جامعة الموصل

كلية الطب البيطري

عزل وتشخيص فيروس جدري الأغنام و تحضير لقاح حي مضعف من العزلة المحلية

فنار أبلحد إسحق

أطروحة دكتوراه فلسفة

الأحياء المجهرية البيطرية / الطب البيطري

باشراف

الأستاذ الدكتور

مزاحم ياسين خليل العطار

1436هـ 2015 م

University of mosul

College of Veterinary Medicine

Isolation and Diagnosis of Sheep Pox Virus and Preparation of Live Attenuated Vaccine From The Local Isolate

Fanar Ablahad Isihak

Ph.D / Thesis

Veterinary Microbiology / Veterinary Medicine

Supervised by

Professor

Dr. Mozahim Yassin Khalil Al-Attar

2015 A.D. **A.H. 1436**

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع
I	**قائمة المحتويات**
III	**قائمة الجداول**
IV	**قائمة الأشكال**
IV	**قائمة المختصرات**
2-1	**الفصل الأول : المقدمة**
26-3	**الفصل الثاني : استعراض المراجع**
3	2-1 تعريف المرض
3	2-2 تاريخ المرض
4	2-3 التوزيع الجغرافي للمرض
4	2-4 تصنيف الفيروس
5	2-5 صفات الفيروس
5	2-6- صفات جينوم فيروس الجدري
6	2-7- طريقة دخول فيروس الجدري الى الخلية الهدف
6	2-8 عزلات الفيروس وعتره
7	2-9 الأشكال المستضدية لفيروس Capripox
7	2-10 العلاقة بين أجناس Capripox viruses
9	2-11 الأهمية الاقتصادية للمرض
10	2-12 طرق إنتقال المرض
10	2-13 الأمراضية والعلامات السريرية
11	2-14 الآفات العيانية والمجهرية
12	2-15- تسلسل الحامض النووي
13	2-16 التشخيص
13	2-16-1 العزل الفيروسي
14	2-16-2 اختبار التلازن الدموي
15	2-16-3 اختبار تثبيت المتمم
15	2-16-4 اختبار الترسيب المناعي في هلامة الأكار
15	2-16-5 اختبار الترحيل المناعي الكهربائي
16	2-16-6 اختبار التعادل المصلي
16	2-16-7 اختبار الأضداد المعلمة بالفلورسين
17	2-16-8 اختبار التحلل الدموي الشعاعي المنفرد
17	2-16-9 اختبار الإنتشار المناعي الشعاعي المفرد
18	2-16-10 المجهر الالكتروني
18	2-16-11 اختبار الإنزيم المناعي الممتز (الاليزا)
19	2-16-12 تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)
20	2-17 التشخيص التفريقي
21	2-18 العلاج
21	2-19- الادوية المضادة للفيروسات
22	2-20 الوقاية والسيطرة على المرض

الموضوع	الصفحة
2-21 اللقاحات والتحصين ضد المرض	22
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل	27-46
3-1 المواد والمحاليل المستخدمة	27
3-2 الأجهزة المستخدمة	28
3-3 العينات	29
3-4 تحضير المصل عالي التمنيع	31
3-5 البيض المستخدم في عملية التمرير التسلسلي	31
3-6 التمرير التسلسلي للفيروس الحقلي في أجنة بيض الدواجن	32
3-7 حساب الجرعة الخمجية للعزلة الفيروسية (التمريرة السادسة)	33
3-8 اختبار التلازن الدموي	34
3-9 اختبار الترسيب المناعي في هلامة الأكار	35
3-10 الفحص النسجي	36
3-11 اختبار التعادل المصلي	36
3-12 التشخيص الجزيئي	37
3-12-1 استخلاص الحامض النووي الفيروسي	38
3-12-2 حساب تركيز الحامض النووي المستخلص	39
3-12-3 تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل لتشخيص فيروس جدري الأغنام	39
3-12-4 الكشف عن نواتج عملية تضخيم الحامض النووي	41
3-13 طرق تقييم فيروس جدري الأغنام المضعف	42
3-13-1 معيار الجرعة اللقاحية للعزلة الفيروسية (التمريرة السادسة عشرة)	42
3-13-2 اختبار درجة تضعيف الفيروس (معايرة الفيروس التمريرة السادسة عشرة) في أدمة جلد الأغنام	42
3-13-3 اختبار التحدي	44
3-13-4 اختبار النقاوة	44
3-13-5 اختبارات الأمان	44
3-14 معايرة بعض اللقاحات المستخدمة في تلقيح الأغنام في أجنة بيض الدواجن	45
3-14-1 معايرة لقاح جدري الأغنام العراقي	45
3-14-2 معايرة لقاح جدري الأغنام الأردني	45
الفصل الرابع : النتائج	47-58
4-1 الآفات العيانية	47
4-2 نتائج التمرير التسلسلي الأولي للفيروس الحقلي في أجنة بيض الدواجن	49
4-3 معيار الجرعة الخمجية للعزلة الفيروسية (التمريرة السادسة)	51
4-4 اختبار التلازن الدموي	51
4-5 الترسيب المناعي في هلامة الأكار	51
4-6 الفحص النسجي	53
4-7 اختبار التعادل المصلي	53
4-8 التشخيص الجزيئي	53
4-8-1 تركيز الحامض النووي (DNA)	53

الصفحة	الموضوع
54	4-8-2 تفاعل البلمرة المتسلسل
54	4-9 تقييم فيروس جدري الأغنام المضعف
54	4-9-1 معيار الجرعة اللقاحية للعزلة الفيروسية (التمريرة السادسة عشرة)
54	4-9-2 اختبار درجة تضعيف العزلة الفيروسية (المعايرة في أدمة الجلد)
55	4-9-3 اختبار التحدي
57	4-9-4 اختبار النقاوة
57	4-9-5 اختبارات الأمان للعزلة الفيروسية المضعفة
57	4-9-5-1 من استخدام جرع عالية
57	4-9-5-2 الأمان في الإناث الحوامل
57	4-10 معايرة اللقاحات في أجنة بيض الدواجن
57	4-10-1 معيار اللقاح العراقي في أجنة بيض الدواجن
57	4-10-2 معيار اللقاح الأردني في أجنة بيض الدواجن
65-59	**الفصل الخامس : المناقشة**
66	**الاستنتاجات**
67	**التوصيات**
80-68	**المصادر**
81	**الخلاصة باللغة الإنكليزية**

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان
28	الجدول (1) الاجهزة والادوات المستخدمة في الدراسة
34	الجدول (2) طريقة حساب معيار الجرعة الخمجية للفيروس باستخدام معادلة ريد ومنش لقياس الجرعة الخمجية ل 50% من الاجنة المحقونة (EID_{50}/0.1 ml)
39	الجدول (3) كميات وتفاصيل المواد المستخدمة في استخلاص الحامض النووي الفيروسي والمجهزة من قبل الشركة المنتجة للعدة التشخيصية
40	الجدول(4) تفاصيل العينات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)
40	الجدول (5) الكميات المطلوبة من المواد لمزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR
41	الجدول (6) خطوات وبرنامج عمل جهاز الThermocycler حسب بروتوكول الشركة المجهزة (Bioingentich.Ltd.Chile)
47	جدول (7) المناطق التي جمعت منها العينات (26 عينة) وعدد الحيوانات المصابة مع النسبة المئوية للاصابة في هذه المناطق
49	الجدول (8) نتائج التمريرات الثلاثة الأولى للعينات المنتخبة في أجنة بيض الدواجن
53	الجدول (9) تركيز ونقاوة الحامض النووي للعينات المستخدمة في الاستخلاص

قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان
30	الشكل (1) الخطة البحثية للدراسة الحالية
43	الشكل (2و3) منطقة الخاصرة بعد تحضيرها لمعايرة العزلة الفيروسية (التمريرة 16) في أدمة جلد الاغنام
48	الشكل (4) آفات عقدية متعددة الشكل والحجم تحت الإبط لحملان بعمر 3-4 اشهر مصابة طبيعيا بمرض الجدري في منطقة ابو جربوعة
48	الشكل (5) آفات عقدية متعددة الشكل والحجم لمرض الجدري في منطقة الفخذ لحملان بعمر 3-5 اشهر مصابة طبيعيا بالمرض في منطقة دراويش
50	الشكل (6) إنتشار لل pock lesions على الغشاء اللقانقي المشيمي بلون أحمر وبحجم كبير للعزلة رقم 3 (التمريرة3)
50	الشكل (7) ال pock lesions منتشرة على الغشاء اللقانقي المشيمي وبشكل متجانس للعزلة رقم 3 (التمريرة 16)
51	الشكل (8) الغشاء اللقانقي المشيمي لمجموعة السيطرة السالبة والذي يخلو من ال Pock Lesions المحدثة من قبل فيروس الجدري
52	الشكل (9) ظهور الخطوط الترسيبية بين العزلة الفيروسية التمريرة السادسة (الحفرة المركزية) والحفرة (2,1) الحأوية على المصل عالي التمنيع والحفرة (3) الحأوية على المصل الموجب ، عدم وجود أي خط ترسيبي مع الحفرة الطرفية (4)
52	الشكل (10) ظهور الخطوط الترسيبية بين الحفرة المركزية (العزلة الفيروسية التمريرة التاسعة) والحفر المحيطية الحاوية جميعها على المصل عالي التمنيع، (رقم 1 يمثل المصل عالي التمنيع من الحيوان رقم1 ،رقم 2 يمثل المصل عالي التمنيع من الحيوان 2)
54	الشكل (11) نتائج اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل
56	الشكل (12) افات مرض الجدري تحت الابط في حيوان السيطرة الموجبة (غير ملقح + تحدي) في اختبار التحدي
56	الشكل (13) مخطط لدرجات الحرارة للحيوانات الاربعة المستخدمة في اختبار التحدي
58	الشكل (14) ظهور ال pock lesions بلون أبيض- رمادي صغيرة الحجم ومنتشرة بصورة عشوائية على الغشاء اللقانقي المشيمي المحدثة بواسطة المستضد اللقاحي الأردني

قائمة المختصرات

الاسم الكامل	الاختصار
Hematoxylin & Eosin	H&E
Hemagglutination test	HA
Red Blood Cells	RBCs
الاسم الكامل	**الاختصار**
Complement Fixation Test	CFT
Serum Neutrilzation Test	SNT
Agar Gel Immunodiffusion Test	AGID
Polymerase Chain Reaction	PCR
Chorio-Allantoic Membrane	CAM
Real Time Polymerase Chain Reaction	RT-PCR
Open Reading Frames	ORFs
Restriction Fragment Length Polymorphism	RFLP
Immunofluorescent Antibody Test	IFA
Single Radial Hemolysis Test	SIH
Single Radial Immunodiffusion Test	SRID
Electron Microscope	EM
Enzyme linked immuo sorbent assay	ELISA
deoxyNucleotide Triphosphate	DNTPs
Hyper Immune Serum	HIS
Embryo Infective Dose	EID
Reactive Dose	RD
Sheep Pox Cells	SPCs
Inverted Terminal Repeats	ITRs
Restriction Enzymes	RE

شكر وعرفان

بفضل من الله عز وجل وأنا أختتم عملي البحثي هذا لا يسعني إلا إن أقدم شكري الجزيل إلى رئاسة جامعة الموصل وإلى عمادة كلية الطب البيطري المتمثلة بالأستاذة الكبيرة الدكتورة إنتصار رحيم الكناني وذلك لدعمها الكبير والرائع فلهم مني جزيل الشكر والإمتنان، كما أتقدم بشكري الجزيل إلى الأستاذ الدكتور مزاحم ياسين العطار لما قدمه لي من مشورة ونصائح علمية سديدة ، وأتقدم أيضا بشكري الجزيل الى رئاسة فرع الأحياء المجهرية بكلية الطب البيطري/ جامعة الموصل وجميع منتسبي الفرع لدعمهم ومساعدتهم لي ، كما وأعبر عن خالص إمتناني إلى الأستاذ الدكتور صلاح مهدي لتشجيعه المتواصل لي، وأتقدم بخالص شكري وتقديري إلى زوجتي الغالية د.هيام وأولادي (عهد و مجد) وذلك لتشجيعهم المتواصل لي طيلة مدة الدراسة وإلى والدتي العزيزة وجميع الأهل والأصدقاء الذين مدوا لي يد العون والمساعدة ، ولايسعني إلا إن أقدم خالص شكري وتقديري إلى إقليم كردستان العراق / المديرية العامة للبيطرة وأخص منهم بالذكر كل من الدكتور عباس علي عبدي/المدير العام والدكتورة إلهام بطرس شابو مديرة المختبر المركزي البيطري في الإقليم وذلك لدعمهم الرائع وإلى جميع منتسبي المختبر المركزي وأخص منهم بالذكر د. بيجان و د. فيصل و د. دلدار و د. براء و د.سامان .كما أتقدم بخالص إمتناني وشكري إلى شركة كوسار للزراعة والدواجن المتمثلة بالدكتور محسن محمد أمين/ المدير العام وإلى الأخ السيد داون محسن/مدير الإدارة وإلى اخي وزميلي الدكتور ياسر أحمد صالح /مدير المتابعة الفنية وإلى السيد رهاد والسيد بلند وجميع منتسبي الشركة والذين أبدوا دعمهم ومساعدتهم الرائعة لي طيلة مدة الدراسة . وأتقدم بشكري الجزيل إلى جميع الإخوة والزملاء الذين مدوا يد العون والمساعدة وأخص منهم بالذكر د.عمار غإنم و د.محمد غسان و د.هيثم البكري و د.يونس أنور والدكتورة رفل (بغداد) و د.أنوار زكي و د.ريم سالم و د.إيمان غانم والدكتور أياد والدكتورة بلقيس والدكتور العزيز والقدير عبد الواحد أحمد حسن والدكتور نشأت غالب والدكتورة هناء خليل ، كما لايسعني إلا أن أشكر السيد علي وذلك لمساعدته لي بتوفير بعض حيوانات الدراسة. وأخيرا خالص تقديري وشكري إلى جميع الأساتذة والإخوة والأخوات والزملاء والأطباء الذين مدوا لي يد العون وساعدوني وسهوت عن ذكر اسمائهم ولم اذكرهم ......

