأس گوسفند آبستن نیز به عنوان شاهد در شرایطی مشابه با سایرین انتخاب شده ولی مورد تلقیح با ویروس قرار نگرفت. هرکدام از گوسفندان مورد مطالعه در سنین آبستنی ۲۵، ۵۸ و ۹۰ روزگی از راه داخل عضلانی با میزان $TCID_{50}$ 2×10^7 از سویه NADL ویروس BVD آلوده گردیدند. در هر سه رأس از دو روز پس از تلقیح ویروس روند کاهش لمفوسیت‌ها شروع شد و تا حوالی روز هشتم ادامه یافت به طوری که در روز هشتم به حوالی نصف میزان اولیه رسیده بود، در صورتی که در گوسفند شاهد تغییری در میزان لنفوسیت‌های خون صورت نگرفته بود. لنفوپنی رخداده در گوسفندان مورد آزمایش در حوالی روزهای ۲۰ پس از تزریق به وضعیت طبیعی بازگشت نمود. در هر سه رأس گوسفند مورد مطالعه بین یک تا سه روز پس از تلقیح ویروس افزایش درجه حرارت تا مرز ۴۱/۵ مشاهده گردید که در حوالی روز ۷ پس از تلقیح به مرز طبیعی ۳۹/۵ درجه سانتی‌گراد نزدیک شد. آزمون‌های SN و الیزا که در ابتدا در هر ۴ رأس گوسفند مورد مطالعه منفی بود پس از ۲۰ تا ۴۰ روز در گوسفندان تلقیح شده مثبت گردید. گوسفند شمارهٔ یک که در ۲۵ روزگی آبستنی آلوده شده بود یک رأس برهٔ ضعیف و نارس واجد عوارض عصبی و لرزش را به دنیا آورد که فاقد پادتن‌های سرمی ضد پستی ویروس و واجد ویروس در سلول‌های سفید خونی بود. این بره سه روز پس از تولد تلف گردید و در مغز آن آثار هیپومیلیناسیون، آنسفالیت حاد غیر چرکی، خونریزی و ادم مغزی مشاهده شد. دو گوسفند بعدی هرکدام بین ۱۰ تا ۱۵ روز زودتر از موعد طبیعی زایمان کرده و بره‌های ضعیفی را به دنیا آورده‌اند که در مقایسه با موارد طبیعی کوچکتر و کم‌وزن‌تر بوده‌اند. در سرم هر دو رأس بره قبل از دریافت آغوز حضور پادتن‌های ضد پستی‌ویروسی به روش الیزا و SN تشخیص داده شد. گوسفند شاهد هیچ‌کدام از عوارض فوق‌الذکر مرتبط با ویروس را از خود نشان نداد.

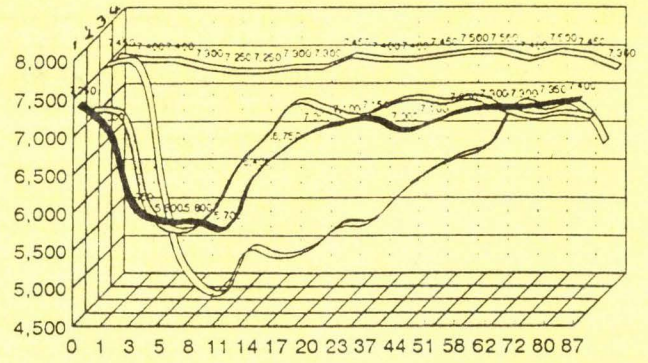
✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 45 PP: 96-103

An experimental study on Border disease in native Iranian sheep (Shall breed)

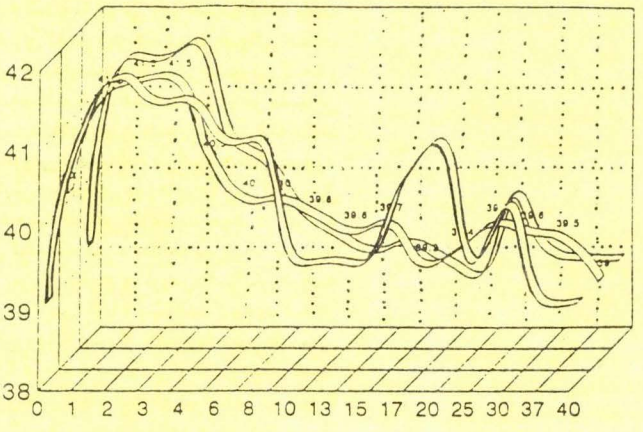
By: Keyvanfar H., Hemmatzadeh F., Department of microbiology, Faculty of veterinary medicine, university of Tehran, P.O. Box 14155-6453, Tehran-Iran
Kargarmoakhar R.; Department of virology, Razi research institute, Hesarak-Iran

In this study 3 pregnant ewes confirmed by sonography selected and tested by SN and Elisa, be sure that they didnot have antibodies against pestiviruses. They were infected with 2×10^7 $TCID_{50}$ of NADL strain of BVDV on days of 25, 59, and 93 post conception via I.M. In all 3 animals lymphocytes started to decrease on day of infection and reached down to 50%, 8 days post infection. The number of lymphocyte become normal about 20 days after infection. The rectal tempreture of 3 animals raised to 41.5°C one or two days post infection and decreased to 37.5°C on day 7. The Elisa revealed the positive sera on 20 days postinfection, however in SNT the positive sera were appear after 40 days. The ewe infected on 25 days of pregnancy delivered a premature and weak lamb, 15 days earlier. Before taking colostrum, the sera of this lamb didn't have any antibodies to pestiviruses and died 3 days later. In histopathological finding, brain exhibited hypomyelinogenesis, edema and encephalitis. We isolated BVDV from brain and peripheral leukocytes. This speciments had positive reaction against BVD and BD srains in gell diffusion test. The 2 others infected ewes also delivered 10-15 day earlier and gave birth to two weak lambs. The sera from boths lambs before taking colostrum had antibobies to pestivirus in ELISA and SNT. Our results indicated first, the ELISA detects antibodies at least 10 days earlier than SN and second, the BVDV could cause persistance infection in first month of pregnancy. However infection at second and third month could results immune responces, but nearly in all intrauterus infection cases, the ewes gave birth to weak lams.

نمودار ۱- مقایسه نتایج حاصل از شمارش کلی سلول‌های سفید خونی گوسفندان تحت تجربه و شاهد در زمانهای مختلف پس از تزریق ویروس NADL.



نمودار ۲- نتایج حاصل از اندازه‌گیری درجه حرارت رکتال در گوسفندان مورد مطالعه پس از تلقیح داخل عضلانی ویروس NADL.



جدول شماره ۱- مقایسهٔ نتایج حاصل از شمارش سلولهای سفید خونی گوسفندان تحت تجربه و شاهد در زمانهای مختلف پس از تزریق ویروس NADL.

