المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٦، عدد إضافي ٤، ٢٠١٢ (٣٠٩-٣٢٠)
وقائع المؤتمر العلمي السادس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

عزل الفيروس الحلئي البقري النمط١من الأبقار في سوريا

صفوان يوسف البارودي، عزام كردي و أنور العمر

قسم الأحياء الدقيقة، كلية الطب البيطري، جامعة البعث، سوريا

الخلاصة

من اجل عزل الفيروس الحلئي البقري النمط-١- من الأبقار باستخدام المزارع الخلوية من نوع خلايا كلية أجنة الأبقار وتشخيصه باستخدام اختبار التعادل، تم جمع ٥٩٢ مسحة من ٢٣٠ حيوانا تضمنت (٢٣٠ مسحة أنفية، ١٠٢ مسحة مهبلية، ٢٣٠ مسحة عينية، ١٢ مسحات حشفة وقضيب، ٨ مسحات من أفات جلدية على ضرع الأبقار و ١٠ مسحات شرجية) من هذه الحيوانات كانت تعاني من أعراض تنفسية وسيلانات عينية مع احتقان ملتحمة العين وابيضاض العين وإجهاض في أوقات حمل متباينة مع سيلانات مهبلية، التهاب الحشفة والقضيب مترافقة بوجود سيلانات في الثيران الأكبر من سنتين، كما كانت بعض الأبقار تعاني من التهاب الضرع مع وجود أفات جلدية مزمنة عليه، أما العجول صغيرة العمر فكان البعض منها يعاني من إسهال بدرجات متباينة في الشدة ليكون في بعض الأحيان مدمما، بالإضافة إلى حيوانات سليمة ظاهريا. تبين من خلال عزل وتشخيص الفيروس الحلئي البقري النمط-١- في محطات الأبقار، أن نسبة الإصابة الإجمالية في سوريا باستخدام المزارع الخلوية من نوع خلايا كلية أجنة الأبقار كانت ٣٠,٥٧% في حين بلغت ٢١,٦٢% باستخدام اختبار التعادل، حيث كانت أعلى نسبة إصابة في محطة جب رملة وبكلا الطريقتين، سجلت اقل نسبة إصابة في محطة درعا وبكلتا الطريقتين أيضا". هذا وقد تبين وجود أعلى نسبة إصابة في المسحات المهبلية (٤٩,٠١%) باستخدام الزرع الخلوي بينما بلغت نسبتها (٣٤,٣١%) باستخدام اختبار التعادل، وقد سجلت اقل نسبة إصابة في مسحات الحشفة والقضيب والمسحات الجلدية من الضرع باستخدام المزارع الخلوية (٢٥%) بينما بلغت اقل نسبة إصابة باستخدام اختبار التعادل (٢٥%) في المسحات العينية. تبين من خلال النتائج وجود أعلى نسبة إصابة في الذكور الأقل من ٦ أشهر مقارنة بمجاميع الذكور الأخرى، أما الإناث فبلغت أعلى نسبة إصابة في الإناث الأقل من ٦ أشهر وبكلا الطريقتين حيث انخفضت النسبة بتقدم العمر. بينت نتائج تنمية الفيروس على خلايا كلية أجنة الأبقار وجود تمريرة واحدة عمياء (Blind Passage) ما عدا المسحات الشرجية (تمريرتين)، وقد تباين وقت ظهور الآفات الخلوية المرضية حيث قل الوقت بتقدم التمريرات، وتميزت الآفات المرضية الخلوية بحصول انتفاخ الخلايا، انكماش الخلايا، تكور الخلايا، تكون مجاميع عنقودية و فجوات، حيث تباينت هذه الآفات في التمريرات اعتمادا على نوع العينة، حيث كان أكثرها شدة في مسحات الحشفة والقضيب مقارنة ببقية العينات.

Isolation of bovine herpes virus type-1 (BHV-1) from cattle in Syria

S. Y. AL-Baroodi, A. Kurdi and A. Alomar

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Albaath University, Syria

Abstract

In order to isolate Bovine Herpes virus type -1- (BHV-1) from cattle using cell culture (Bovine fetal kidney cell) and diagnosis by neutralization test, 592 swabs (230 Nasal swabs, 102 Vaginal swabs, 230 Ocular swabs, 12 swabs from Balanus and penises, 8 swabs from skin lesion in udder and 10 Anal swabs) were collected from animals suffering from respiratory signs, ocular discharge with congestion in conjugtiva and opacity in the eye, abortion in different stages of pregnancy with vaginal discharge, inflammation in balanus and penis with discharge in ox older than 2 years, some cattle suffering from mastitis with chronic skin lesions in udder and teat, some young calves suffer from bloody diarrhea, and healthy cattle. The result of isolation and diagnosis of virus showed (30.57%) total percentage of infection using cell culture and (21.62%) using neutralization test. The highest percentage of infection was in Jub ramla farm, and the lowest percentage infection was in Dura farm using both methods. The study also showed the high percentage in vaginal swabs (49.01%) in cell culture, and in neutralization test (34.31%), whereas the lowest percentage of infection appeared in swabs from balanus and penises and swabs from skin lesion in udder (25%) in cell culture, while the lowest percentage of infection (25%) appeared in ocular swabs

using neutralization test. The study detected the high percentage of infection in young calves (less than 6 months) of both sex by using both methods. The results of propagation of samples in cell culture appear one blind passage except anal swabs (two blind passage), the cytopathic effect (CPE) differ in appearance as the time decrease with progress passage. The CPE manifested by cell swelling shrink and rounded of cells. Cluster appearance and Vacuoles. The CPE variad in passage depending on type of sample, the highest potency was in balanus and penises swabs when compared with other samples.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

يعد الفيروس الحلئي البقري النمط-١- من أهم الأمراض الفيروسية التي تصيب الأبقار، يعود هذا الفيروس إلى عائلة الفيروسات الحلئية Herpesviridae ويسبب في الأبقار أمراضا" عديدة، حيث يصيب الفيروس الجهاز التنفسي مسببا التهاب الأنف والرغامي الخمجي البقري (IBR) Infectious Bovine Rhinotrachitis والذي يترافق مع إصابة الجهاز التنفسي العلوي ومن ثم نزولا إلى الأسفل مسببا أعراضا تنفسية شديدة (١)، ويصيب الفيروس الجهاز التناسلي مسببا التهاب الفرج والمهبل البثري الخمجي في الإناث (IPV) Infectious Pustular Vulvovaginitis مسببا مشاكل تناسلية متمثلة بالإجهاض والذي يمكن أن يكون بشكل وباء مسببا" نسبة إجهاض قد تصل إلى ٦٠% في بعض القطعان، التهاب بطانة الرحم Endometritis، عقم Infertility (٢)، بينما يصيب الجهاز التناسلي للذكور مسببا التهاب الحشفة والقضيب البثري الخمجي في الثيران (IPB) Infectious Pustular Balanopsthitis مسببا مشاكل تناسلية فيها مسببة العقم (٣)، يصيب الفيروس أيضا" العين مسببا التهاب الملتحمة والقرنية (IBK) Infectious bovine keratoconjunctivitis حيث تتميز بحصول احتقان شديد بالعين مع سيلانات لتصل إلى ابيضاض العين ثم العمى، يصيب الفيروس الجهاز الهضمي في العجول صغيرة العمر مسببا"الإسهال، بالإضافة إلى إصابته للجهاز العصبي مسببا التهاب السحايا و الدماغ Meningoencephalitis مترافقا معه الفيروس الحلئي البقري النمط-٥- ويترافق الفيروس مع التهاب الضرع في الأبقار مسببا أفات جلدية مزمنة (٤) .