الباحث / فنار

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية إلى عزل وتشخيص العزلة الفيروسية المسببة لمرض جدري الأغنام باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل مع تحضير لقاح حي مضعف من هذه العزلة المحلية. تم جمع 26 عينة (بثور جلدية) من حيوانات مصابة سريريا بالمرض وتم تمرير 9 عينات منتخبة منها بطريقة الحقن على الغشاء اللقانقي المشيمي (CAM) لأجنة بيض الدواجن بهدف تنمية الفيروس ولمشاهدة الآفات الناتجة عنه ، وبعد حقنها لثلاث تمريرات متتالية في أجنة بيض الدواجن تم إنتخاب إحدى هذه العينات والتي أعطت نتيجة موجبة وواضحة للحقن ومن ثم الاستمرار في عملية التمرير التسلسلي لحين الوصول إلى العزلة المضعفة ، وتم أيضا معايرة العزلة الفيروسية (التمريرة السادسة) في أجنة البيض المخصب لحساب الجرعة الخمجية لها ، وأجري عليها اختبار التلازن الدموي للتأكد من قابليتها على تلزين كريات الدم الحمر للأغنام ، بعدها تم إستخدام إختبار الترسيب المناعي للكشف عن تفاعل هذه العزلة مع المصل عالي التمنيع المضاد لها والمحضر في الاغنام (عدد2) من مستضد لقاح جدري الاغنام الاردني. كما تم تحضير شرائح نسجية من الغشاء اللقانقي المشيمي المصاب بالفيروس لأغراض الفحص النسجي . بينما استخدم اختبار التعادل المصلي للكشف عن الأضداد المعادلة للفيروس في المصل. وتم أيضا فحص 7 عينات مختارة باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل بعد أضافة المواد الخاصة بالتفاعل والمرفقة مع العدة التشخيصية (الكت) وذلك بعد تضخيمها باستخدام جهاز ال Thermocycler ومن ثم ترحيل نواتج التفاعل لتلك العينات كهربائيا على هلام الاكاروز للكشف عن تواجد الحامض النووي الفيروسي المستخلص في هذه العينات ، وضمن اختبارات تقييم اللقاح المضعف والمحضر من هذه العزلة فقد تم معايرتها (التمريرة 16) في كل من أجنة البيض وفي أدمة الجلد للأغنام في منطقة الخاصرة ، ومن ثم تم إستخدام حيوانين في اختبار التحدي بهدف التأكد من قدرة هذه العزلة (التمريرة 16) على حماية الحيوانات ضد جرعة التحدي وذلك بعد تلقيحهما بالعزلة الفيروسية المضعفة (التمريرة السادسة عشرة) بالحقن تحت الجلد بكمية 0.1 مل وبجرعة ($10^{4.49}EID_{50}/0.1$ ml) ومن ثم تعريضهم لجرعة التحدي بالفيروس الضاري بكمية 1.5 مل وبمعيار ($10^{3.5}$ $EID_{50}/0.1$ ml) بطريقة الحقن بالادمة ، كما تم إخضاع العزلة الفيروسية (التمريرة16) لاختبارات النقاوة والأمان . وأظهرت عملية التمرير التسلسلي للعينات التسعة في أجنة البيض المخصب نموا للعينة 3 و5و6 من خلال بتكوين

مايسمى ب Pock Lesions حمراء اللون ومميزة على الغشاء اللقانقي المشيمي وكانت هذه الأفات متفاوتة في شدتها وتجانسها ، حيث أعطت العينة رقم 3 والمأخوذة من منطقة أبو جربوعة نمواً جيدا وكثيفا مع إستمرار عمليات التمرير التسلسلي لها وأدت الى قتل الأجنة المقونة خلال 48 ساعة بعد الحقن عند التمريرة السادسة لها ، في حين حدث موت للأجنة المحقونة بعد 72–96 ساعة من الحقن وذلك مع التمريرة التاسعة لهذه العزلة ، بينما لم يحدث أي موت للاجنة المحقونة عند التمريرة السادسة عشرة والتي عدت حينها عزلة مضعفة ، وكان معيار الجرعة الخمجية لهذه العزلة عند التمريرة السادسة عند معايرتها على أجنة بيض الدواجن بعد تخفيفها عشارياً بمحلول الملح الفسيولوجي المعقم هو ($10^{3.5}$ EID_{50}/0.1 ml) وهو يمثل المعيار الحجمي للفيروس والمعبر عنه بحجم 0.1 مل والذي يحدث تأثيرا مرضيا في 50% من الاجنة المحقونة ، بينما كانت نتيجة أختبار التلازن الدموي باستخدام كريات الدم الحمراء للأغنام سلبية مع هذه العزلة (التمريرة السادسة) ، في حين أظهرت نتائج إختبار الترسيب المناعي في هلامة الأكار تكوين خطوط ترسيبية واضحة بين العزلة الفيروسية (التمريرة السادسة) والمصل العالي التمنيع ، بينما لم يظهر أي خط ترسيبي بين هذه العزلة والمصل السالب ، وبينت أيضا المقاطع النسجية للغشاء اللقانقي المشيمي لأجنة البيض المحقونة والذي ظهرت عليه ال pock lesion بعد تحضيرها وصبغها بصبغة الهيماتوكسلين والأيوسين وجود أجسام إشتمالية واضحة داخل سايتوبلازم الخلايا المصابة بالفيروس . وفي اختبار التعادل المصلي والذي أجري باستخدام المصل عالي التمنيع بعد تخفيفه ثنائيا مع محلول الملح الفسيولوجي المعقم إبتداءا من التخفيف 1:2 وحتى التخفيف 1:256 فقد لوحظ وجود للأجسام المناعية المضادة والمعادلة لفيروس جدري الأغنام في أمصال الحيوانات المستخدمة لانتاج هذا المصل وبلغ هذا المعيار 64:1 والذي يمثل مقلوب أعلى تخفيف من المصل عالي التمنيع والذي يحمي 50% من الأجنة المحقونة من ظهور التأثيرات المرضية للفيروس . أما في تفاعل البلمرة المتسلسل والذي تضمن أجراء عملية التضخيم للحامض النووي المستخلص من العينات 1–7 فبينت نتائجه ظهور حزم ترسيبية واضحة مع العينات المفحوصة 5،6،7 في حين لم تظهر أية حزم ترسيبية مع العينات 1،2،3،4، بالمقارنة مع السيطرة الموجبة والسالبة ، وحدث التضعيف للعزلة الحالية وذلك بعدم احداثها للاصابة المرضية في الحيوان المستخدم في المعايرة عند التمريرة 16 والتي كان معيارها ($10^{4.49}$$EID_{50}$/0.1 ml) وذلك بعد ان تم تخفيفها عشاريا مع محلول الملح

الفسيولوجي المعقم وبالتخافيف ($10^{-1}-10^{-6}$) وكان هذا المعيار في متطابقا كل من أدمة الجلد في الأغنام وفي أجنة البيض ، وفي نتائج أختبار التحدي فقد أعطت هذه العزلة حماية بلغت 100% في هذا الأختبار ، كما إن العزلة أعطت نتائج إيجابية وأمينة لإختبارات الأمان في الإناث والحوامل وعدم إحداثها للأجهاض في هذه الحيوانات بعد التلقيح بها وكذلك توفر خاصية الأمان فيها عند استخدامها بجرع عالية وأخيرا نقاوتها من الملوثات الجرثومية والفطرية ، ونستنتج من ذلك إمكانية عزل فيروس جدري الأغنام وتنميته على أجنة البيض وتشخيصه بإستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل وإمكانية إستخدام هذه العزلة كلقاح حي في تلقيح الاغنام ضد هذا المرض.

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

يعد مرض جدري الأغنام من الأمراض الحادة والمعدية التي تصيب الأغنام ويمتاز هذا المرض بظهور آفات واضحة ومميزة له في مناطق متعددة من الجلد فضلا عن آفات حشوية (Bhanuprakash *et al*, 2005) ، إذ تشير بعض الدراسات إلى أن الإصابة الحشوية لاسيما في الحيوانات الفتية تودي إلى حدوث مايسمى بذات الرئة الفيروسي (Viral pneumonia) (Davies , 1976).