روز	گوسفند ۱	گوسفند ۲	گوسفند ۳	گوسفند ۴*
**	۷۳۵۰	۷۱۰۰	۷۵۰۰	۷۴۵۰
۱	۷۰۰۰	۷۰۵۰	۷۵۵۰	۷۴۰۰
۳	۵۹۵۰	۵۷۵۰	۵۸۵۰	۷۴۰۰
۵	۵۸۰۰	۵۵۰۰	۷۴۰۰	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	۹۱۰۰	۷۴۵۰
۵۱	۷۱۰۰	۷۲۰۰	۶۳۰۰	۷۵۰۰
۵۸	۷۲۵۰	۷۲۵۰	۶۴۵۰	۷۵۰۰
۶۲	۷۳۰۰	۷۱۰۰	۷۰۰۰	۷۴۰۰
۷۲	۷۳۰۰	۷۰۰۰	۶۹۵۰	۷۵۰۰
۸۰	۷۳۵۰	۷۰۵۰	۷۰۰۰	۷۴۵۰
۷۸	۷۴۰۰	۷۰۰۰	۶۵۰۰	۷۳۰۰

* گوسفند شاهد ** روز تزریق

سیتراته به روش معمول و با استفاده از لام هموسیتومتر شمارش کلی شده و پس از رنگ‌آمیزی گسترش تهیه شده از همین نمونه‌ها، شمارش تفریقی می‌شدند. نمونه‌های بافتی تهیه شده پس از مراحل مختلف آماده سازی به روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلن ائوزین رنگ شده و مورد مطالعه قرار می‌گرفتند.

نتایج

همانگونه که گفته شد متعاقب تزریق با برنامه‌ای منظم به معاینه و اندازه‌گیری درجه حرارت حیوانات مورد آزمایش پرداخته شد. حدوداً یک تا ۲ روز پس از تزریق ویروس افزایش حرارت حداکثر تا ۴۱/۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید و در حدود ۳ الی ۴ روز ادامه یافت به موازات این واکنش حرارتی اشتهای حیوان کم شده و افزایش ضربان قلب و تعداد حرکات دستگاه تنفس، قابل تشخیص بود. در طی این مدت به جز آتونی شکمبه عارضه خاص دیگری مشاهده نگردید. در معاینات روزانه در هیچ یک از حیوانات عوارض گوارشی یا تنفسی خاصی که حاکی از تأثیر ویروس بر این اعضا باشد مشاهده نگردید. افزایش درجه حرارت از روز ۶ به بعد روند کاهش را نشان داده و در حوالی روز دهم به مرز طبیعی می‌رسید. تنها در گوسفند شماره ۱ بین روزهای ۱۷ تا ۲۰ درجه حرارت تا حدود ۴۰ درجهٔ سانتیگراد مشاهده شد که همراه با علایم تنفسی و سرفه بود و در معاینه بالینی پنومونی تشخیص داده شد، از برداشت‌های مربوط به مجاری تنفسی این حیوان موفق به جداسازی ویروس BD نشدیم و درمان حیوان پس از تزریق ۴ نوبت پنی‌سیلین و استرپتومایسین به نتیجه رسید.

در گوسفند شماره ۳ روز سوم پس از تزریق ویروس همراه با افزایش درجه حرارت یک حالت لرزش و تشنج مشابه شوک آنافیلاکتیک مشاهده گردید و حال حیوان چند ساعت پس از بروز علایم تقریباً به حالت طبیعی بازگشت نمود و بجز آتونی شکمبه و افزایش تعداد حرکات تنفس مشکل خاص دیگر در آن مشاهده نگردید.

پس از تلقیح ویروس و اخذ نمونه‌های خونی به جهت شمارش سلول‌های سفید خون نتایج جالب توجهی به دست آمد که مقادیر حاصل از این آزمایشات در جدول ۱ ذکر شده‌اند. متوسط WBC گوسفندان در روز قبل از تزریق معادل ۷۳۵۰ لکوسیت در هر میلی‌لیتر خون بود که از روز بعد از تلقیح ویروس در هر سه گوسفند مورد آزمایش روند کاهش لکوسیت‌ها شروع شده و لکوپنی در روزهای بین ۵ تا ۸ پس از تلقیح به اوج خرد می‌رسید.

از نظر نوع لوکوسیت‌ها در این میان لنفوسیت‌ها بیشترین کاهش را نشان می‌دهند به‌طوری که در برخی موارد حتی نسبت طبیعی لنفوسیت به نوتروفیل که در گوسفند حدود ۲ به یک است به حد مساوی یک به یک و یا کمتر از یک می‌رسد که نشانگر تأثیر شدید ویروس برجمعیت لنفوسیت‌ها می‌باشد. این درحالی است که هیچگونه تغییر محسوسی در میزان سلول‌های سفید خون گوسفند شاهد ایجاد نشده و تغییری نیز در درصد سلول‌های سفید خونی مشاهده نگردید. متاسفانه به علت عدم وجود امکانات کافی موفق به تفکیک انواع

لنفوسیت‌های تحت تاثیر قرار گرفته نشدیم ولی محققین عقیده دارند که همه زیر جمعیت‌های لنفوسیت‌ها خاصه لنفوسیت‌های TCD_4 بیشترین آسیب را متحمل می‌شوند (۱۸، ۳۲، ۳۳ و ۴۴)

نتایج حاصل از آزمون‌های سرمی در گوسفندان مورد مطالعه قبل و بعد از تلقیح ویروس

نمونه‌های سرمی تهیه شده از گوسفندان قبل از تلقیح ویروس ابتدا به روش الیزا آزمایش شده و پس از اطمینان از منفی بودن هر سه گوسفند اقدام به تلقیح ویروس به گوسفندان آبستن مطابق برنامه مشخصی که ذکر شد، کردیم.

متعاقب تزریق ویروس در زمانهای مشخصی از حیوانات خونگیری به عمل آمد. از نمونه‌های گلبول‌های سفید خون مربوط به گوسفندان تحت تجربه در روز پنجم پس از تزریق ویروس موفق به جداکردن ویروس NADL در روی کشت سلولی شدیم که این ویروس با آنتی سرم استاندارد ضد BDV خنثی گردید و در آزمون ژل دیفوزیون هم خط رسوبی واضحی را در مقابل آنتی سرم استاندارد ایجاد نمود.