تتميز الإصابة بالفيروس الحلئي البقري بمرورها بثلاث مراحل، المرحلة الأولى هي مرحلة الخمج الحاد (Acute Infection) والتي تستغرق ٢-٣ أسابيع، تليها مرحلة الكمون (Latency) والتي تستغرق فترة زمنية طويلة حيث تمتاز بطرح الفيروس والذي يكون بشكل مستمر أو متقطع متأثرة بعوامل عديدة، منها الحالة المناعية للحيوان، العمر، نوع الذرية المسببة للمرض، وجود إصابات ثانوية أخرى فيروسية أو جرثومية، بالإضافة إلى الاختلاف في معيار الأضداد النوعية للفيروس خلال هذه الفترة، أما المرحلة الثالثة فتتمثل بإعادة التنشيط Reactivation بسبب تأثر الحيوان بظروف عديدة منها ضعف في الجهاز المناعي، أو إعطائه بعض العقاقير مثل الستيروئيدات القشرية أو تعرض الحيوان لعوامل إلاجهاد (٥)، تعد مرحلة الكمون من أهم الخصائص التي تميز الإصابة بهذا المرض إذ أن الإصابة تبدأ بدخول الفيروس إما عن طريق الأنف أو الجهاز التناسلي للأبقار بعد التلقيح بسائل منوي ملوث بالفيروس ومن ثم يتكاثر الفيروس في الأغشية المخاطية ومن ثم ينتقل للدم مسببا مرحلة انتشار الفيروس في الدم Viramia لينتقل إلى باقي الأعضاء مسببا ظهور الأعراض المرضية، يتمركز الفيروس في النهايات العصبية Sensitive ganglia، العقد العجزية Sacral ganglia، اللوزتين Pharyngeal tonsil، بعض العقد اللمفاوية للجهازين التنفسي والتناسلي حيث يمر الفيروس بمرحلة الكمون، يطرح الفيروس خلال هذه المرحلة بكميات متفاوتة من خلال السيلانات الأنفية، المهبلية، السائل المنوي، السيلانات العينية لتنتقل العدوى إلى حيوانات أخرى (٦).

يتم تشخيص الفيروس بعدة طرق منها التقصي عن الأضداد النوعية له أو عن طريق عزل الفيروس من خلال تنميته على خلايا الزرع الخلوي، تمتاز هذه الطريقة بكونها تعطي معاييرا نوعية للفيروس، إلا أنها قد تستغرق فترة زمنية قد تصل إلى ١٤ يوما نظرا لوجود تمريرات عمياء Blind passage، بالإضافة إلى ذلك فان هذه الطريقة تتأثر بمعيار الفيروس المطروح في السيلانات الأنفية والتناسلية حيث ينعدم أو يقل معيار الفيروس تبعا لمراحل الإصابة مما قد يعطي نتائج سلبية كاذبة بالرغم من وجود أو عدم وجود الأضداد النوعية في مصول الحيوانات المصابة، للفيروس قابلية للنمو على كثير من خلايا الزرع الخلوي، إلا انه من أكثرها حساسية له خلايا الزرع الخلوي المحضرة من أنسجة الأبقار وأجنتها (٧) .

تعد هذه الدراسة الأولى من نوعها في سوريا بالنظر إلى عدم قدرة باحثين (٨) لعزل الفيروس بالرغم من وجود معايير أضداد موجبة، ولذلك هدفت هذه الدراسة إلى عزل الفيروس من مصادر مختلفة للعدوى على خلايا كلية أجنة الأبقار وتشخيصه باختبار التعادل المصلي مع دراسة علاقة نسبة الإصابة بالعمر والجنس والموقع الجغرافي لمحطات الأبقار في سوريا.

المواد وطرائق العمل

الحيوانات

تم زيارة ١١ محطة للأبقار التابعة لوزارة الزراعة – المؤسسة العامة للمباقر حيث شملت (جب رمله، جورين، حمص، فيديو، طرطوس، درعا، الغوطة، الزربة، مسكنة، تل تمر، دير الزور) تم عمل استمارة فحص سريري لكل زيارة لهذه

المحطات لغرض جمع البيانات التالية عن الحيوان حيث شملت (عمر الحيوان، الجنس، وجود إجهاض، وقت حدوث الإجهاض، نوع الإجهاض) بالإضافة إلى إجراء فحص سريري لها للتقصي عن وجود علامات مرضية (تنفسية، عينية، تناسلية، عصبية، هضمية، التهاب ضرع، إصابات مزدوجة بأكثر من عرض سريري أو كون الحيوان سليم ظاهريا) .

جمع العينات

تم جمع العينات من ٢٣٠ حيوانا، شملت العينات مسحات (٥٩٢ مسحة) وتضمنت (٢٣٠ مسحة أنفية، ١٠٢ مسحة مهبلية، ٢٣٠ مسحة عينية، ٨ مسحات من الآفات الجلدية على الضرع، ١٠ مسحات شرجية و ١٢ مسحة من الحشفة والقضيب) حيث تم أخذها بطريقة معقمة ومن ثم وضعت في حافظة مبردة ونقلت بالسرعة القصوى إلى مخبر الفيروسات-مخبر الدراسات العليا والبحث العلمي حيث تم إضافة ٢ مليلتر من الوسط الزرعي الحافظ (Maintained media)، حركت المسحة عدة مرات مع مراعاة ضغط المسحة القطنية في الداخل على الجدار عدة مرات ومن ثم وضع الوسط الزرعي الحافظ في أنابيب زجاجية معقمة، ثم ثقلت في مثفلة مبردة ٢٠٠٠ دورة /دقيقة، ١٠ دقائق، ٤ م°، أهمل الراسب وتم اخذ الراشح (السائل العلوي) ووضع في أنابيب معقمة وحفظ في – ٧٠ م° لحين إجراء التنمية الفيروسية عليه (٩) .

تحضير مصل الجنين البقري

تم زيارة مسلخ مدينة حمص لعدة مرات وبعد الحصول على الأجنة بعد ذبح الأبقار مباشرة تم الحصول على دم الجنين من خلال ثقب القلب Cardiac Puncture، وضع الدم في عدة أنابيب سعة ١٠٠ مليلتر وبعد التأكد من تخثر الدم (١٥ دقيقة) تم وضعه في حافظة مبردة ونقل بالسرعة الممكنة إلى مخبر الفيروسات-مخبر الدراسات العليا والبحث العلمي، ثفل الدم في مثفلة مبردة ٣٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق، ٠ م°، جمع المصل ووضع في أنابيب تثفيل ١٠٠ مليلتر، وضعت في جهاز المثفلة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة ١٠ دقائق، ٠ م°، أهمل الراسب واخذ الراشح وتم ترشيحه لعدة مرات باستخدام مرشحات ابتداءا من ١٢٠ مايكرون، ٦٠، ٤٥، ٢٠ مايكرون تحت ضغط موجب وباستخدام جهاز ترشيح، وضع المصل في علب بلاستيكية معقمة (٥٠ مليلتر) وحفظ في – ٧٠ م°، وتم اخذ نموذج من مصل كل جنين حيث تم فحصه باستخدام اختبار التعادل المصلي للتأكد من خلوه من الأضداد للفيروس الحلئي البقري النمط-١-، (١٠) .

تحضير الوسط الزرعي الحافظ

تم إضافة ١٠,٦٩ غرام من الوسط الزرعي مع ١٠ غرام من مرق التربتوز الفوسفاتي Tryptose phosphate broth، ٠,٥٨٤ من الكلوتامين L-glutamine، ١,٥ غرام بيكاربونات الصوديوم NaHCO3 (2H2O)، ١٠٠٠٠٠ وحدة دولية بنسلين ج Penicillin G، ١٠٠ملغرام سلفات الستربتومايسين Streptomycin Sulfate، ٥٠ ملغرام سلفات الجنتاميسين Gentamicine sulfate، ٢,٥ ملغرام امفوتريسين ب Amphotericin B، تم إذابة الخليط في ماء مقطر ثنائي التقطير وخال من الكهارل (٩٥٠ مليلتر) وتم التأكد من الباء هاء PH=7.2، ومن ثم رشح تحت ضغط موجب (٢٠ مايكرون) تم إضافة ٥٠ مليلتر من مصل الجنين البقري وحفظ في ٤ م° (١١) .