ينتمي الفيروس المسبب للمرض إلى عائلة ال *Poxviridae* وهو فيروس مغلف يحتوي على حامض نووي من نوع DNA ثنائي الخيط ويتراوح حجمه من 300-450 نانوميتر (Mathews , 1982) ويعد هذا الفيروس من أهم فيروسات ال Pox التي تصيب الحيوانات (Carn , 1993) ، وللفيروس نمط مصلي (Serotype) واحد لكن يتضمن عدة عتر (Strains) تتسبب بحدوث المرض في الأغنام (Kitching and Taylor , 1985).

يتوطن المرض في عدة بلدان من الشرق الأوسط ومن ضمنها العراق (Hussein *et al* 1989 ; Zewdie , 2009) ، وتختلف نسبة الإصابة والهلاكات بالمرض بإختلاف العترة الفيروسية المرضية والحالة المناعية للحيوان.

تودي الإصابة بالمرض إلى خسائر إقتصادية في قطعان الأغنام ومنها هلاكات عالية في الحملان حديثة الولادة فضلا عن الإجهاض في الإناث الحوامل مع تقييد في حركة التجارة داخليا وخارجيا وتصل نسبة الهلاكات إلى 50% في القطعان الحساسة للمرض بينما قد تصل إلى 100% في الحيوانات الفتية (Bhanuprakash *et al* , 2005 ; Oguzoglu *et al* , 2006).

وتعد تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) (Polymerase Chain Reaction) إحدى أكثر وأهم الطرق حساسية في الكشف عن الفيروسات وذلك بسبب دقتها العالية وخصوصيتها وحساسيتها وأهميتها في تشخيص الفيروسات ، إذ يتم خلالها تشخيص الجين P32 الذي يشفر لإنتاج المحددات المستضدية الخاصة بفيروس جدري الأغنام والمهمة في أمراضيته (Mangana *et al* ,1999 ; Hosamani *et al* , 2004).

وعلى الرغم من إستخدام اللقاحات الأجنبية واللقاح العراقي المحضر من عترة تركية في تلقيح الأغنام وعمليات التلقيح المتكررة إلا أن مرض جدري الأغنام لازال منتشرا في العراق ولاسيما في محافظة نينوى ويسبب خسائر إقتصادية كبيرة ، فضلا عن وجود تقارير تشير إلى إمكانية فشل في عملية التحصين وذلك بسبب تحطم المستضد اللقاحي وإنخفاض معياره ، قصر مدة المناعة الناتجة من التلقيح ، عدم مطابقة المستضد اللقاحي للقاحات المستخدمة مع الفيروس الحقلي الضاري فضلا عن المعيار المنخفض للأضداد المعادلة المتكونة بعد التلقيح ولأسباب عدة ، لذلك كان لابد من عزل فايروس جدري الأغنام وتشخيصه محلياً وتحضير لقاح من تلك العزلة لإستخدامه في السيطرة على هذا المرض، ولأجل ذلك صممت هذه الدراسة لتحقيق الأهداف الآتية :-

1- عزل فيروس جدري الأغنام من الحيوانات المصابة طبيعيا بالمرض.

2- تشخيص الفيروس المعزول بالطرق المصلية والجزيئية .

3- تحضير لقاح حي مضعف من الفيروس المعزول.

4- تقييم تجريبي للقاح المحضر.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures review

2-1- تعريف المرض definition:- يسمى مرض جدري الأغنام كذلك ب (Variola Ovina) ، وهو مرض فيروسي معدٍ يصيب الأغنام بأعمار مختلفة ويمتاز بارتفاع درجة حرارة الحيوان المصاب مع تكون عقيدات في مناطق مختلفة من الجلد ويصاحبه آفات متعددة في الجهاز الهظمي والتنفسي ولاسيما في الرئتين مع تضخم في العقد اللمفية ومن ثم الموت في حالات الإصابة الشديدة (Kitching , 2004).

يتوطن هذا المرض في عدة بلدان من إفريقيا والشرق الأوسط وآسيا حيث يوجد شكلان من المرض هما: الشكل العقدي الذي نادرا ما يتحول إلى الشكل الحويصلي ، ويتراوح حجم العقيدات المصاحبة للمرض من 5-30 ملم ويدعى هذا النوع أحيانا بالجدري الصلب أو الحجري كما يمتاز هذا الشكل بإنتشاره السريع في حيوانات الحقل وبنسبة قليلة من الوفيات بين الحيوانات المصابة بالمقارنة مع الشكل الحويصلي من المرض والذي يتسبب بخسائر اقتصادية كبيرةٍ في البلدان التي يتوطن بها (Kitching and Carn , 2004).

2-2- تاريخ المرض History of Disease :- تشير بعض المصادر إلى أن تاريخ المرض يعود إلى القرن الثاني قبل الميلاد ، إذ نشأ في أواسط آسيا وإنتشر فيما بعد إلى بلاد الغرب ، وفي أواسط القرن العشرين تم تسجيل المرض في قارات إفريقيا وأسيا وأوربا ، وقد حدثت عدة ثورات مرضية له في الفترة الممتدة بين 1866- 1872 في بريطانيا العظمى ومنها إنتقل المرض إلى البلدان الأوربية الأخرى بسبب حركة التجارة الكثيفة بين تلك البلدان ، وبالرغم من المحاولات العديدة للقضاء على المرض في عدة بلدان بإستخدام لقاحات مقتولة او مضعفة لكنه يظهر بين الحين والآخر في بلدان عديدة من إفريقيا وآسيا والهند (Kitching , 2003) ، بينما تشير مصادر أخرى بأن أول تسجيل للمرض كان عام 1763 م وأن دراسة المسبب

المرضي وأمراضيته لأول مرة كأنت عام 1868 (Abdul sajid , 2010) ، وفي تقرير لمنظمة (OIE , 2008) فأن هذا المرض يتوطن عدة بلدان من الشرق الأوسط منها العراق ومصر وايران وتركيا وافغانستان (Bhanuprakash *et al* ,2012) ، أما في العراق فقد كان أول عزل وتسجيل للفيروس المسبب لهذا المرض من قبل (العبيدي،1978) في منطقة سرسنك في شمال العراق وسميت العترة إنذاك بعترة سرسنك.

2-3- التوزيع الجغرافي للمرض Geographical Distribution of Disease:- تم تسجيل حالات عديدة من الإصابة بهذا المرض في مناطق مختلفة من العالم (Sapre and Kalia , 1980) ، وقد لوحظ ظهور المرض بشكل إندلاعات مرضية منفردة في البلدان الأوربية وذلك عندما حدث المرض في إيطاليا عام 1983 وفي اليونان عام 1990 -1989 (Carn , 1993) ، كما تم تسجيل حدوث 91 إندلاع مرضي في اليونان و 4 إندلاعات مرضية في بلغاريا للمدة من أيلول 2013 إلى نيسان 2014 (Scientific opinion on sheep and goat pox , EFSA , 2014) . إن التوزيع الجغرافي لمرض جدري الأغنام كان محصورا في الخمسين سنة الماضية في كل من آسيا وأفريقيا على وجه الخصوص (Kitching *et al* , 1989 ; Mariner *et al* , 1991 ; Achour and Bouguedour , 1999) وفي الشرق الأوسط (Daoud , 1997) وفي تركيا (Oguzoglu *etal* , 2006) وفي بلدان أخرى عديدة من آسيا ، وتم حديثا تسجيل المرض في فيتنام سنة 2005-2008 وفي منغوليا -2007 2006 وفي جنوب أوروبا واليونان 2007 (OIE , 2010)، واخيرا هولندا في شهر آذار 2015 (Contingency plan for dealing with outbreaks of Sheep and goat pox in the Netherland . 2015) ، في حين تم تسجيل الشكل العقدي من هذا المرض في المغرب وموريتانيا في عام 2010 (Zro *et al* , 2014).