نمونه‌های سرمی تهیه شده از خون‌های فوق الذکر پس از جداسازی درفریزر ۳۰- درجه تا زمان آزمایش نگهداری شد و روی تمامی نمونه‌ها آزمون‌های SN والیزا انجام گرفت. همانگونه که در نمودار ۴ آمده است گوسفندان ۱ و ۲ در روز بیستم پس از تلقیح در آزمون الیزا مثبت شدند ولی گوسفند ۳ در روز سی‌ام به آزمون الیزا پاسخ مثبت داد در آزمون SN اولین عیار سرمی $\frac{1}{4}$ در روز سی‌ام در هر سه راس گوسفند ظاهر گردید ولی عیار $\frac{1}{8}$ وبالاتر که به عنوان مثبت قلمداد می‌شود در حوالی روز ۳۷ مشاهده شدند. روند افزایش عیار تا حوالی روزهای ۷۲ ادامه یافت و بالاترین عیار در گوسفند شماره یک بود که در روز ۶۵ پس از تزریق عیار $\frac{1}{256}$ رسیده بود. در دو راس گوسفند دیگر عیاری بالاتر از $\frac{1}{128}$ مشاهده نگردید. از حوالی روزهای ۷۲ به بعد روند کاهش عیار شروع شد به‌طوری که در روز ۹۴ گوسفندان شماره ۱ و ۳ به $\frac{1}{32}$ و گوسفند ۲ به $\frac{1}{64}$ رسیده بود و در روز ۱۵۲ هر سه راس گوسفند هنوز عیارهای $\frac{1}{32}$ خود را حفظ کرده بودند. نکته جالب توجه آن بود که در گوسفندان ۲ و ۳ در حوالی روزهای زایمان افت عیار آزمون SN بخوبی جلب توجه می‌کرد مثلا در گوسفند ۲ که ۷۵ روز پس از تلقیح ویروس یعنی در ۱۳۳ روز از آبستنی زایمان کرده بود در نمونه‌های تهیه شده در روزهای ۶۵، ۷۲ و ۸۰ پس از تلقیح ویروس روند کاهش عیار از $\frac{1}{128}$ تا $\frac{1}{32}$ ادامه یافت و در روز ۸۷ به مرز $\frac{1}{128}$ رسید (نمودار ۵).

در گوسفند ۳ نیز که در سن ۹۲ روزگی آبستن با ویروس تلقیح شده بود و در حوالی ۱۳۵ روزگی آبستنی زایمان کرده بود روند افزایش عیار کاملاً با سایر گوسفندان متفاوت بود. بطوری که در روز ۴۴ که یک روز پس از زایمان بود تنها عیار $\frac{1}{16}$ را نشان می‌داد که در مقایسه با عیار دو گوسفند دیگر در همین روزها بسیار کمتر می‌نمود.

نتایج حاصل از مطالعات پاتولوژیک، ویروس‌شناسی و سرولوژی در بره‌های متولد شده از گوسفندان تحت تجربه

گوسفند شماره ۱، مطابق اطلاعات حاصل از پرونده گوسفندان امین‌آباد و زمان تقریبی قوچ‌اندازی در گله و همچنین تشخیص قطعی به‌وسیلهٔ سونوگرافی در تاریخ معاینه در سن آبستنی ۲±۲۵ روزگی بوده است. این گوسفند در حدود ۱۳۰ روزگی آبستنی زایمان نمود و یک راس برهٔ کوچک جثه به وزن حدود۳ کیلوگرم را به دنیا آورد مطابق برآورد قبلی، این گوسفند حدود ۱۵ روز زودتر از موعد زایمان کرده و طبعاً بره‌ای نسبتا نارس زاییده است. علایم نارس و ضعیف بودن بره کاملا مشهود بود. دندان‌های حیوان هیچکدام از لثه خارج نشده بود سم‌های حیوان هنوز شکل نگرفته و کاملا نرم و جثه حیوان بسیار کوچکتر از موارد طبیعی بود.

بره مذکور توان ایستادن و گرفتن پستان و خوردن شیر را نداشت و در صورتی که با کمک دست روی چهار دست و پا نگاه داشته می‌شد پس از لرزش و تلوتلو خوردن و حرکات ریتمیکِ سر به زمین می‌افتاد. از آنجایی که این بره توان ایستادن و شیرخوردن را نداشت تا ۳ روز با توسل به تغذیه دستی به وسیلهٔ آغوز مادر و تزریق الکترولیت و گرم نگه‌داشتن محل زندگی پرستاری شد. این بره دارای استخوان‌های جمجمه و پوزه غیرطبیعی، سرگنبدی شکل بود. ولی عارضه دیگری در دست و پا یا پوشش بدن آن دیده نشد.

قبل از دریافت آغوز از بره فوق الذکر حدود ۱۵ میلی‌لیتر خون جهت تهیه سرم و جداسازی گلبول‌های سفید جهت آزمون‌های سرم‌شناسی و ویروس‌شناسی اخذ گردید. این بره سه روز پس از تولد علی‌رغم مراقبت‌های ویژه‌ای که گفته شد تلف گردید. نمونه خون تهیه شده از بره بلافاصله به دو قسمت تقسیم گردید و به یک قسمت آن ماده ضد انعقاد اضافه گردید و قسمت دیگر جهت تهیه سرم در لوله آزمایش جداگانه‌ای نگهداری گردید.

روی نمونه سرمی حاصل از بره ۱ قبل از دریافت آغوز آزمون SN و الیزا انجام گرفت که در هر دو آزمون پاسخ منفی بدست آمد. خون حاوی ماده ضد انعقاد که حجم آن در حدود ۱۰ml بود پس از آماده سازی و سانتریفوژ همراه با فایکول [۲۰] جهت جدا سازی لکوسیت های تک هسته ای برای جدا سازی ویروس در روی کشت سلولی و استخراج پادگن‌های پستی ویروسی مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه لکوسیتی تهیه شده که به کشت سلولی منتقل شده بود پس از ۵ روز CPE واضحی را در کشت سلولی ایجاد کرد که این خاصیت را همچنان در پاساژهای دوم و سوم نیز حفظ کرده بود. ویروس جدا شده از این نمونه نیز با آنتی سرم‌های استاندارد ضد پستی‌ویروس خنثی گردید.

قسمت دیگر لکوسیت‌های تهیه شده پس از ۲ بار ذوب و انجماد در ۲۰- درجه و ۲۰+ درجه و سانتریفوژ، به جهت آزاد شدن پادگن‌های ویروسی موجود در لکوسیت‌ها، در آزمون ژل دیفوزیون مورد استفاده قرارگرفتند.

در این آزمون بین آنتی سرم استاندارد ضد BVD و ویروس BVD یک خط رسوبی، بین آنتی‌سرم استاندارد و ویروس BD حداقل ۲ خط رسوبی و بین آنتی‌سرم استاندارد و نمونه تهیه شده از لکوسیت‌های بره ۱ نیز حداقل دو خط رسوبی مشاهده گردید.

بین آنتی سرم استاندارد وسایر نمونه‌ها هیچگونه خط رسوبی حتی پس از ۱۰ روز نیز مشاهده نگردید. البته پس از تلف شدن حیوان نمونه‌های تهیه شده از مغز و غدد لنفاوی حیوان نیز تهیه و پس از انجام مراحل آماده‌سازی در آزمون ژل دیفوزیون مورد آزمایش قرار گرفتند که در نمونه‌های تهیه شده از مغز و غدد لمفاوی حداقل یک خط رسوبی ضعیف و نزدیک به گوده نمونه

تصویر ۲- خطوط رسوبی تشکیل شده در آزمون ژل دیفوزیون پس از ۶ روز.
۱- آنتی سرم استاندارد ۲- لکوسیت گوسفند سالم ۳- پادگن BVD (NADL) ۴- نمونه لوکوسیت ۵- پادگن BD
۶- کشت سلولی غیرآلوده ۷- نمونه BVD

تشکیل شد و این دال بر حضور مقادیر کم پادگن‌ها ویروسی در نمونه‌های فوق الذکر می‌باشد.