تحضير الوسط الزرعي للنمو

تم إضافة ١٠,٦٩ غرام من الوسط الزرعي مع ١٠ غرام من مرق التربتوز الفوسفاتي Tryptose phosphate broth، ٠,٥٨٤ من الكلوتامين L-glutamine، ١,٥ غرام بيكاربونات الصوديوم NaHCO3 (2H2O)، ١٠٠٠٠٠ وحدة دولية بنسلين ج Penicillin G، ١٠٠ملغرام سلفات الستربتومايسين Streptomycin Sulfate، ٥٠ ملغرام سلفات الجنتاميسين Gentamicine sulfate، ٢,٥ ملغرام امفوتريسين ب Amphotericin B، تم إذابة الخليط في ماء مقطر ثنائي التقطير وخال من الكهارل (٩٠٠ مليلتر) ويتم التأكد من الباء هاء PH=7.2)، ومن ثم رشح تحت ضغط موجب (٢٠ مايكرون) تم إضافة ١٠٠ مليلتر من مصل الجنين البقري وحفظ في ٤ م° (١١) .

تحضير إنزيم التربسين (٠,٢٥%)

يتم إذابة ١ غرام من التربسين (TC,Difco,1:250) في ٤٠٠ مليلتر من دارئة الفوسفات السالبة (٨غرام كلوريد الصوديوم NaCl، ٠,٢ غرام كلوريد البوتاسيوم KCl، ١,٤٤ غرام بيكاربونات الصوديوم Na2HPO4.2H2O، ٠,٢غرام فوسفات البوتاسيوم KH2PO4 تذاب في ١٠٠٠ مليلتر ماء مقطر ويتم التأكد من الباء هاء PH=7.2) ومن ثم يرشح باستخدام جهاز المرشحة (٢٠ مايكرون) وحفظ في ٤ م° (١٢).

تحضير محلول التربسين فرسين

يتم ذلك باضافة ١,٧ غرام تربسين، ٨غرام كلوريد الصوديوم NaCl، ٠,٢ غرام كلوريد البوتاسيوم KCl، ١,٤٤ غرام بيكاربونات الصوديوم Na2HPO4.2H2O، ٠,٢غرام فوسفات البوتاسيوم KH2PO4، ١,٤ غرام أملاح EDTA و ١ مليلتر من الفينول الأحمر Phenol Red ٠,٤%، تذاب في ٩٩٩ مليلتر من ماء مقطر ثنائي التقطير وخال من الكهارل ويتم التأكد من الباء هاء PH=7.2 ومن ثم رشح باستخدام جهاز المرشحة (٢٠ مايكرون) حفظ في ٤ م° (١٢) .

تحضير خلايا كلية أجنة الأبقار

تم الحصول على أجنة أبقار بأعمار اكبر من ٦ أشهر من مسلخ مدينة حمص حيث تم أخذها مباشرة بعد ذبح الأبقار، تم تعقيم منطقة البطن ومن ثم فتحها باستخدام مشرط جراحي معقم، تم إزالة الكليتين باستخدام مقص جراحي وملقط معقمين، نقلت

الكليتين إلى حافظة بلاستيكية معقمة حاوية على الوسط الزرعي الحافظ ومن ثم نقلت بالسرعة الممكنة إلى مختبر الفيروسات، وضعت في حجرة الزرع المعقمة ومن ثم أزيل عنها المحفظة باستخدام مقص جراحي معقم وغسلت بالوسط الزرعي الحافظ عدة مرات، أزيلت القشرة على شكل شرائح وقطعت إلى قطع صغيرة ووضعت في حافظة معقمة حاوية على الوسط الزرعي الحافظ حيث غسلت عدة مرات، وضعت في حوجلة الهضم بالتربسين (Trypsnized flask) أضيف إليها أنزيم التربسين ٠,٢٥% (٣٧ م˚) بمعدل١:١٠ (1:10 Tissue-Trypsin Ratio) أضيف إليها قطعة مغناطيسية معقمة ووضعت فوق جهاز المزج المغناطيسي Magnetic stirrer لمدة ١٥ دقيقة على أن يراعى أن تكون سرعة جهاز المزج بطيئة لمنع تكون الفقاعات، أهمل السائل الراشح، ومن ثم أضيف للراسب (نسيج الكلية) كمية من التربسين ٠,٢٥% (١:١٠) ووضعت الحوجلة فوق جهاز المزج المغناطيسي لمدة ٣٠ دقيقة ومن ثم جمع الراشح، حيث كررت هذه العملية ٣ مرات، تم تمرير الراشح عبر شاش طبي موضوع داخل قمع زجاجي معقم عدة مرات، وضع الراشح في أنابيب زجاجية معقمة (٥٠ مليلتر) في مثفلة مبردة ١٥٠٠ دورة / دقيقة ١٠ دقائق، ٤ م˚، أهمل الراشح وتم إضافة ١٠ مليلتر من وسط النمو إلى الراسب، أعيدت الأنبوبة مرة ثانية للمثفلة حيث أعيدت هذه العملية ٣ مرات، تم حساب عدد الخلايا في الراسب وذلك بصبغها بصبغة التريبان الزرقاء Trypan Blue للتأكد من حيوية الخلايا ومن ثم تم حساب عدد الخلايا الحية باستخدام شريحة عد كريات الدم الحمر للحصول على تركيز نهائي للخلايا ٥ ×١٠^٦خلية / مليلتر، علقت الخلايا في الوسط الزرعي للنمو ومن ثم وضع ٥ مليلتر من العالق في حوجلة المزارع الخلوية Tissue culture flask (Falcon) سعة (٥٠ مليلتر) وضعت لمدة٣٠ دقيقة على جهاز هزاز ومن ثم حضنت ٣٧ م˚، 5% CO2، يراعى الفحص اليومي لها باستخدام المجهر المعكوس Inverted Microscope، وبعد مرور ٣-٥ أيام وبعد لتأكد من نمو الخلايا وذلك بالفحص اليومي لها، يتم بعد ذلك تحضير خلايا زرع ثانوية منها وذلك بسكب الوسط ا الزرعي للنمو ومن ثم يتم إضافة ١ مليلتر من محلول التربسين فرسينTrypsin Versene الدافئ ٣٧ م˚ وتبقى حوجلة الزرع تحت المراقبة بالمجهر المعكوس لمدة١-٢ دقيقة وبعد مشاهدة تكور الخلايا يسكب محلول التربسين فرسين ويضاف ٥ مليلتر من الوسط الزرعي للنمو٣٧ م˚ وبعد طرق جوانب الحوجلة عدة مرات لغرض فصل الخلايا عن سطح حوجلة الزرع الخلوي يتم وضع الوسط في أنابيب زجاجية معقمة وتوضع في جهاز المثفلة المبردة ٢٠٠٠دورة /دقيقة ١٠ دقائق، ٤ م˚، يهمل الراشح ويضاف للراسب ١٥ مليلتر من الوسط الزرعي للنمو ٣٧ م˚ 5% CO2، يوضع كل ٥ مليلتر من الوسط في حوجلة زرع خلوي سعة ٥٠ مليلتر ومن ثم توضع في الحاضنة ٣٧ م˚ 5% CO2، وتبقى تحت المراقبة اليومية بالمجهر المعكوس للتأكد من النمو (١٣).