2-4- تصنيف الفيروس Classification of virus :- ينتمي فيروس مرض جدري الأغنام إلى عائلة *Poxviridae* وتحت عائلة *Chordopoxvirinae* ومن جنس *Capripox viruses* (Carn , 1993 ; Buller *et al* , 2005 ; Bhanuprakash *et al*

, 2006 ; International Commettee for Taxonomy of Viruses (ICTV) , .(2006 ; Diallo Viljeon , 2007; Chu *et al* 2011 ; King *et al* , 2012 ;

2-5- صفات الفيروس Character of Virus :- يتراوح حجم العتر الضارية لهذا الفيروس من 170 nm – 260 أما حجم العتر غير الضارية فيكون حجمها أكبر مقارنة بالعتر الضارية ويبلغ حوالي 230-380 nm ، يتكاثر فيروس مرض جدري الأغنام في سايتوبلازم الخلية المصابة مكوناً أجساماً إشتمالية حامضية أو قاعدية (Mathews , 1982) وله شكل يشبه الطابوقة (ICTV , 2006) وهو مشابه نوعا ما لفيروسات الحيوانات الأخرى لكنه أكثر استطالة ، ويمتاز الفيروس الخمجي (virion) بشكله البيضوي وإمتلاكه حزمة وسطية كثيفة وتكون هذه الحزمة محدبة الوجهين مع إحتوائه على أجسام طرفية على جانبي هذه الحزمة وهو ذو تركيب معقد ، وينضج الفيروس طبيعيا من خلال التبرعم من غلاف الخلية المصابة ، (Nagalakshmi , 2008) ، ومن خلال دورة حياة الفيروس يلاحظ وجود جزيئات الفيروس داخل الخلية وأخرى خارج الخلية لكن الإصابة تحدث بواسطة الفيروس الكامل (Virions) خارج الخلية (ICTV , 2002).

2-6- صفات جينوم فيروس الجدري Character of Viral Genome:- جينوم الفيروس منفرد ، ثنائي الخيط من نوع DNA ويبلغ حجمه حوالي 130-300 kbp ويحتوي على الكوانين- سايتوسين (G-C) بنسبة 36% والتي تتوزع بصورة متجانسة على طول الجينوم الفيروسي، ويشفر هذا الجينوم لمجموعة من البروتينات التركيبية وغير التركيبية والتي يلعب البعض منها دورا مهما في إمراضية الفيروس وهناك ما لايقل عن 10 انزيمات مع جزيئة الفيروس والتي تساهم في عمليات أيض الحامض النووي وتضاعف الجينوم الفيروسي ، وتحتوي نهاية الجينوم terminal hairpin loop (بدون نهاية حرة) على عدة حزم من التسلسلات المتكررة لتكون ما يدعى inverted terminal repeats (ITRs) ، وعند دراسة التسلسل الجيني للحامض النووي لهذا الفيروس وجد بان معظم الجينات المهمة تقع في منتصف الجينوم والتي تتضمن جينات تناسخ الحامض النووي وجينات تصنيع البروتين الفيروسي وجينات التشفير للحامض النووي RNA ، بينما يكون موقع الجينات غير الضرورية في نهاية الجينوم والتي

تتضمن جينات التحوير الفيروسي والجينات المسوؤلة عن غزو الخلايا وتحطيمها والجينات المحفزة للمناعة (Tulman *et al* , 2002).

2-7- طريقة دخول فيروس الجدري الى الخلية الهدف: بعد دخول الفيروس المرضي عن طريق الجهاز التنفسي إلى الجسم ، ينتقل عبر الدم ، والجلد ، والأعضاء الداخلية ، حيث يتواجد الفيروس في الأعضاء (الرئة، الطحال، الكلية، المرئ، المعدة، الامعاء) حتى قبل ظهور الطفح الجلدي ويتركز بكميات عالية في اللمف وخلايا الطفح الجلدي الظهارية. تبدأ عملية الإصابة في خطوتها الأولى من خلال وصول الجزيئة الفيروسية الكاملة الحية المعدية إلى الخلية الهدف للمضيف والتي تكون حساسة وذات إستعدادية للإصابة بهذا الفيروس ، حيث يمتلك الفيروس الوسيلة للوصول من الحيوان المصاب الى الحيوان السليم ، وتحدث هذه العملية عن طريق الاتصال المباشر بين الفيروس والسطح الخارجي للخلية وعادة ماينجح هذا الاتصال نظرا لوجود تراكيب شكلية وكيميائية على السطح الخارجي للفريون والتي ترتبط مع مواقع خاصة (عبارة عن مواضع استقبال خاصة ونوعية لهذا الفيروس بشكل خاص) متواجدة على السطح الخارجي للخلية ، فضلا عن تواجد بعض التراكيب السطحية التي تسهل هذا الاتصال ، تليها المرحلة الثانية وهي ادمصاص (adsorption) الفيرون في موضع الاستقبال وتتضمن هذه العملية تكوين روابط كهروستاتكية بين مكونات الفيروس السطحية وبين المكونات الكيميائية لمواضع الاستقبال ، ثم تحدث عملية الاختراق بدخول الفيروس المرضي كاملا عن طريق عملية ال Endocytosois ، بعدها يتحرر الحامض النووي الفيروسي من الجزيئة الفيروسية بوساطة الانزيمات الخلوية الحالة وتبدا حينها عملية تناسخ الحامض النووي الفيروسي في سايتوبلازم الخلايا المصابة مع تصنيع البروتينات التركيبية الخاصة به ، ومن ثم يتم تجميع مكونات (assembling) الجزيئة الفيروسية الكاملة داخل السايتوبلازم والتي تنتهي بتحرر الفريونات الكاملة من الخلية المصابة بعملية التبرعم (budding) لتصيب الخلايا المجاورة والسليمة (OIE, 2010).

2-8- عزلات الفيروس وعتره Isolates and Strains of virus :- يوجد العديد من عتر وعزلات هذا الفيروس مذكورة في المراجع وتكون تسميتها معتمدة بصورة رئيسية على مكان

العزل وقد أستعمل قسم منها في عمليات التلقيح بعد أن تم تضعيفها خلال سلسلة من التمريرات ومن الأمثلة على هذه العتر : العترة الرومانية – فنار ، Cairo،K-strain ، Chinese، RM/65 ، SP8 ، Algerian وغيرها من العتر (Bhanuprakash *et al* , 2006) ، وبالرغم من تعدد عتر هذا الفيروس لكن لهذه العتر فوعات مختلفة ومتباينة ، وإن معرفة الخرائط الجينية لهذه العتر بإستخدام الإنزيمات القاطعة (RE) Restriction Enzymes وتقنية التعرف على التسلسل الجيني (DNA sequencing) والتي بواسطتها يتم التعرف على النمط المصلي للفيروس (Genotyping) توفر جميعها الدلائل والبراهين الواضحة للتفريق بينها (Carn , 1993).

2-9- الأشكال المستضدية للفيروس Antigenic shapes of capripox:- للفيروس شكلان مستضديان ، الأول هو الفريون المغلف الكامل الذي يحتوي على عناصر انبوبية قصيرة وينتج من خلايا الحيوان المصاب بهذا المرض حيث يكتسب غلافه من هذه الخلايا ، أما الشكل الثاني فيمكن مشاهدته عندما يتم تمرير الفيروس بعمليات التجميد والتذويب المتكرر لخلايا الزرع النسيجي ، (OIE , 2010).