کالبدگشایی و پاتولوژی

بره متعلق به گوسفند شماره ۱، سه روز پس از تولد تلف گردید و در همان روز با همکاری بخش پاتولوژی دانشکده کالبد گشایی شد که در کالبد گشایی دفرمه بودن استخوان‌های جمجمه و پوزه و پرخونی عمومی لاشه، مشهود بود . علاوه بر ادم و پرخونی مغزی مایعات مختصری نیز در زیر پرده‌های مغزی و داخل بطن های مغزی وجود داشت که حضور این مایعات در داخل بطن‌های مغز منجر به اتساع مختصر بطن‌ها شده بود علاوه بر این ضایعات عارضه دیگر در لاشه حیوان مشاهده نگردید. نمونه‌هایی از مغز و پوست حیوان جهت بررسی‌های پاتولوژیک به بخش پاتولوژی ارسال ونمونه‌هایی از مغز و غدد لمفاوی مزانتریک و طحال و سواپ مقعدی نیز جهت آزمونهای ویروس‌شناسی تهیه و در فریزر ۷۰- درجه نگهداری گردید.

در آزمایش ویروس‌شناسی از نمونه مغز و غدد لمفاوی مزانتریک بره فوق الذکر ویروس سیتوپاتیک جدا گردید که با آنتی‌سرم‌های رفرانس مثبت خنثی شدند. البته پس از مرگ از مدفوع و محتویات روده باریک بره نمونه‌برداری به عمل آمد ولی موفق به جدا کردن ویروس از این نمونه‌ها نشدیم که دلیل آن احتمالاً حضور پادتن‌های خنثی‌کننده مادری در دستگاه گوارش بره بوده است.

نتایج حاصل از آزمون‌های سرولوژیک SN و الیزا و ژل دیفوزیون به همراه پاسخ‌های حاصل از کشت اندام‌های بره ۱ حاکی از آن است که این بره به شکل [21] عفونت پایدار از (PI)مبتلا شده بود. چون علاوه بر آنکه ویروس NADL از لکوسیت‌های آن به هنگام حیات جدا شد نمونه‌هایی از همین ویروس هم از مغز و غدد لمفاوی آن پس از کالبدگشایی جدا گردیده است، و این در حالی است که نمونه سرمی تهیه شده از این بره (قبل از دریافت آغوز) فاقد پادتن‌های ضد پستی‌ویروسی تشخیص داده شده است.

نمونه‌های تهیه شده از بره ۱ که شامل پوست و مغز بود، در فرمالین ۱۰٪ تثبیت شد و پس از طی مراحل مختلف آماده سازی و رنگ‌آمیزی و تهیه مقاطع میکروسکوپی در زیر میکروسکوپ بررسی گردیدند.

در هیستوپاتولوژی مغز، در قسمت‌هایی از ماده سفید حالت دمیلیناسیون مشاهده گردید در اکثر قسمت‌های مغز اِدم اطراف عروقی و اِدم اطراف نُرونی کاملا جلب توجه می‌نمود که این ضایعات همراه با پرخونی و خونریزی در برخی نقاط، حاکی از آسیب‌های جدی به ماده سفید مغز بره فوق‌الذکر می‌باشد، در نقاط بسیار محدودی خاصه در اطراف فضاهای ویرشو رابین [22] در مغز آثاری از تجمع آسینی وار تک هسته‌ای‌ها [23] و افزایش سلول‌های گلیال [24] مشاهده گردید که نشانگر یک آنسفالیت حاد غیر چرکی بود. بافت مغز خاصه در قسمت‌های قشر به علت نوزاد بودن حیوان بسیار پرسلول بود که این دال بر فعالیت سازندگی سلول‌های مغزی و جوان بودن بره مورد مطالعه می‌باشد. در نقاط بسیار محدودی آثاری از نکروز نُرون‌ها مشاهده گردید (۵، ۶ و ۷).

در مطالعه هیستوپاتولوژیک بافت پوست، ضایعه مشخصی که دال بر تاثیر ویروس این قسمت‌ها باشد مشاهده نکردیم کما این که در معاینه مستقیم بره مبتلا نیز ضایعات جلدی خاصی مشاهده نگردید.

گوسفند ۲ که در ۵۸ روزگی با ویروس NADL تلقیح شده بود، حدود ۱۰ روز زودتر از موعود، یک راس برهٔ نر به دنیا آورد. بره متولد شده ضعیف، نارس و کوچک اندام بود. این بره هم تا ۵ روز با توسل به تغذیه دستی و خوراندن آغوز به‌وسیلهٔ سرنگ و تزریق الکترولیت نگهداری شد در روز پنجم خود توان شیر خوردن را پیدا کرد و تا ۶ ماه زنده ماند، در طول مدت زندگی به وزن طبیعی دست نیافت و حالت ضعف عمومی را در تمام مدت زندگی نشان می‌داد. نمونه‌های سرمی تهیه شده و قبل از دریافت آغوز از این بره در هر دو آزمون مثبت SN بره نیز ELISA بودند. از نمونه مدفوع و بافی کوت [25] این در طول حیات موفق به جداسازی ویروس نشدیم و همینطور نمونه بافی کوت در آزمون ژل دیفوزیون نیز با آنتی‌سرم رفرانس هیچگونه واکنشی را نشان نداد نتایج حاصل از این آزمونها مشخص می‌سازد که بره مذکور به هنگام برخورد با ویروس در دوران جینی واجد دستگاه ایمنی نسبتاً کارآمدی بوده و توانسته است در بدن خود بر علیه پادگن‌های ویروسی، پادتن‌های خنثی کننده تولید نماید. طبعاً اگر بره‌ها قبل از دریافت آغوز واجد هرگونه پادتن سرمی باشند دلیل آن برخورد با ویروس در رحم مادرشان می‌باشد (۳، ۴، ۵ و ۹).

بره ۲ در حدود ۶ ماهگی به علت ابتلا به پنومونی تلف گردید. از نمونه ریه بره مبتلا به استرپتوکوک جدا شد در هیستوپاتولوژی مغز بره مذکور ضایعه خاصی مشاهده نگردید. گوسفند بعدی که در حدود ۹۲ روزگی آبستنی مورد تلقیح ویروس قرارگرفت یک جفت بره دوقلو نر به دنیا آورد که در مورد این گوسفند نیز زودزایی جلب توجه می‌نمود که مطابق برآورد حدود ۱۰ روز زودتر از موعد وضع حمل نموده است. بره‌های این گوسفندان گرچه نسبت با سایر همسن‌های خود کوچکتر و لاغرتر بودند ولی از همان روز اول توان شیرخوردن را داشتند. یکی از این بره‌ها در سن ۷ روزگی به اسهال مبتلا شد و با تزریق الکترولیت خوراندن آنتی‌بیوتیک بهبود پیدا کرد.