تنمية الفيروس على خلايا كلية أجنة الأبقار

بعد تنمية خلايا الزرع الخلوي والتأكد من نموها وتكوينها طبقة خلايا متكاملة، يتم سكب الوسط الزرعي للنمو، تحقن المزارع ب ٠,١ مليلتر من المعلق الفيروسي الذي تم تحضيره من المسحات، تحضن ٣٧ م˚ لمدة ساعة، يضاف ٥ مليلتر من الوسط الزرعي للنمو ومن ثم توضع في الحاضنة ٣٧ م˚ 5% CO2، ويتم مراقبة التأثيرات على الخلايا لمدة ٥ أيام، يتم حصاد الفيروس وذلك بسكب وسط الزرع للنمو ومن ثم يضاف ٢ مليلتر من محلول التربسين فرسين لمدة ٣ دقائق ومن ثم يوضع المحلول في أنابيب معقمة ويوضع في المثفلة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة و ١٠ دقائق، ٤ م˚ يهمل الراشح ويضاف للراسب ٥ مليلتر من الوسط الزرعي الحافظ، يحفظ في – ٧٠ م˚ لحين إجراء التنمية التالية عليه، يكرر زرع العينة لأربعة مرات، يتم حساب المعيار الفيروسي لكل تمريره ويراعى في كل تمريره تسجيل التغيرات المرضية الخلوية cytopathic effect (CPE) ومعرفة نوعها ووقت ظهورها بعد الحقن بالساعات (١٤) .

تحضير المصل النوعي

تم استخدام الفيروس الحلئي البقري النمط-١- العترة اللقاحية (العترة الهنغارية) المنتج من قبل مديرية الصحة الحيوانية في دمشق، حيث حقن ٠,٢ مليلتر (10^6 $TCID_{50}$/0.2ml) في وريد أذن ١٠ أرانب محلية (بعمر ٦ أشهر) أسبوعيا ولمدة ٤ أسابيع، وبعد ٧ أيام من أخر جرعة، تم الحصول على اكبر كمية دم منها عن طريق ثقب القلب Cardiac Puncture، ثفل الدم للحصول على المصل ٢٥٠٠ دورة/دقيقة، ١٠ دقائق، ٤ م˚، حفظ المصل في – ٧٠ م˚ لحين استخدامه (١٤) .

تشخيص الفيروس

تم إجراء اختبار التعادل المصلي Serum Neutralization test حسب طريقة (١٥) حيث يتم تحضين المصل المضاد المحضر في الأرانب في الحمام المائي ٥٦ م˚ لمدة ٣٠ دقيقة لإبطال فعالية المتمم. ويتم تمديد الفيروس عشاريا في أنابيب لعشرة تخفيفات. ويتم اخذ ٢٥ مايكروليتر من الفيروس لكل تخفيف ووضعه في أنابيب صغيرة ومعقمة ومن ثم يضاف إليه ٢٥ مايكروليتر من المصل المضاد للفيروس الحلئي ألبقري النمط-١- المحضر من العترة الهنغارية اللقاحية والمنتجة من قبل مختبرات الصحة الحيوانية في دمشق يمزجان جيدا ويحضن لمدة ساعة ٣٧ م˚. ويتم تحضير خلايا زرع نسجي من نوع خلايا كلية أجنة الأبقار في الصفيحات الدقيقة ذوات ٩٦ حفرة حيث يتم إضافة ١٠٠ مايكروليتر من الخلايا لكل حفرة. ويتم إضافة ٥٠ مايكروليتر من المصل والفيروس الممزوجين إلى الخلايا (٤ حفر) ويحضن طبق الاختبار في ٣٧ م˚ (Co2 5%) وتفحص يوميا لمدة ٧ أيام لمشاهدة التغيرات المرضية على الخلايا CPE. ويتم احتساب النتيجة في العينات التي أظهرت أكثر من ٥٠% تأثيرا مرضيا للخلايا إذ تعتبر النتيجة ايجابية.

اختبار التعادل

لغرض معرفة معيار الفيروس الذي تم تنميته على خلايا الزرع الخلوي لكل تمريره، تم تمديد الفيروس المراد معرفة معياره عشاريا" (١٠ تخفيفات)، تم استخدام طريقة معايرة الفيروس في أطباق ذوات ٩٦ حفرة على أن تكون ذو قعر مسطح، تم إضافة ٥٠ ما يكروليتر من عالق لخلايا كلية أجنة الأبقار (10^6 خلية/مليلتر) ومن ثم أضيف إليها ٥٠ مايكروليتر من الوسط الزرعي للنمو، حضنت عند الدرجة ٣٧ م° CO2 5%، تمت مراقبتها لمدة ٧ أيام للتأكد من نموها بشكل طبقة خلايا متكاملة، تم سحب الوسط الزرعي للنمو باستخدام ماصة دقيقة ومن ثم أضيف ٥٠ مايكروليتر من كل تخفيف للفيروس لكل أربعة حفر، يراعى ترك ٤ حفر كشاهد إذ لايضاف إليها أي فيروس، يحضن الطبق لمدة ساعة ٣٧ م°، يضاف ٥٠ مايكروليتر من الوسط الزرعي للنمو إلى كل حفرة، يحضن الطبق ٣٧ م° CO2 5%، تراقب الحفر يوميا باستخدام المجهر المعكوس وتسجل التغيرات المرضية الخلوية ومن ثم يحتسب المعيار حسب طريقة Reed and Muench, 1938 (١٦).

النتائج

بينت نتائج الفحص السريري للأبقار التي تم جمع العينات منها وجود قسم منها يعاني من أعراض تنفسية تمثلت بوجود سيلانات أنفية متباينة الشدة مع احتقان للغشاء البطاني للأنف والمخطم (شكل ١) في حين عانى القسم الأخر من سيلانات عينية، احتقان ملتحمة العين، ابيضاض العين وصولا الى العمى (شكل-٢-) بينما أظهرت مجموعة الأبقار التي هي اكبر من سنتين إجهاضا بأوقات حمل متباينة مع وجود سيلانات مهبلية امتازت في كثير من الحالات باحتوائها على قيح (شكل-٣-) أظهرت بعض الثيران التي بلغت أعمارها أكثر من سنتين أعراضا امتازت بسيلانات واضحة من القضيب مع أعراض توحي بالتهاب الحشفة والقضيب ترافق معها ظهور أفات جلدية على القضيب مع أعراض تظهر الما" حادا" لها أثناء التبول مترافقة بسيلانات متباينة الشدة (الشكل-٤-)، أما العجول صغيرة العمر فعانى البعض منها من إسهال تباينت شدته ليكون في بعض الأحيان مدمما، وبإجراء الصفة التشريحية على بعضها الذي تعرض للهلاك تبين وجود احتقان في الأمعاء مع نزف في بطانتها مع آفات تنخرية على الرئة واحتقان القصبات الهوائية (الشكلين -٥ و٦-) بينما عانت بعض الأبقار من التهاب في الضرع إضافة لوجود آفات جلدية مزمنة عند البعض منها (الشكل -٧-).

أظهرت نتائج عزل وتشخيص الفيروس الحلئي البقري النمط-١- في محطات الأبقار في سوريا، أن نسبة الإصابة الإجمالية باستخدام المزارع الخلوية كانت (٣٠,٥٧%) في حين بلغت (٢١,٦٢%) باستخدام اختبار التعادل كذلك بينت النتائج أن أعلى نسبة إصابة كانت في محطة جب رملة وبكلا الطريقتين، في حين بلغت اقل نسبة إصابة في محطة درعا وبكلا الطريقتين أيضا"، وتباينت نسبة الإصابة في باقي المحطات، جدول-١-.

الشكل-١- يبين السيلانات الأنفية لعجل يبلغ اقل من ٦ شهور.

الشكل-٢- يبين السيلانات من العين مع ابيضاضها وإصابتها بالعمى.

تبين من خلال النتائج أن أعلى نسبة إصابة كانت في المسحات المهبلية إذ بلغت (٤٩,٠١%) باستخدام المزارع الخلوية بينما بلغت نسبتها باستخدام اختبار التعادل (٣٤,٣١%)، في حين بلغت اقل نسبة إصابة باستخدام المزارع الخلوية لكل من مسحات الحشفة والقضيب والمسحات الجلدية من الضرع إذ بلغت (٢٥%) بينما بلغت اقل نسبة إصابة باستخدام اختبار التعادل في المسحات العينية (٢٥%)، جدول-٢-.