إن المستضد السطحي لفيروس جدري الأغنام والذي يتم تشفيره بواسطة الجين P32 له دور كبير في إمراضية الفيروس ، حيث أجريت عملية العزل لهذا المستضد الذوؤب من افات مرض جدري الأغنام باستخدام جهاز الطرد المركزي الفوقي بعدها تم تنقية المستضد بطريقة الكروماتوكرفي لازالة البروتين الجلدي من العينة ثم تم الكشف عن هذا المستضد باستخدام اختبار التلازن الدموي والترسيب المناعي في هلامة الاكار والترحيل الكهربائي وتقنية الاليزا ، ومن هنا تم الاستنتاج بامكانية استخدام المستضد الذوؤب والمحضر في اعلاه في الاختبارات المصلية المتنوعة والمستخدمة في تشخيص الاصابة بهذا الفيروس (Subba Rao *et al* , 1984)

2-10- العلاقة بين أجناس Relationship between Capripox viruses :- لقد ذكر الباحث (Heine *et al* ,1999) بأن عتر الفيروس لكلا المرضين لا تعد متخصصة للمضيف بالرغم من كون معظم العتر تظهر أفضلية للمضيف Host Preference وأن العترة

الواحدة تسبب المرض في كل من الماعز والأغنام إذ أن الماعز يصاب بشكل خفيف بالعتر الممرضة للأغنام وكذلك من الممكن أن تصاب الأغنام بالعتر الضارية التي تصيب الماعز ولأجل ذلك يمكن وصف جدري الأغنام والماعز ب Capripox viral disease.

إن معظم عتر Capripox virus تعطي حماية مناعية ضد العترات الأخرى بسبب التشابه المستضدي الكبير بين هذه العتر وهذه الخاصية يتم الاستفادة منها في تلقيح الأغنام والماعز بعترة واحدة لتعطي حماية ضد كل من جدري الأغنام والماعز (Kitching , 2003) ، إذ أن العلاقة المستضدية بين العتر الفيروسية لكلا المرضين متقاربة جداً (Subba Rao *et al*, 1984).

لقد وجد الباحثون (Sharma and Dhanda , 1972 ; Kitching and Taylor , 1985 ; Kitching *et al* ,1986 ; OIE , 2010) بأنه من الممكن استخدام عترة واحدة من ال Capripox virus لأعطاء حماية ضد جميع العتر الحقلية الضارية من مرضي جدري الأغنام وجدري الماعز بغض النظر عن المنشأ الجغرافي لهذه العتر الممرضة ، بينما تذكر بعض المصادر بأن بعض عتر Capripox virus تسبب مرض الجدري في الأغنام فقط والبعض الآخر في الماعز فقط وبعضها تصيب الإثنين معاً (Davies 1976 ; Davies 1981 ; Kitching and Taylor ,1985 ; Bhanuprakash *et al* ,2006) . أما بخصوص الحماية المتصالبة بين عتر فيروس جدري الأغنام وجدري الماعز فهناك تقارير متضاربة في تكوين مثل هذه الحماية بهدف الوقاية بعضهما من بعض. وفي دراسة أولية للباحثين (Rafyi and Ramyar , 1959) فقد وجد بأن تلقيح الماعز بلقاح جدري الأغنام لم يتمكن من حمايتها من الإصابة بفيروس جدري الماعز ، بينما أعطى لقاح جدري الماعز حماية قوية للأغنام ضد كل من فيروس جدري الأغنام والماعز ، كما لوحظ في دراسة أخرى بأن حقن الماعز بفيروس جدري الأغنام لا يودي إلى حدوث المرض (Sheikh-Ali *et al* ,2004) .

إن عتر ال Capripox viruses المسببة لمرض تكتل الجلد في الأبقار مرتبطة مستضديا بفيروس جدري الأغنام وبذلك يمكن إستخدام لقاح جدري الأغنام في تحصين الأبقار ضد مرض الجلد المتكتل. وذكر الباحث (Tulman *et al* , 2002) إنه بالرغم من العلاقة الوراثية القوية والمتقاربة بين عزلات ال Capripox virus والتي لا يقل معدلها عن 96% والمتمثلة بنسبة تشابه النيوكليوتيدات بين عتر مرض جدري الأغنام وجدري الماعز ومرض

الجلد المتكتل لكن معظم الإختلافات تظهر في الجينات التي تحدد فوعة العترة ونوع المضيف ، كما تم تسجيل إختلافات في حساسية المضائف للفيروس وكذلك تباين في ضراوة العتر في إحداث المرض (Davies , 1976).

2-11- الأهمية الاقتصادية للمرض Economic importance :- إن وجود هذا المرض في بلد معين يؤدي إلى كبح الإنشطة التجارية وشلل في الحركة الإقتصادية من وإلى ذلك البلد فضلا عن زيادة كبيرة وفائض في الإنتاج المحلي من الأغنام وتوقف في عملية تصديرها . وفي دراسة أجريت في الهند لوحظ بأن تكرار الإصابة بهذا المرض تودي إلى تقييد كبير في تجارة المواشي ولاسيما الأغنام ومنتجاتها ، كما وتصل نسبة الإصابة والهلاكات إلى ما يقارب 64%, 50% على التوالي (Garner *et al* , 2000 ; Senthilkumar *et al* , 2006 ; Bowden *et al* 2007) ، كما إن أعلى نسبة إصابة بالحملان تحدث بعمر 1-12 شهراً (Elshafie and Ali , 2008).

يُعد مرض جدري الأغنام من الأمراض الخطرة بايولوجياً ، ويمتاز المرض بسرعة إنتشاره العالية بين الأغنام الحساسة للمرض (Zhou *et al* , 2012) ، وهذا المرض هو من الأمراض العابرة للحدود Transboundary diseases ويوثر بصورة سلبية وكبيرة على اقتصاد البلدان النامية والمتقدمة على حد سواء ، ولأجل ذلك فإن اجراءات الأمن الحيوي الواجب اتباعها مهمة جدا في حال ظهور أو إنتشار الإصابة بهذا الفيروس (USDA , 2002) ، أما من ناحية تأثير الفيروس على الأداء الإنتاجي فقد وجد بأنه يقلل من إنتاج الحليب وتراجع في وزن الحيوان مع تلف الصوف وزيادة في معدلات الإجهاض وارتفاع إحتمالية الإصابة بذات الرئة الفيروسي (Yeruham *et al* , 2007). وتأتي الجدوى والاهمية الاقتصادية للمرض في العراق كونه يصيب الاغنام بختلف الاعمار ويتسبب بهلاكات قد تكون عالية نسبيا في الحيوانات الفتية فضلا عن الخسائر الناجمة من كلفة العلاج وكذلك الجهود المبذولة في العلاج والسيطرة على المرض من خلال عمليات التلقيح الموسمية والتي يتم تكرارها بين الحين والاخر دون وجود برنامج لقاحي ثابت زمنيا وعدم امكانية السيطرة على الاندلاعات مرضية التي تظهر بين الحين والاخر (البارودي 2009).