نمونه‌های سرمی این بره‌ها نیز قبل از دریافت آغوز در هر دو آزمون SN و ELISA مثبت شدند. از نمونه‌های مدفوع و بافی کوت بره‌های مذکور نیز موفق به جداسازی ویروس نشدیم. نمونه‌های بافی کوت نیز پس از آماده سازی، در آزمون ژل دیفوزیون در مجاور آنتی‌سرم رفرانس هیچگونه پاسخی نداده‌اند. این بره‌ها نیز مشابه مورد قبلی بعد از تکوین دستگاه ایمنی با ویروس مواجه شده‌اند و بنابراین حضور پادتن‌های ضدویروس در سرم آنها کاملا طبیعی می‌باشد. هر دو راس بره در ۷ ماهگی نیز زنده می‌باشند. ولی یک مورد آنها به پنومونی مبتلا می‌باشد.

بحث پیرامون بیماری تجربی

بسیاری از محققین بروز علائم بالینی بیماری بُردر در گوسفندان را به عوامل متعددی مثل نوع ویروس، سن تلقیح و وضعیت ایمنی قبلی مادر نژاد حیوان و سایر عوامل فردی و فیزیولوژیک حیوان می‌دانند. بطوری که حتی در یک جمعیت حساس اگر ویروس وارد شود، تنها درصد قلیلی از مادران آبستن بره‌های ناقص‌الخلقه به دنیا می‌آورند (۳۳، ۳۸، ۳۹ و ۴۹)

در این بررسی مهمترین عارضه‌ای که در عفونت ناشی از ویروس در تمام بره‌ها بروز کرد، ایجاد بره‌های ضعیف و نارس بود، چون در وهله اول این ویروس جزو عوامل دخیل درسندرم بره‌های ضعیف [26] می‌باشد. بره‌هائی که به نحوی در دوران جنینی با ویروس BD آلوده می‌شوند اساسا از قدرت زنده ماندن [27] کمی برخور دارند و در مقایسه با سایر بره‌های هم گروه از طول عمر و سرعت رشد کمتر و حساسیت زیادتری برخوردار می‌باشند (۱۴، ۲۱، ۲۷ و ۳۶).

ایجاد نواقص مادر زادی در یک جمعیت همسان بستگی به سن جنین داشته و همانگونه که در بره ۱ دیدیم اگر ویروس در حوالی یک ماهگی یعنی پس از تکوین دستگاه ایمنی با جنین برخورد نماید، در جنین حالت تحمل ایمنی ایجاد شده و بره متولد شده بدون داشتن پاسخ سرمی یاسلولی واضح،ویروس رادربدن خود حفظ کرده و دائما دفع می‌نماید(۱، ۳، ۲۳، ۲۶ و ۴۶).

بره شماره ۱ نمونه بارزی از ایجاد تحمل ایمنی نسبت به ویروس BD بود که توانستیم از بافی‌کوت آن در حالت حیات و از مغز و غدد لنفاوی آن پس از مرگ ویروس NADL را از آن جداکنیم بدون آنکه پاسخ سرمی واضحی در ایجاد شود. ردیابی پادگن‌های ویروس به کمک آزمون ژل دیفوزیون در مورد این بره مشابه روش کشت در تاثیر حضور ویروس از ارزش زیادی برخوردار بود. در بررسی‌هائی که توسط محققین مختلف انجام گرفته همخوانی روش ژل با روش جداسازی ویروس را نزدیک به ۸۵ تا ۹۰٪ ذکر کرده‌اند (۲۸، ۲۹، ۳۷ و ۴۱).

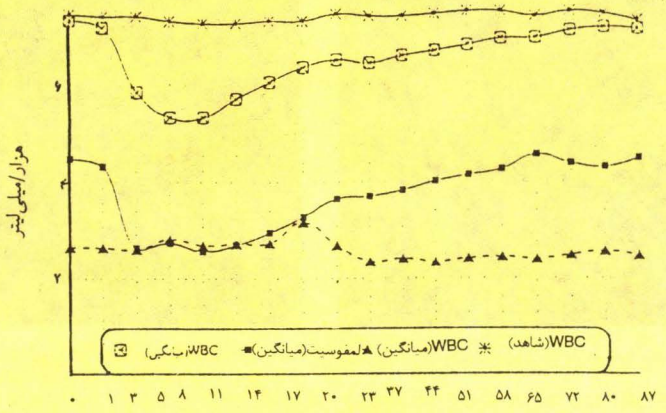
بره ۱ که ابتلا آن به عفونت پایدار محرز بود الگوی مناسبی جهت مطالعات بعدی در زمینه تولید سندرم و آنتروپاتی لوکوپنیک یا سندرم X مطالعه الگوی خونی، ضایعات عصبی و اساس پدیده تحمل ایمنی می‌باشد که متاسفانه قبل از انجام اینگونه مطالعات تلف گردید. در مورد بره ۲ و دو قلوهای ۳ مسئله عمده ضعف عمومی و زودزایی و کاهش سرعت رشد به نسبت بره‌های هم گروه است که با سایر نظریات در زمینه ایجاد سندرم بره‌های ضعیف همخوانی دارد (۲۱، ۴۰، ۴۷، ۴۸، ۴۹ و ۵۰).

آنچه از مشاهدات هیستوپاتولوژیک انجام شده بروی نمونه‌های مربوط به برهٔ شمارهٔ ۱ منتج می‌شود آنست که عوارض ذکر شده منحصراً ناشی از فعالیت ویروس BD می‌باشند البته بنا به عقیده بسیاری از محققین شدت و گستردگی ضایعات به عوامل بسیار متعددی بستگی دارد. این عوامل شامل سن جنین، نوع ویروس، نژاد حیوان و حتی اختلافات فردی بین حیوانات یک نژاد است. بطوری که Nettletone اظهار می‌دارد در بسیاری از موارد بیماری بُردر، به رغم حضور پایدار ویروس در مغز بره آلوده حیوان فاقد عوارض مغزی، جلدی و حتی استخوانی می‌باشد(۳۱،۳۸ و ۴۰).