بينت نتائج علاقة العمر والجنس بنسبة الإصابة باستخدام المزارع الخلوية والتعادل، حصول أعلى نسبة إصابة في الذكور الأقل من ٦ أشهر مقارنة بمجاميع الذكور الأخرى، أما الإناث

فبلغ أعلى نسبة إصابة في الإناث الأقل من ٦ أشهر وبكلا الاختبارين مقارنة بمجاميع الإناث الأخرى حيث انخفضت نسبة الإصابة بكلا الطريقتين بتقدم العمر، جدول-٣-.

الشكل-٣- يبين السيلانات المهبلية مصحوبا بالقيح لبقرة مصابة بالإجهاض.

الشكل-٤- يبين السيلانات من القضيب مع تكون أغشية فيبرينية على الحشفة لثور مصاب.

الشكل-٥- يبين إسهال في عجل اقل من شهرين.

الشكل-٦- يبين احتقان مع نزف في الأمعاء لعجل نافق.

الشكل-٧- يبين الآفات الجلدية على الحلمة لبقرة تم عزل الفيروس منها.

جدول (١): المقارنة مابين الاختبارات المستخدمة لتشخيص الإصابة بالفيروس الحلئي البقري النمط-١- في محطات الأبقار في سوريا.

ت	اسم المحطة	عدد الحيوانات	عدد العينات (المسحات)	عدد العينات الايجابية للزرع الخلوي لخلايا كلية أجنة الأبقار (نسبة الإصابة%)	عدد العينات الايجابية لاختبار التعادل (نسبة الإصابة%)
١	جب رملة	٢٠	٥٧	٢٩ (٥٠,٨٧)	٢٠ (٣٥,٠٨)
٢	جورين	٢٢	٥٣	٢٠ (٣٧,٧٣)	١٧ (٣٢,٠٧)
٣	حمص	٢٠	٤٩	١٠ (٢٠,٤)	٨ (١٦,٣٢)
٤	طرطوس	١٩	٤٣	١٥ (٣٤,٨٨)	١٣ (٣٠,٢٣)
٥	فيديو	١٩	٤٦	١٧ (٣٦,٩٥)	١٢ (٢٦,٠٨)
٦	درعا	٢٠	٥٢	١٠ (١٩,٢٣)	٤ (٧,٦٩)
٧	الغوطة	٢١	٥٦	١٦ (٢٨,٥٧)	١٤ (٢٥)
٨	مسكنة	٢٥	٧٠	٢٢ (٣١,٤٢)	١٢ (١٧,١٤)
٩	الزربة	٢٠	٥٢	١٢ (٢٣,٠٧)	٩ (١٧,٣)
١٠	تل تمر	٢٤	٥٨	١٨ (٣١,٠٣)	٩ (١٥,٥١)
١١	دير الزور	٢٠	٥٦	١٢ (٢١,٤٢)	١٠ (١٧,٨٥)
	المجموع	٢٣٠	٥٩٢	١٨١ (٣٠,٥٧)	١٢٨ (٢١,٦٢)

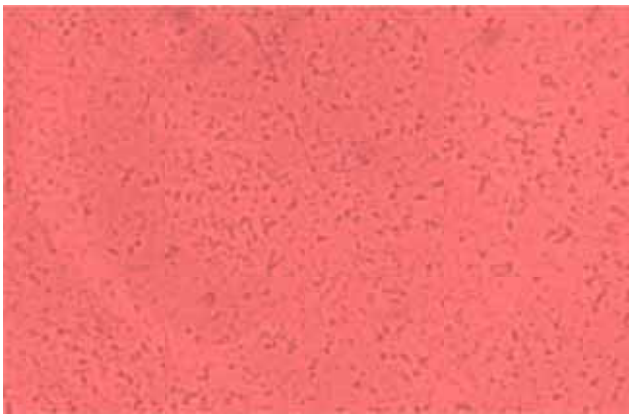
جدول (٢): عدد العينات الايجابية للمسحات المأخوذة من الأبقار باستخدام خلايا الزرع الخلوي لخلايا كلية اجنة الأبقار واختبار التعادل في محطات الأبقار في سوريا.

اسم المحطة	عدد العينات الايجابية للمسحات الأنفية		عدد العينات الايجابية للمسحات المهبلية		عدد العينات الايجابية للمسحات العينية		عدد العينات الايجابية للمسحات الشرجية		عدد العينات الايجابية للمسحات الجلدية من أفات التهاب الضرع		عدد العينات الايجابية لمسحات الحشفة والقضيب	
	خلايا الزرع الخلوي	اختبار التعادل	خلايا الزرع الخلوي	اختبار التعادل	خلايا الزرع الخلوي	اختبار التعادل	خلايا الزرع الخلوي	اختبار التعادل	خلايا الزرع الخلوي	اختبار التعادل	خلايا الزرع الخلوي	اختبار التعادل
جب رملة	١١	٨	٨	٥	٩	٦	٠	٠	٠	٠	١	١
جورين	٩	٩	٤	٤	٦	٣	٠	٠	٠	٠	١	١
حمص	٤	٣	٣	٣	٣	٢	٠	٠	-	-	٠	٠
طرطوس	٦	٦	٣	٢	٥	٤	٠	٠	١	٠	٠	٠
فيديو	٥	٣	٦	٤	٦	٥	-	-	-	-	٠	٠
درعا	٤	١	٤	١	١	١	٠	٠	١	١	٠	٠
الغوطة	٦	٥	٦	٥	٣	٣	١	١	٠	٠	٠	٠
مسكنة	٨	٥	٦	٤	٧	٢	١	١	٠	٠	٠	٠
الزربة	٤	٣	١	١	٥	٥	١	٠	٠	٠	١	٠
تل تمر	٧	٤	٥	٣	٦	٢	٠	٠	-	-	٠	٠
دير الزور	٥	٤	٤	٣	٣	٣	٠	٠	٠	٠	٠	٠
المجموع	٦٩	٥١	٥٠	٣٥	٥٤	٣٦	٣	٢	٢	١	٣	٢
%	٣٠	٢٢,١٧	٤٩,٠١	٣٤,٣١	٢٣,٤٧	١٥,٦٥	٣٠	٢٠	٢٥	١٢,٥	٢٥	١٦,٦٦

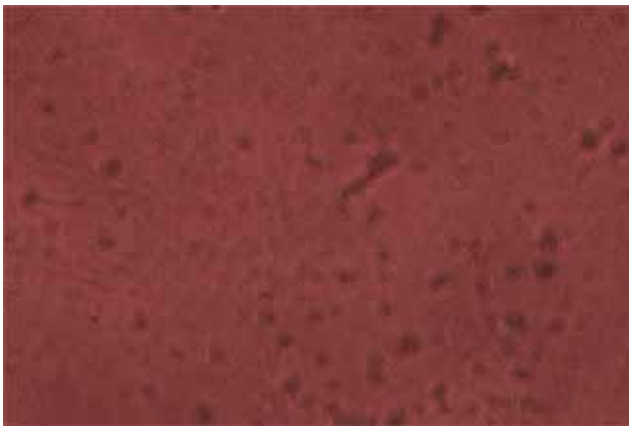
بينت نتائج تنمية الفيروس على خلايا كلية أجنة الأبقار (الشكل -٨-) وجود تمريرية عمياء (Blind Passage) لجميع العينات ما عدا العينات الشرجية (تمريرتين)، تباين وقت ظهور الآفات المرضية حيث قل الوقت بتقدم التمريرات، أما نوع التغيرات المرضية الخلوية فتميزت بحصول انتفاخ في الخلايا (الشكل-٩-)، انكماش في الخلايا (الشكل-١٠-)، تكور الخلايا (الشكل-١١-)، تكون مجاميع عنقودية (الشكل-١٢-) وتكون الفجوات (الشكل-١٣-).