2-12- طرق إنتقال المرض Transmission:- جدري الأغنام مرض معدٍ جداً وينتقل بشكل رئيسي عن طريق الإحتكاك المباشر أو عن طريق المعدات الملوثة أو عن طريق الأكل أو الصوف الملوث بالفيروس ، ويطرح الفيروس عادة عن طريق الإفرازات الأنفية والفموية وملتحمة العين والحليب والبول . إن كمية الفيروس المطروح تعتمد على عزلة الفيروس ونوع المضيف ويمكن أن يبقى الفيروس بصورة حية في القشور لعدة أشهر وتتناسب كمية الفيروس المطروح طردياً مع شدة الإصابة وكلما زادت شدة المرض كلما زادت كمية الفيروس المطروحة وبالتالي زيادة إنتشار المرض (Bowden *et al* ,2008) ، أما في البلدان التي تحدث فيها إندلاعات مرضية متكررة عادة ما ينتقل الفيروس عن طريق التنفس بواسطة قطيرات الرذاذ الملوثة بالفيروس (Webster, 1981 ; Kitching and Taylor , 1985) ، كما قد يحدث المرض نتيجة الخدوش والإنسلاخات التي يتعرض لها جلد الأغنام عندما ترعى في مناطق ذات حشائش مشوكة إذ تودي هذه الخدوش والإنسلاخات إلى إنتقال المرض من الحيوانات المصابة إلى الحيوانات الحساسة للمرض (Bhanuprakash , 2001) ، كما يمكن أن ينتقل المرض ميكانيكيا عن طريق عضات الحشرات الماصة للدم (Mellor *et al* ,1987 ; Carn ,1993; OIE , 2009).

إن أحد الأسباب المهمة لإنتقال مرض جدري الأغنام بين البلدان أو ضمن البلد الواحد هو ضعف الأداء البيطري في متابعة الاندلاعات المرضية ووضع البرامج التلقيحية الصحيحة والمناسبة للحد من انتشار المرض والقضاء عليه (Rweyemamu *et al* , 2000) ، فضلا عن زيادة حركة الحيوانات خلال التجارة بين البلدان (Domenech *et al* , 2006) ، كما إن ضعف إجراءات الحجر الصحي في المعابر الحدودية والإدارة السيئة في مزارع الأغنام تودي إلى إنتشار المرض (Babiuk *et al* , 2008) . وفي شمال العراق ذكر الباحثون (Zankana and Abdullah , 2013) من خلال دراسة وبائية وسريرية ونسجية للمرض بأن نسبة الإصابة بالمرض في الحملان كانت 30% ونسبة الهلاكات 6.7% وإن أعلى نسبة لظهور المرض كانت في شهر كانون الثاني.

2-13- الأمراضية والعلامات السريرية Pathogenesis and clinical signs :- تتراوح مدة حضانة المرض (هي تمثل المدة الممتدة من دخول الفيروس الخمجي virion للجسم

إلى حين ظهور العلامات المرضية (OIE , 2010) بحسب بعض المصادر من 8-13 يوم وربما 4 أيام فقط في حالة الإصابة التجريبية (Chanie , 2011) .

وتبدأ أعراض المرض بارتفاع حرارة الحيوان والنبض والتنفس وتصل حرارة الجسم إلى 40°م بعد مرور 2-5 أيام من دخول الفيروس للجسم حيث إن المستقبلات الموجودة على سطح الخلية الهدف للفيروس والتي من خلالها يخترق الفيروس تلك الخلايا غير معروفة (Moss , 2006) ، ويلاحظ على الحيوان المصاب رشح من الأنف وفقدان الشهية وتقوس الظهر وسعال وتدمع العينين وافرازات لعابية من الفم وذات رئة وإمساك (Singari *et al* , 1990 ; Babiuk *et al* ,2008) ، ومن بعدها تظهر الآفات الجلدية في المناطق الخالية من الصوف حيث تصيب مايقارب 50% من الجلد (Pawaiya *et al* , 2008) ، وتمثل ال pastules الآفة الواصمة والمميزة لهذا المرض وتتحول فيما بعد إلى قشور والتي تستمر من 3-4 أسابيع ، وقد يصاحب المرض قيحمية الدم بسبب الاصابات البكتيرية الثانوية والتي تودي إلى موت الحيوان، كما يمكن ان يصاب الحيوان بعلامات العرج (Aruni *et al* , 2001) ، وتعتمد شدة المرض على عدة عوامل منها سلالة الحيوان وعمره والحالة الغذائية والمناعية وعترة الفيروس ونوع العترة وقد يودي المرض أحيانا إلى حالات إجهاض في الإناث الحوامل (Singh *et al* , 1979).

إن الآفات الواصمة للمرض لايمكن رؤيتها في الحملان احيانا ، وتكون مناطق الجلد المصابة متوذمة بشدة وتصاحب حالات الإصابة التهاب الأنف وملتحمة العين مع تظخم العقد اللمفية السطحية وصعوبة التنفس نتيجة ضغط العقد اللمفية المتضخمة على الجزء العلوي من الجهاز التنفسي مع آفات رئوية واضحة ومميزة تسمى ب pox like lesion (Bowden *et al* ,2008) ، وتمتد فترة المرض من 4-6 أسابيع (OIE , 2010) وعادة ما يحدث الشفاء التام بعد 3 أشهر (Gulbahar *et al* , 2006) وتعتمد الأمراضية على عاملين مهمين هما المسبب المرضي والمضيف نفسه (Stanford *et al* ,2007).

2-14- الآفات العيانية والمجهرية Gross and microscopic lesions :- يلاحظ وجود مناطق متصلدة ذات لون بني وغير منتظمة الشكل في رئة الحيوانات المصابة سواء طبيعيا أو تجريبيا (Dar *et al* , 2012) مع وجود آفات عقدية في الحنجرة والمنفحة واللسان

والمرئ والفم والأمعاء وتضخم في العقد اللمفية بصورة عامة (Yashpal and Malik , 1998 ; OIE, 2000 ; Parimal *et al* , 2008) ، بينما لم يلاحظ الباحث (Al-Shabebi *et al* , 2014) أية عقيدات في رئة الحيوانات النافقة عند إجرائه للصفة التشريحية لهذه الحيوانات.

يصاب الجلد بمختلف أجزائه منها الأدمة وتحت الأدمة والكولاجين والإيلاستين والرتيكيولين ، وتشمل التغيرات الجلدية فرط التقرن مع تضخم وتتكس الخلايا الظهارية للجلد (Asagba and Nawthe , 1981; Rao *et al* , 1994) ، أما في طبقة الأدمة فيلاحظ إرتشاح للبلعميات والعدلات والخلايا اللمفية وخلايا البلازما وظهور مايسمى بخلايا مرض الجدري sheep pox cells(SPCs) (Macrophages , Monocytes , Fibrocytes) وهي مواقع لتكاثر الفيروس مع وجود أجسام إشتمالية حامضية باشكال وأحجام متعددة ومميزة داخل هذه الخلايا والتي تمثل مواضع لتضاعف الفيروس فضلا عن وجود فرط تنسج في العقد اللمفية ، وتصاب الخلايا الظهارية حول بصيلات الشعر بآفات تنكسية ، فرط تنسج وتنخر للخلايا الظهارية والغشاء المخاطي مع ارتشاح للخلايا الالتهابية متعددة الانوية في القصبة الهوائية والقصيبات ، وذمة في الغدد المخاطية وكذلك في الحويصلات الرئوية مع وجود افات تنخرية متعددة في نسيج الكلية ، كما يلاحظ تجمع للخلايا احادية النواة والعدلات مع التهاب وتنخر لجدران الاوعية الدموية في المنطقة تحت الجلدية (Moss , 1996 ; Gulbahar *et al* , 2006 ; Chanie , 2011) .