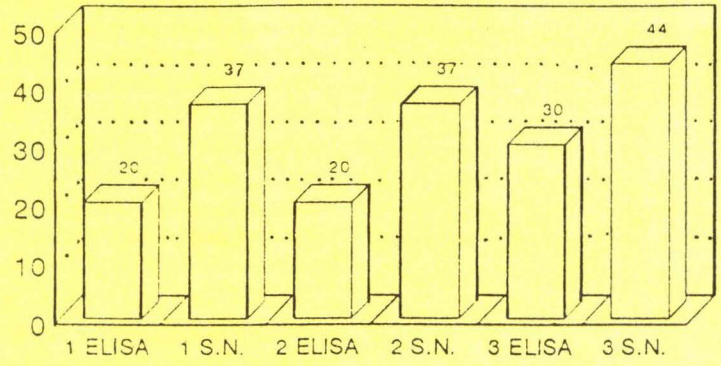
بره ۲ در سن ۶ ماهگی به علت ابتلا به پنومونی ناشی از استرپتوکوک تلف گردید، گرچه از این بره در دوران نوزادی و پس از مرگ موفق به جداسازی ویروس BD نشدیم ولی دخالت ویروس در «بُردر» حالت ضعف و لاغری بره بسیار محتمل می‌باشد چون حضور پادتن‌های ضد ویروس در بدو تولد و تا ۴ ماهگی هم چنان در سرم خون بره مذکور قابل ردیابی بودند. همانگونه که گفتیم در این بره ضایعات استخوانی یا عصبی واضحی ملاحظه نگردید البته در تجربیات برخی محققین آمده که آلودگی جنین‌ها در حوالی ۲ ماهگی هم منجر به بروز ضایعات استخوانی می‌شود، اما در بررسی ما چنین مسئله مشاهده نگردید(۵، ۱۰، ۱۳، ۳۸، ۴۶)

در مطالعه هیستوپاتولوژیک بافت پوست، ضایعه مشخصی که دال بر تاثیر ویروس این قسمت‌ها باشد مشاهده نکردیم کما این که در معاینه مستقیم بره مبتلا نیز ضایعات جلدی خاصی مشاهده نگردید. بنا به عقید بسیاری از محققین ایجاد ضایعات جلدی و موئی شدن

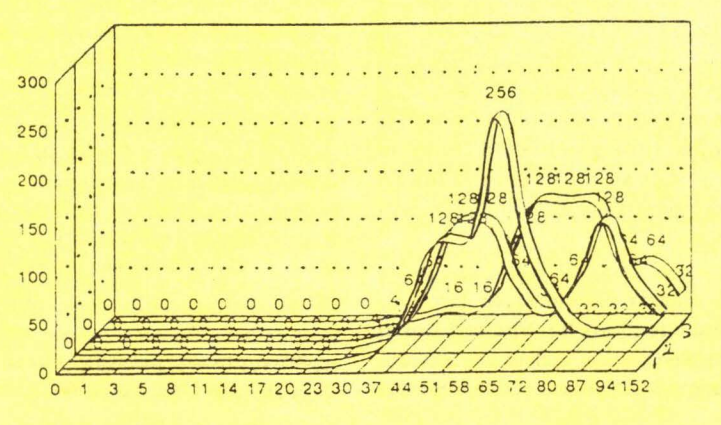
نمودار ۳- نتایج حاصل از شمارش تفریقی سلول‌های خونی گوسفندان مورد مطالعه در زمان‌های مختلف پس از تزریق ویروس NADL.

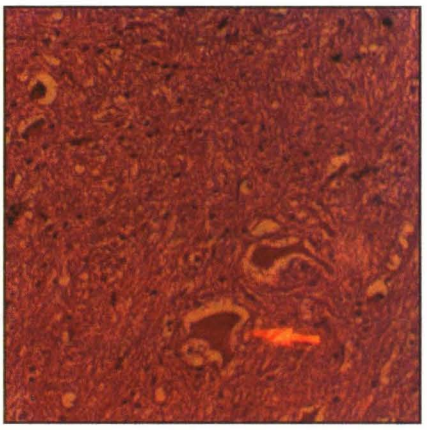


نمودار ۴- مقایسهٔ نتایج آزمونهای سرمی انجام شده روی نمونه های اخذ شده از گوسفندان مورد مطالعه پس از تزریق ویروس NADL در روزهای مختلف پس از تزریق.

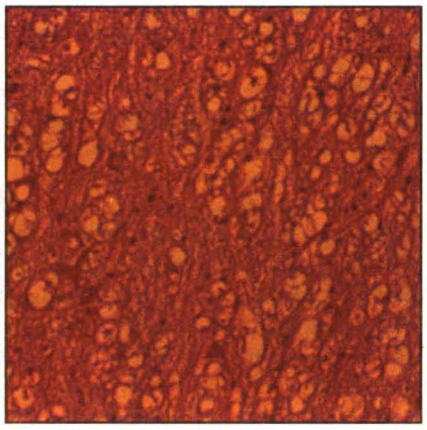


نمودار ۵- مقایسهٔ نتایج آزمون SNانجام شده روی نمونه های اخذ شده از گوسفندان مورد مطالعه پس از تزریق ویروس NADL در روزهای مختلف پس از تزریق.

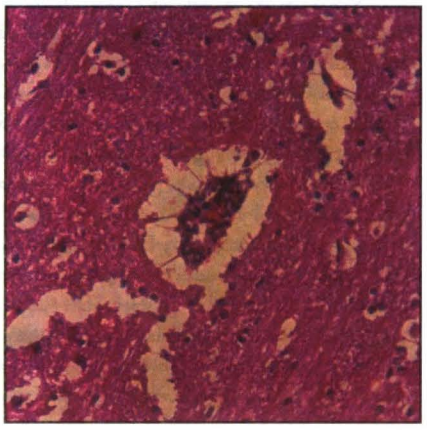




تصویر ۴- اِدم اطراف نُرونی در بافت مغز برهٔ شماره ۱



تصویر ۵- هیپومیلیناسیون در ماده سفید مغز.



تصویر ۶- تجمع آسینی وار سلولهای تک هسته‌ای در اطراف عروق مغزی.

پوشش تنها در گوسفندان با پشم ظریف مشاهده می‌شود و در گوسفندانی که دارای پشم ضخیم و زبر باشند اصولا قابل مشاهده نیست(۵، ۳۹، ۴۲)

در مورد نتایج حاصل از آزمونهای شمارش گلبولی، نتایجی که در همه موارد به دست آمده ایجاد لوکوپنی و خصوصاً لنفوپنی ۳ روز پس از تزریق ویروس است که تا حدود ۱۰ روز ادامه داشته و حوالی روز ۱۵ به مرز طبیعی خود می‌رسد. بروز پدیده لمفوپنی حاصله در مورد عفونت ناشی از پستی‌ویروس‌های نشخوارکنندگان پدیده‌ای است که اکثر محققین به آن توجه زیادی مبذول داشته‌اند و اکثراً عقیده دارند که در بروز خصوصاً لنفوپنی، افت لنفوسیت‌های کاملا T لنفوسیت‌های T4 جلب توجه می‌کند (۹، ۱۷، ۲۱، ۲۴ و ۳۷).

در مورد نحوه تاثیر ویروس روی دستگاه لنفورتیکولر گوسفندان بالغ، همه محققین عقیده دارند که عفونت‌های پستی‌ویروس به لوکوپنی خصوصاً لنفوپنی منجر می‌شوند که در مورد نحوه تاثیر ویروس و نوع سلولهای متاثیر در مبحث پاتوژنز توضیح داده‌ایم. اما این که این شکل از تهاجم ویروس چه عوارض را به دنبال خواهد داشت، بسته به شرایط خود حیوان، شرایط محیط نحوه تهاجم و حدت ویروس وهمچنین وضعیت دستگاه ایمنی بدن گوسفند، تفاوتهای زیادی در این زمینه حاصل می‌شود (۸، ۱۹، ۳۶ و ۴۵).