جدول (٣): يبين علاقة العمر والجنس بنسبة الإصابة بالفيروس الحلئي البقري النمط-١- باستخدام المزارع الخلوية واختبار التعادل.

الجنس	العمر	نوع المسحات	العدد	عدد العينات الايجابية للمزارع الخلوية (النسبة المئوية %)	عدد العينات الايجابية لاختبار التعادل (النسبة المئوية %)
الذكور	اقل من ٦ شهور	تنفسية	٣٠	١٨ (٢٩,٠٣)	١٣ (٢٠,٩٦)
		عينية	٣٠	١٣ (٢٠,٩٦)	٥ (٨,٠٦)
		شرجية	٢	١ (١,٦١)	١ (١,٦١)
		المجموع	٦٢	٣٢ (٥١,٦١)	١٩ (٣٠,٦٤)
	٦ شهور-٢ سنة	تنفسية	٢٧	١٠ (١٧,٨٥)	٥ (٨,٩٢)
		عينية	٢٧	٨ (١٤,٢٨)	٣ (٥,٣٥)
		شرجية	٢	٠ (٠)	٠ (٠)
		المجموع	٥٦	١٨ (٣٢,١٤)	٨ (١٤,٢٨)
	اكبر من سنتين	تنفسية	١٢	٦ (٥٠)	٤ (١١,١١)
		عينية	١٢	٤ (١١,١١)	٤ (١١,١١)
		مسحات حشفة وقضيب	١٢	٣ (٨,٣٣)	٢ (٥,٥٥)
		المجموع	٣٦	١٣ (٣٦,١١)	١٠ (٢٧,٧٧)
الإناث	اقل من ٦ شهور	تنفسية	٣٥	١٥ (٢٠,٢٧)	١٣ (١٧,٥٦)
		عينية	٣٥	١٢ (١٦,٢١)	٨ (١٠,٨١)
		شرجية	٤	١ (١,٣٥)	١ (١,٣٥)
		المجموع	٧٤	٢٨ (٣٧,٨٣)	٢٢ (٢٩,٧٢)
	٦ شهور-٢ سنة	تنفسية	٢٤	٦ (١٠,١٦)	٤ (٦,٧٧)
		عينية	٢٤	٥ (٨,٤٧)	٥ (٨,٤٧)
		شرجية	٢	١ (١,٦٩)	٠ (٠)
		مهبلية	٩	٥ (٨,٤٧)	٣ (٥,٠٨)
		المجموع	٥٩	١٧ (٢٨,٨١)	١٢ (٢٠,٣٣)
	٢<- ٤ سنوات	تنفسية	٣٩	٧ (٦,٣)	٦ (٥,٤)
		عينية	٣٩	٥ (٤,٥)	٣ (٢,٧)
		مهبلية	٣٠	١٧ (١٥,٣١)	١٣ (١١,٧١)
		جلدية من الضرع	٣	١ (٠,٩)	٠ (٠)
		المجموع	١١١	٣٠ (٢٧,٠٢)	٢٢ (١٩,٨١)
	٤< -٧ سنوات	تنفسية	٣٨	٥ (٤,٢٣)	٥ (٤,٢٣)
		عينية	٣٨	٤ (٣,٣)	٤ (٣,٣)
		مهبلية	٣٨	١٩ (١٦,١)	١٢ (١٠,١٦)
		جلدية من الضرع	٤	١ (٠,٨٤)	١ (٠,٨٤)
		المجموع	١١٨	٢٩ (٢٤,٥٧)	٢٢ (١٨,٦٤)
	اكبر من ٧ سنوات	تنفسية	٢٥	٢ (٢,٦٣)	٢ (٢,٦٣)
		عينية	٢٥	٣ (٣,٩٤)	٣ (٣,٩٤)
		مهبلية	٢٥	٩ (١١,٨٤)	٨ (١٠,٥٢)
		جلدية من الضرع	١	٠ (٠)	٠ (٠)
		المجموع	٧٦	١٤ (١٨,٤٢)	١٣ (١٧,١)



الشكل-٨- خلايا كلية أجنة الأبقار قبل حقنها بالفيروس.

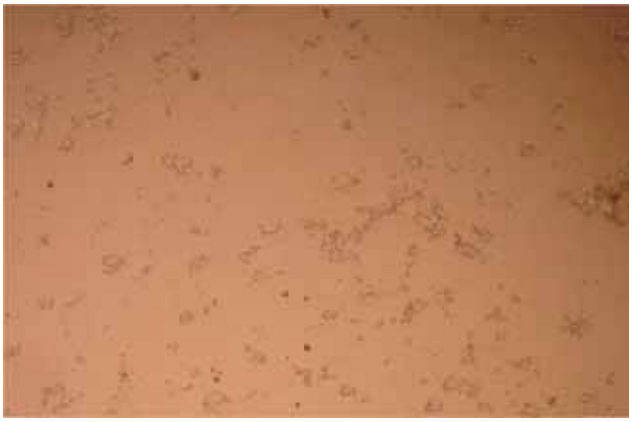


الشكل-٩- انتفاخ خلايا كلية أجنة الأبقار بعد حقنها بالفيروس.

الشكل-١٠- انكماش خلايا كلية أجنة الأبقار بعد حقنها بالفيروس.

الشكل-١١- تكور خلايا كلية أجنة الأبقار بعد حقنها بالفيروس.

الشكل-١٢- تكون مجاميع عنقودية من خلايا كلية أجنة الأبقار بعد حقنها بالفيروس.



الشكل-١٣- تكون فجوات في خلايا كلية أجنة الأبقار بعد حقنها بالفيروس.

إن التغيرات المرضية الخلوية كانت متباينة في ظهورها في التمريرات اعتمادا على نوع العينة حيث كان أكثرها شدة في مسحات الحشفة والقضيب مع وجود أعلى معيار للفيروس (٢×١٠^{٧}) مقارنة ببقية العينات التي ارتفع معيار الفيروس فيها بتقدم التمريرات، حيث كان اقل معيار للفيروس في المسحات الشرجية، جدول-٤-.

جدول (٤): يبين نتائج تنمية العينات (المسحات) بأنواعها على خلايا كلية أجنة الأبقار مع بيان نوع التغيرات المرضية الخلوية مع وقت ظهورها بالساعات، ومعيار العزولات لكل تمريرة.

مصدر العينة	رقم التمريرة	عدد العزولات	وقت ظهور التغيرات المرضية الخلوية بالساعات				نوع التغيرات المرضية الخلوية				متوسط معيار العزولات $TCID_{50}/0.2ml$
			١٨	٣٠	٤٨	٧٢	انتفاخ الخلايا	انكماش الخلايا	تكور الخلايا	تكون مجاميع عنقودية	تكون فجوات	
١ مسحات	الأولى	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
أنفية	الثانية	٢٢	٠	١١	٦	٥	١٥	٣	٤	٠	٠	٢×١٠^{٢}
	الثالثة	٤٣	٠	١٦	١٤	١٣	٢٠	١٤	٦	٣	٠	$٢\times١٠^{٣.٧}$
	الرابعة	٥١	١٠	٢٢	١٣	٦	٢٣	١٠	١٠	٨	٠	$٢\times١٠^{٥,٥}$
٢ مسحات	الأولى	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
مهبلية	الثانية	١٥	٠	١١	٢	٢	٨	٢	٥	٠	٠	$2\times10^{3.5}$
	الثالثة	٢٨	١١	٨	٦	٣	١٥	٦	٤	٣	٠	$2\times10^{5.5}$
	الرابعة	٣٥	١٥	٧	٦	٧	١٩	٦	٥	٤	١	$2\times10^{6.5}$
٣ مسحات	الأولى	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
عينية	الثانية	١٩	٠	٨	٥	٦	١٣	٦	٠	٠	٠	$٢\times١٠^{١,٣}$
	الثالثة	٢١	٠	١٠	٥	٦	١٤	٢	٣	٢	٠	$٢\times١٠^{٢,٧}$
	الرابعة	٣٦	٥	١٤	١٠	٧	١٢	١٠	٨	٦	٠	$٢\times١٠^{٤,٤}$
٤ مسحات	الأولى	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
شرجية	الثانية	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
	الثالثة	١	٠	٠	٠	١	١	٠	٠	٠	٠	$٢\times١٠^{١,١}$
	الرابعة	٢	٠	٠	١	١	١	١	٠	٠	٠	$٢\times١٠^{٢,٤}$
٥ مسحات	الأولى	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
جلدية من	الثانية	١	٠	٠	١	٠	٠	١	٠	٠	٠	$٢\times١٠^{٢,٩}$
الضرع	الثالثة	١	٠	١	٠	٠	٠	١	٠	٠	٠	$٢\times١٠^{٣,٤}$
	الرابعة	١	٠	١	٠	٠	٠	٠	١	٠	٠	$٢\times١٠^{٥,١}$
٦ مسحات	الأولى	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
الحشفة	الثانية	١	٠	١	٠	٠	٠	٠	١	٠	٠	$٢\times١٠^{٣,٢}$
والقضيب	الثالثة	٢	١	١	٠	٠	٠	٠	٠	١	١	$٢\times١٠^{٤,٦}$
	الرابعة	٢	٢	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٢	٢×١٠^{٧}

المناقشة

جرى الاهتمام بالفيروس الحلئي البقري النمط-١- الذي يصيب الأبقار على مدى عقود عديدة وذلك لكونه يتسبب بخسائر اقتصادية كبيرة في معظم أنحاء العالم، تم خلال هذه الدراسة عزل الفيروس الحلئي البقري النمط-١- من ٢٣٠ حيوانا بمختلف الأعمار والأجناس، حيث تبين أن نسبة الإصابة الكلية في محطات الأبقار في سوريا (٣٠,٥٧%) باستخدام المزارع الخلوية من نوع خلية كلية أجنة الأبقار، بينما بلغت النسبة الكلية باستخدام اختبار التعادل (٢١,٦٢%) أما نسبة الإصابة في محطات الأبقار فبلغت أعلى نسبة إصابة في محطة جب رملة وبكلتا الطريقتين بينما بلغت اقل نسبة إصابة في محطة أبقار

درعا وبكلتا الطريقتين أيضا، توجد محاولة واحدة لعزل الفيروس في سوريا (٨)، إلا أن هذه الدراسة لم تتمكن من عزل الفيروس في محطات الأبقار وباستخدام خلايا كلية العجول، إن المزارع الخلوية تعد من أكثر الطرق شيوعا لإنماء الفيروس الحلئي البقري النمط-١-، إذ تعتبر الخلايا ذات المنشأ البقري من أكثرها حساسية للفيروس، إن سبب الاختلاف ما بين الدراسة أنفة الذكر وبين الدراسة الحالية يعود لأسباب عديدة منها : للفيروس الحلئي البقري النمط-١- فترة كمون، إذ يقل فيها معيار الفيروس المطروح من السيلانات الأنفية، المهبلية، العينية فضلا عن السيلانات الأخرى (١٧)، إضافة إلى أن الدراسة الحالية كانت دراسة انتقائية للحالات التي تم منها اخذ العينات، إذ تم جمع غالبيتها من حالات كانت تظهر أعراضا" مميزة للإصابة بالفيروس الحلئي البقري النمط-١- بأشكاله المرضية المتعددة، إن سبب انخفاض نسبة الإصابة باستخدام اختبار التعادل مقارنة بالمزارع الخلوية يعود إلى أن الإصابة بالفيروس الحلئي البقري النمط-١- تكون في غالب الأحيان ضمن متلازمة مرضية يطلق عليها المرض التنفسي البقري (BRD) Bovine Respiratory Disease حيث يكون ضمن مسبباته فيروسات أخرى يمكنها أن تنمو على المزارع الخلوية (١٨).

بينت نتائج العزل الفيروسي من المسحات المتعددة التي تم جمعها، أن أعلى نسبة إصابة كانت في المسحات المهبلية وبكلتا الطريقتين، فيما كانت اقل نسبة للإصابة في مسحات الحشفة والقضيب والمسحات الجلدية من الضرع باستخدام المزارع الخلوية، فيما كان اقلها باستخدام اختبار التعادل في المسحات الجلدية للضرع، إن التباين في نسبة الإصابة في المسحات التي تم تنميتها يعود إلى الاختلاف في نسبة الإصابة بذراري الفيروس المختلفة، بالإضافة إلى الاختلاف في معايير الفيروس المطروحة إلى خارج الجسم في سوائل الجسم المختلفة (١٩)، فيما بين (٢٠) وجود أعلى نسبة للإصابة في المسحات الأنفية، إن هذا الاختلاف يعود إلى الاختلاف في الرقعة الجغرافية ما بين البلدان، بالإضافة إلى الاختلاف في امراضية الذراري المنتشرة في أنحاء العالم.

أظهرت نتائج علاقة الجنس والعمر بنسبة الإصابة وجود أعلى نسبة إصابة في الحيوانات الأقل من ٦ أشهر ولكلا الجنسين، وهذا يتفق مع (٢١) حيث ذكر أن ارتفاع نسبة الإصابة في العجول صغيرة العمر يعطي مؤشرا على انتشار الإصابة في قطعان الأبقار، حيث أن العجول صغيرة العمر حساسة للإصابة أكثر من كبيرة العمر، وبين وجود إصابة في العجول الأقل من شهر بالرغم من وجود أضداد واردة من الأم ذات معايير ايجابية.

أظهرت النتائج أيضا وجود علاقة عكسية ما بين نسبة الإصابة والعمر، حيث قلت النسبة بتقدم العمر، ويعود السبب في ذلك إلى الأخطاء في نظم التربية، حيث تلقح الأبقار (البكاكير) طبيعيا من ثيران لم تفحص بأي نوع من الفحوصات المستخدمة للكشف عن الفيروس الحلئي البقري النمط-١-، مما يجعلها عرضة للإصابة في حال لم تكن مصابة قبل ذلك وحصول حالة الإصابة الإضافية Super infection مما قد يؤدي في بعض الحالات إلى ظهور طفرات وراثية نتيجة حالة التأشب Recombination (٢٢) إن الحيوانات كبيرة العمر تكون استجابة مناعية نظرا للتعرض المتكرر للفيروس طوال حياتها مما قد يقلل من ظهور الأعراض المرضية عليها وكذلك انخفاض في معيار الفيروس المطروح خارج الجسم (٢٣) بالإضافة إلى ذلك فان الثيران المستخدمة في التلقيح الطبيعي للبكاكير أثبت حصول إصابة فيها في دراستنا الحالية.