در مورد افت عیار پادتن‌های سرمی که در حوالی روزهای زایمان در گوسفندان تحت تجربه اتفاق افتاده است، نه تنها در این بیماری بلکه در اکثر بیماریهای عفونی در حوالی روزهای زایمان کاملا جلب توجه نموده و عمده دلیل آن بسیج پادتن‌های سرمی مادر به طرف غدد شیری می‌باشد که بتواند پادتن‌های لازم را از طریق آغوز به نوزاد منتقل نماید. البته وقوع این پدیده دلایل متعدد دیگری از قبیل دپرسیون دستگاه ایمنی به علت اختلالات هورمونی و عمل پروستاگلاندین و انترلوکین‌ها را نیز شامل می‌شود که شرح آنها از حوصله این بحث خارج می‌باشد (۲، ۲۵ و ۴۶).

در تحقیقات بسیاری از محققین آمده است که بره‌های مبتلابه عفونت پایدار می‌توانند واجد طیف وسیعی از ناهنجاریهای عصبی و اسکلتی و ظاهری باشند و یا آنکه فاقد هرگونه علائم حتی پاتولوژیک باشند، علی‌رغم آنکه در هر کدام از این حالات و سایر حالات حد واسط، ویروس در سراسر بدن پراکنده بوده و تامدتهای مدیدی از بدن‌دفع خواهد شد (۸، ۱۱، ۱۴، ۲۴ و ۴۷).

در این بررسی منهای واکنش‌های حرارتی و ضعف و بی‌اشتهایی عمومی عارضهٔ بالینی دیگری مشاهده نشد و تنها در گوسفند شماره ۱، حوالی روز ۱۷ پس از تلقیح ویروس نوعی بیماری تنفسی همراه با سرفه، تب و بی‌اشتهایی مشاهده گردید که با آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین درمان شد و حدود یک هفته بعد به حالت طبیعی خود بازگشت، در مورد نحوه دخالت این ویروس در عفونت تنفسی گوسفند ذکر شده، از آنجائی که این بیماری به درمان آنتی‌بیوتیکی پاسخ داده است، باکتریال بودن آن اثبات می‌گردد. در نهایت با توجه به یافته‌های آزمایشگاهی سایر شواهد ویروسی بدون این پنومونی‌آنهم‌ناشی‌ازویروس BD بعید به نظر می‌رسد زیرا زمان بروز آن‌بازمان‌بروز عوارض تنفسی در مورد کارهای سایرمحققین تطابق نمی‌کند (۳۵، ۳۶، ۴۷، ۴۹، ۵۰).

پاورقی‌ها

1- Minimum Essential Medium 2- Hanks 3- Lactalbumin 4- Yeast extract 5- Tripsin 6- Trypan Blue 7- Gimsa

۸- Marcano جهت شمارش گلبولهای سفید. ۹- تیرهٔ سلولی R-BK توسط دکتر خدمتی در مؤسسه رازی تهیه شده و در حال حاضر جهت مصارف تشخیصی در بخش ویروس‌شناسی مؤسسه رازی استفاده می‌شود. ۱۰- ویروس «بُردر» ایران توسط دکتر کارگر در مؤسسه رازی از یک مورد بالینی بیماری بُردر جدا شده و جهت طرح تحقیقاتی حاضر، مورد استفاده قرار گرفته است.

11- Elisa reader 12- Sitze 13- Millipore 14- Roux bottle 15- Sovanovir 16- Enzyme Immuno Assay (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 17- Horse Radish Peroxidase

۱۸-محلول سوبستراحاوی تترامتیل‌بنزیدین محلول در بافر می‌باشد.

19- Stop solution (Substrate) 20- Ficoll 21- Persistant infectious 22- Virchow Robin space 23- Perivascular cuffing 24- Glial 25- Buffey coat 26- Weak lambs syndrome 27- Viability

منابع مورد استفاده

۱- تاج‌بخش، حسن، ۱۳۷۰. ایمنی شناسی بنیادی - انتشارات دانشگاه تهران - ص ۲۳۹.

۲- صدیقی‌نژاد، صغری، ۱۳۷۵. بررسی اسهال ویروسی گاو/بیماری مخاطی در ایران، پژوهش و سازندگی، شماره ۳۰، ص ۱۲۷.

۳- غلامی م.، اهورائی ب.، عزی ع.، امامی م.، حبل‌الورید ح.، کارگر ر.، خدمتی ک.، ۱۳۷۵. مروری بر بیماری مرزی و گزارش مواردی از هیدرانانسفالی و آرتروگریپوزیس در جنین گوسفند، پژوهش و سازندگی، شماره ۳۰، ص ۱۲۴.

۴- کیوانفر هادی، کریمی ناصر، ۱۳۷۶. ویروس‌شناسی دامپزشکی، قسمت بیماریها (ترجمه) - انتشارات دانشگاه تهران.

۵- همت‌زاده فرهید، ۱۳۷۶. بررسی بیماری بردر در ایران و مطالعهٔ تجربی بیماری - پایا نامه به شمارهٔ ۵۹ جهت دریافت درجهٔ دکترای تخصصی میکروبیولوژی از دانشگاه تهران.

6- Alcigir G., 1983. Pathology of persistent bovine viral Diarrhea pestivirus infection in sheep-Inaguural disstration. Tieraztlich Hochchule ,Hannover- 58 pp.

7- Anderson C.A., Higgins R.J., Smith M.E, Osburn B.I., 1987. Border diseaes : virus induced decrease in thyroid hormone levels with associated hypomyelination - Laboratory Investigation 57.2. 168.

8- Anderson C.A., Higgins R.J., Waldvogel A.S., Osburn B.I., 1987. Tropism of Border diseaes virus for oligodendrocytes in ovine fetal brain cell culture - American Journal of Veterinary Research - 48.5.822.

9- Anderson C.A., Higgins R.J., Waldvogel A.S., Osburn B.I., 1987. Tropism of Border diseaes virus for oligodendrocytes in ovine fetal brain cell culture - American Journal of Veterinary Research - 48.5. 822.

10- Baker J.C., 1995. The clinical manifestation of Bovine Viral Diarrhae infection -Veterinary clinice of north America , food animal practice - vol 11.No 3 Nov. 425.

11- Barlow R.M., Gardiner A.C., Nettleton

34- Loken T., 1995. Border dosease in sheep -Vet clinics of north America.food animal practice, Vol. 11. 3. 576.
35- Loken T., Bjerkas I., Marsen J., 1990. Experimental pestivirus infection in newborn goat kids, J. Com. Path .103. 277
36- Loken T., Bjerkas I., 1991. Experimental pestivirus infection in peregnant goat, J. Com. Path .105. 105.
37- Moennig V., 1990. Pestivirus a review, Veterinary Microbiology , 1990 23. 1-4
38- Nettleton P.F., 1992. Border disease - Cmp Immu Mic Infe Dis. 15.179.
39- Nettleton P.F., 1988. Border disease - In Practice, 1988. 76.
40- Nettleton P.F., Entrican G., ????. Ruminant pestivirus, Br. Vet. J. 151. 614.
41- Nettleton P.F., Gilmour J.S., Herring J.A., Sinclair J.A., 1992. The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus - Comp. Imm. Mic. Infec. Dis. 15.179.
42- Plant J.W., Gard G.P., Acland H.M., 1976. A mucosal disease virus infection of the pregnant ewe as a cause of a border disease like condition, Australian veterinary journal 52. 6. 247.
43- Plant J.W., Acland H.M., Gard G.P., 1976. A mucosal disease virus as a cause of abortion, hairy birth coat and unthriftness in sheep .1.infection of pregnant ewes and observation on aborted fetuses and lambs dying before one week, Australian Veterinary Journal 52. 2. 57.
44- Terlecki S., Richardson C., Done J.T., Harkness J.W., Sands J.J., Shaw I.G., Winkler C.E., Duffell S.J., Patterson D.S.P., Sweasy D., 1980. Pathogenicity for the sheep fetus of bovine virus diarrhoea mucosal disease virus of bovine origin Br Vet J. 136. 6. 602.
45- Thrane I.F., 1992. Many abortion with border disease virus - Tidsskrift for dansk Fareavl 57. 9. 10.
46- Tizard I., 1992. Veterinary Immunology -W.B.Saunders company, PP:54.
47- Vantsis J.T., Rennie J.C., Gardiner A.C., Well P.W., Barlow R.M., Martin W.B., 1980. Immunization against border disease, J. Com. Path 90. 3. 349.
48- Wensvoort G., Terpstra C., Kluyver E.P., DeKluyver E.P., 1989. Characterization of porcine and some ruminant pestivirus by cross-neutralization- Vet Mic. 20. 4. 291.
49- Wohelsein P., Trautwein G., Depner K.P., Hubschele O.J.B., Liess B., 1992. Pathomorphological and immunohistological finding in progeny of goats experimentally infected with pestivirus - J Vet Med Series B -1992. 39. 1. 1.
50- Zakarian B., Barlow R.M., Rennie J.C., 1975. Periarteritis in experimental border disease of sheep,I,The occurance and distribution of the lesion- Journal of Comparetive pathology .1975. 85. 3. 453.
preliminary studies on the nature of agent, and the induced serological response N.Z.Vet.Jo. 23. 10. 236.
24- Edwards S., Paton D.J., 1995. Antigenic difference amonge pestiviruses -Vet Cli of The North America, Food Animal Practice - Vol 11. 3 Nov. PP:563.
25- Entrican G., Flak A., Hopkins J., MacLean M., Nettleton P.F., 1991. Detection of border disease virus in sheep defferent lymphocyte by immunocytochemical and insitu hybridization techniques- Archive of Virology. Sup3. 175.
26- Fenton A., Sinclair J.A., Entrican G., Herring J.A., Malloy C., Nettleton P.F., 1991. A monoclonal antibody capture ELISA to detect antibody to border disease virus in sheep serum - Vet.Mic .28 327.
27- Fenton A., Entrican G., Herring J.A., Nettleton P.F., 1990. An ELISA for detecting pestivirus antigen in blood of sheep persistently infected with border disease virus -J Vir Meth-1990. 27. 3. 253.
28- Gardiner A.C., Nettleton P.F., Barlow R.M., 1983. Virology and immunology of spontaneous and experimental mucosal disease like syndrome in sheep recover from clinical border disease -J Comp Path. Vol. 93. 463.
29- Hanel V., 1993. Bovine virus diarrhoea vergleich der effekivitat von immundiffusinostest und viruszunchtung beim antigenbzw virusnachweis in der dramschleimhaut-Tierarztl .umschau .48. 339.
30- Huck R.A., Ewans H., Diane G., 1975. Border disease of sheep comparison of the resault of serological testing using complement fixation immunodiffusion, neutralization and immunoflurescent technique-Br Vet J .131. 427.
31- Huisung G.D., 1973. Diagnostic Virology an illustrated Handbook- New Haven and London, Yale University Press. p21.
32- Hussin A.A., Woldehiwet Z., 1994. Lymphocyte responce to viral antigens phytohaemagglutinin in persistently viremic sheep and lambs experimentally infected with border disease virus -Veterinary Microbiology -39. 1/2. 89.
33- Hussin A.A., Woldehiwet Z., 1994. Effects of experimental infection with borde disease virus on lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of lambs- Res Vet Sci 56. 2. 201.
P.F., 1983. The pathology of spontaneous and experimental mucosal disease like syndrome in sheep recovered from clinical border disease - Journal of Comparetive Pathology, 93.3451.
12- Barlow R.M., Rennie J.C., Gardiner A.C., 1980. Infection of pregnant sheep with NADL strain of bovine Viral diarrhae virus and their subsequent challenge with border disease IIB pool - Journal of Comparetive Pathology, 90.1.67.
13- Barlow R.M., Rennie J.C., Keir W.A., Gardiner A.C., Vantitis J.T., 1975. Experiments in Border disease :VII .The disease in Goats - Journal of Comparetive Pathology,2.291.
14- Barlow R.M., Vantitis J.T., Gardiner A.C., Linklater K.A., 1979. The definition of border disease :problems for diagnostician - Vet Rec 104.15.334.
15- Becher P., Meyers G., Shanon A.D., Thiel H., 1997. cDNA for detection of pestiviruses -J of Virology .70 .5. 2995.
16- Bonniwell M.A., Nettleton P.F., Gardiner A.C., Barlow R.M., Gilmour J.S., 1987. Border disease without nervus signs and fleece changes - Veterinary Record. 120. 11. 246.
17- Bottcher J., Gottschalk E., Graiser W.I., Moennig V., Bommeli W., Liess B., 1993. Diagnosis of bovine virus diarrhoea by Tow enzyme linked immunosorbent assay - Rev. Sci. Off. Int. Epiz .12.2. 641.
18- Burrells C., Nettleton P.F, Reid H.W., Miller H.R.P., Hopkins J., McConnell I., 1989. Lymphocyte subpopulations in the blood of sheep presistently infected with border disease virus - Clinical and experimental immunology 76.3.446.
19- Buxton A., Fraser G., 1977. Animal microbiology -Vol 2 -Blakwell Scientific Populations. PP:639.
20- Carlson U., 1991. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus - Vet.Record 128.7.145.
21- Carlson U., Blak K., 1994. Border disease virus transmited to sheep and cattle by a persistently infected ewe :epidemiology and control -Acta Veterinaria Scandinavica 35.1.79.
22- Collet M.S., Moennig V., Horzinek M.C., 1989. Recent advances in pestivirus research - J.Gen .Virol. 70. 253.
23- Durham P.J.K., Forbes F.J.C., Poole W.S.H., 1975. Hairy shaker disease :