كذلك بينت نتائج تمرير الفيروس على خلايا الزرع الخلوي وجود تمريرة واحدة عمياء فيما عدا عينات المسحات الشرجية (تمريرتين) وهذا الاختلاف يعود إلى الاختلاف في معيار الفيروس المطروح لخارج الجسم (٢٤) أما التغيرات المرضية الخلوية فكان وقت ظهورها متباينا حيث كانت في بعض المسحات تبلغ ١٨ ساعة، وهذا يتفق مع (٢٥) حيث بين أن التغيرات المرضية الخلوية يختلف وقت ظهورها حسب ضراوة الذراري المختلفة بالإضافة إلى الاختلاف في معايير الفيروس في السيلانات حيث تختلف معاييرها حسب مرحلة الإصابة التي يمر بها الفيروس حيث تكون مرتفعة في مرحلة الإصابة الحادة بالمقارنة مع المراحل الأخرى (٢٦)، أما نوع التغيرات المرضية الخلوية فكانت متباينة أيضا حيث ازدادت شدة بتقدم التمريرات مع زيادة في معايير الفيروس في كل تمريرة وبنسب متباينة إلا أن أكثرها شدة لمسحات الحشفة والقضيب بالإضافة إلى المسحات المهبلية مما يعطي مؤشرا على شدة الذراري المسببة لإصابة الجهاز التناسلي لكلا الجنسين بمحطات الأبقار في سوريا، إن الاختلاف في الذراري المسببة للمرض يعطي مؤشرا واضحا لاختلافها في قابليتها للنمو وإحداث التغيرات في المزارع الخلوية، بالإضافة إلى ذلك فان الكثير منها له القابلية لإحداث أكثر من عرض سريري بنفس الوقت مما قد يعطي اختلافا في معايير الفيروس المطروح بالسيلانات المختلفة لنفس الحيوان، مما قد يؤثر على سرعة نموه وإظهاره للتغيرات المرضية الخلوية (٢٧).

يتبين من خلال هذه الدراسة وجود إصابة بالفيروس الحلئي البقري النمط-١- وبمراحل إصابة مختلفة، إلا أن هذه النسب كانت غير مرتفعة مقارنة بدراسات كثيرة أخرى، فقد يعود السبب في ذلك إلى الاختلاف في طبيعة التربية، الاختلاف في ضراوة الذراري، كمية الجرعة الفيروسية التي يتعرض لها الحيوان، الاختلاف في برامج التحصين ونوع اللقاح المستخدم، إن فترة الإصابة الكامنة للفيروس تكون من أطول المراحل من ناحية الفترة الزمنية وأكثرها شيوعا مع صعوبة الكشف عن الفيروس في تلك المرحلة مما يجبر الكثير من الباحثين إلى إعطاء الحيوانات الستيروئيدات القشرية والذي يؤدي إلى إعادة تنشيط الإصابة وظهور الأعراض المرضية وعودة طرح الفيروس في السيلانات بمعايير مرتفعة مما يجعلها احد الطرق المستخدمة للكشف عن الفيروس خصوصا في الثيران المنتخبة لأغراض التلقيح الاصطناعي.

المصادر

1. Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR eradication. Vet Microbiol. 2006;113 (4) :293-302.
2. Ata A, Kale M,Yavru S, Bulut O, Buyukyoruk U. The Effect of subclinical bovine herpesvirus 1 infection on fertility of cows and heifers.Acta Veterin. (Beograd) .2006; 56 (3) :267-273.
3. Yavru S,Ozturk F,Simsek A,Yapkic O, Yildiz CIsolation of bovine herpesvirus type 1 from bovine semen in Turkey Revue Med Vet. 2001 152 (9) :633-636.
4. Fernando RS, Ana CF, Frans AMR, Rudi W, Edusrdo FF,Paulo MR.In vitro characterization of gE negativeBovine herpesvirus types 1.1 (BHV-1.1) and 1.2a (BHV-1.2a) . Brazilian J Microbiol. 2004;35:264-268.
5. Thiry J,Kruser V,Muylkens B,Meurens F,Gogev S, Vanderplasschen A,Thiry E.Ruminant alphaherpesviruses related to Bovine herpes virus1.Vet. Res. 2006 ; 37:169-190.
6. Winkler MTC, Doster A, Jones C.Persistence and Reactivation of bovine herpes virus -1- in the tonsils of Latently infected calves.J.Virol.2000;74 (11) :5337-5346.
7. Van SDH, Myers DPA, Doig BK, Habermehl M, Babiuk LA, Jelinski M, Van DJ, Schlesinger K, RinehartC. Identification of a mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in Post –arrival outbreaks of IBR in feedlot calves and protection With conventional vaccination.Candian J Vet. Res.2001;65:81-88.
8. الياس ينو ياسين و العمر أنور.عزل فيروس مرض التهاب الأنف والرغامى المعديIBR عند الأبقار في سورية (قيد النشر , مجلة جامعة البعث) ; ٢٠١١.
9. Mahmoud MA,Nahed AM, Allam AM. Investigation on Infectious bovine rhinotrachitis in Egyptian cattle and Buffaloes Global Veterin.2009; ,3 (4) :335-340.
10. Rai A.Methods in veterinary virology ,Indian Vet. Res. Institute,India.2005 PP:50-52.
11. Mhan KM, Rajasekhar M, Krishnappa G. Isolation of infectious Bovine rhinotrachitis virus in Karnataka.Indian Vet. J. 1994;71 (2) : 109-112.
12. Dispas M, Schynts F, Lemaire M, Letellier C,Vanopdenbosch E, Thiry E, Kerkhofs P.Isolation of a glycoprotein E deleted bovine herpes virus 1 strain in field.Vet.Rec. 2009;153:209-212.
13. Rai A.Laboratory manual of cell culture and animal virology, Indian Veterinary research Institute.India.2008;PP:8-12.
14. Wyss SK.Etablierung und Anwendung einer auf der restriktionenzym analyse basierenden cluster- technik und einer datenbank des Bovinen herpesvirus typ 1 fur molekular – epidemiologische Untersuchungen.Veterrinary Medicine thesis,University of Zurich.2001,1-67.
15. Amira ME,Fadol MA, Karrer AE, Elhussin ARM. IBR Virus in Sudan:Epidemiological and Serological studies.Journal of Anim. and Vet. Adv..2006;5 (12) :1053-1057.
16. Benoit M, Julien T, Philippe K, Frederic S, Etienne T. Bovine Herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotrachitis.Vet. Res.2007; 38:181-209.
17. Joze G, Peter H, Ivan T, Darja BM. Molecular detection of BHV-1 in artificially inoculated semen and in the semen of a Latently infected bull treated with dexamethasone. Vet J. 2005;23 (2) :112-118.
18. Clinton J, Shafiqul C.A. Review of the biology of bovine herpesvirus Type 1 (BHV-1) ,its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. Ani. Heal. Res. Rev.2007;8 (2) :187-205.
19. Bosco DJC, Tracy AC, Michael LD, Simon JM. Aspects of Bovine herpesvirus-1 infection in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. Acta Vet. Scand.2011;53 (1) :40-51.
20. Grady LON, Collins DCT, More S. Herd within –herd BoHV-1 Prevalence among Irish beef herds submitting bulls for entry to a Performance testing station. Irish Vet. J.2008;61:809-815.
21. Dubois E, Duquesne V, Gastaldi C, Del Cont Aurelie VM, Thiry R.Strategy for IBR monitoring and herd qualification in France. Czech Vet Med.2010;22:60-68.
22. Meurens F,Schynts F,Keil GM, Muylkens B,Vander-Plasschen A, Gallego P, Thiry E.Superinfection Recombination of the alphaherpesvirus bovine Herpesvirus1. J Virol.2004;78 :3872-3879.
23. Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS.Bovine herpesvirus Infection in cattle. Ani Heal Res Rev.2009;10 (1) :85-98.
24. Penny CD, Sargison ND, Howie F. Upper respiratory disease And encephalitis in neonatal beef calves caused by bovine Herpesvirus 1. Vet Rec.2002;151:89-91.
25. Meyer G, Lemaire M, Ros C. Comparative pathogenesis of acute And latent infections of calves with bovine herpesvirus 1. Arch Virol.2001;146:633-652.
26. Lovato L,Inman M,Henderson G,Doster A, Jones A.Infection Of cattle with a bovine herpesvirus 1 strain that contains a Mutation in the latency –related gene leads to increased Apoptosis on trigeminal ganglia during the transition from Acute infection to latency. J Virol.2003;77:4848-4857.
27. Kirkland XPD,Davis RJ, Hornitzky CL. Australian strains of Bovine herpesvirus 1 are genetically homogenous. World Association of Veterinary laboratory Diagnosticans-13th International. Symposium, Melbourn, Australia. 2007;11-14 Sep.