2-15- تسلسل الحامض النووي DNA Sequencing and phylogenetic tree :-

عادة ماتستخدم جينات معروفة لفيروس جدري الاغنام في عمليات دراسة التسلسل الجيني DNA Sequencing ومن هذه الجينات P32,PRO30,GPCR ومن ثم تستخدم نتائج هذا التسلسل في تحديد ال Phylogenetic tree وذلك بمقارنتها مع GenBank database على موقع ال NCBI، ومن خلال دراسة اجريت على هذه الجينات وذلك بتحديد (Open Reading Frame) (ORFs) لها ، لوحظ بان الجين P32 لخمس عزلات من فيروس الجدري كان مقاربا جدا للعزلات التي مصدرها مناطق مختلفة من العالم منها الهند وتركيا ، وعند تحديد ال Phylogenetic tree باستخدام (MEGA 4) مع Maximum parsimony method

لوحظ بان جميع عتر فيروس جدري الاغنام تتشكل ضمن عنقود وراثي واحد (Zhou *et al* ,2012).

2-16- التشخيص Diagnosis:-

هنالك مجموعة من الإختبارات التي تستخدم في التشخيص الفيروسي ومنها :

2-16-1- العزل الفيروسي Virus isolation:- تم عزل الفيروس المرضي من البثور الجلدية أو العزل بصورة مباشرة من السائل المسحوب من العقد اللمفية السطحية للحيوانات المصابة بالمرض . حيث تنقل العينات إلى المختبر تحت ظروف مبردة (الثلج الجاف) ، ويمكن إجراء العزل الفيروسي باستخدام :

أ- الأوساط الحية :- تعد الأغنام من أفضل المضائف لتنمية مختلف عزلات الفيروس المرضية كون هذه الحيوانات حساسة جدا والمضيف الطبيعي للفيروس (Arik and Kurtul , 1973 ; Kalpana , 1993 ; Bhanuprakash *et al* , 2003) ، بينما فشلت محاولات أخرى بتنمية الفيروس في خنازير غينيا والأرانب والهامستر والفئران (Sharma and Dhanda , 1972 ; Bhatnagar and Gupta , 1974) وبذلك أثبتوا عدم إمكانية نمو هذا الفيروس في الحيوانات المختبرية أعلاه .

ب - التنمية في خلايا الزرع النسيجي :- لقد كانت هناك محاولات لتنمية الفيروس على جلد الأغنام وذلك لغرض إنتاج لقاح ضد المرض لكن لم تكن هذه المحاولات ناجحة إقتصاديا من جهة وغير أمينة من جهة أخرى ولأجل ذلك لجأ الكثير من الباحثين إلى تنمية الفيروس في أجنة بيض الدواجن وخلايا الزرع النسيجي (Ramyar and Hessami , 1967) ، وقد نجح الباحث في تنمية الفيروس في الخلايا الليفية لأجنة بيض الدواجن (chicken embryo fibroblasts) وتحضير لقاح حي ضد المرض بعد 25 تمريرة فقط في خلايا هذه الأجنة، وتم إستخدام أعضاء عديدة ومختلفة مصدراً لخلايا الزرع النسيجي ونذكر أكثرها إستخداما وهي:

- الجلد : تظهر التاثيرات المعلة للخلايا بشكل واضح جدا على خلايا جلد الأغنام عندما تستخدم هذه الخلايا مصدراً لخلايا الزرع النسيجي وذلك بعد حقنها بالفيروس وبعد تمريرات متتالية أصبح فيها الفيروس أمينا عند التمريرة 15 فقط ، في حين وجد باحثون آخرون بأن هذا النظام غير ملائم (Koylu and Nanda , 1970)

- الخصيتان : يمكن إستخدام خصى الحملان في تحضير خلايا الزرع النسيجي الثانوية كأحد الأوساط المثالية والحساسة والملائمة جدا في تنمية الفيروس (Ramisse *et al* 1978 ; Ramesh , 1980) وتتمثل التاثيرات المعلة للخلايا باستدارتها وإنتفاخها مع تكوين الأجسام الإشتمالية الحامضية والقاعدية (Soman and Singh , 1980) .
- خلايا الدرقية للأغنام: تكون خلايا الزرع النسيجي المحضرة من هذا العضو حساسة لهذا الفيروس مع تكوين تأثيرات معلة وواضحة بعد حقنها بالفيروس (Anandan *et al* , 1976 ; Rao *et al* , 1997a) .
- خلايا الكلية : وتكون خلاياها أيضا حساسة للفيروس (Pandy *et al* , 1969) .
- أنسجة الأجنة : يمكن إستخدام بعض الأنسجة لأعضاء أجنة بيض الدواجن مثل الرئة والكلية والجلد والعضلات مصدراً لخلايا الزرع النسيجي في تنمية الفيروس (Vigario and Ferraz , 1967) .

ج- تنمية الفيروس في أجنة بيض الدواجن :- يتم تنمية فيروس جدري الأغنام بالحقن في أجنة بيض الدواجن على الغشاء اللقانقي المشيمي الذي يودي إلى تكوين الآفات المرضية المتمثلة بتنخر وظهور مايسمى ب pock lesions على الغشاء اللقانقي المشيمي (Van Rooyen *et al* , 1969 ; Bhatnagar and Gupta , 1974) ، وهناك بعض العتر متكيفة للنمو على الغشاء اللقانقي المشيمي وذلك عند حقنه بعمر 10-12 يوم مثل عترة Cairo , Chinese ، في حين لم يتمكن باحثون آخرون من تنمية الفيروس على غشاء اللقانقي المشيمي بعمر 11 يوماً ، وقد إستخدم الباحث (Abdel Aziz *et al* , 2005) أجنة بيض الدواجن بعمر 10 أيام لمعايرة فيروس جدري الأغنام في هذه الأجنة كما إستخدمها الباحث (البارودي ، 2009) في تنمية هذا الفيروس وتسجيل الآفات المرضية الناتجة من نمو هذا الفيروس.

2-16-2-اختبار التلازن الدموي (HA) Haemagglutination test :- تشير بعض المصادر إلى قدرة الفيروس على تلزين كريات الدم الحمر للأغنام وخنازير غينيا (Pandey *et al* , 1969) وكذلك كريات الدم الحمر للبط والدجاج وبمعيار 1:16 و 1:8 على التوالي ، في حين ليس للفيروس القدرة على تلزين كريات الدم الحمر للأبقار والخيول والماعز (Uppal and Nikalantan ,1967).

2-16-3- اختبار تثبيت المتمم Complement Fixation Test (CFT) :- وهو إختبار مناعي يستخدم للكشف عن الأضداد والمستضدات المتخصصة في المصل وغالبا ما يتم استخدامه في الكشف عن المستضدات الممرضة والتي لا يمكن تنميتها على الاوساط الزرعية الصناعية ، ويعتمد هذا الاختبار على تحفيز عامل المتمم في حالة وجود تفاعل مسبق بين الجسم المضاد والمستضد المناظر له ، فضلا عن امكانية استخدامه في القياسات الكمية وذلك من خلال تخفيف عينة المصل المراد فحصها ، ويتم عن طريق هذا الإختبار ايضا الكشف عن الأجسام المضادة المثبتة للمتمم والمتكونة في مصول الحيوانات التي تم تلقيحها بالفيروس اللقاحي بعد مرور 7 أيام فقط من التلقيح (OIE , 2010) .

2-16-4 اختبار الترسيب المناعي في هلامة الأكار Agar Gel Immunodiffusion test (AGID) :- وهو من الاختبارات التي تعتمد على الهجرة المناعية بين المستضد والاضداد المناظرة له ويعد هذا الاختبار كفاً عند إستخدام المستضد الذؤوب ، ويتم فيه إستخدام أطباق بتري صغيرة حاوية على هلامة الأكار بتركيز1% ومن ثم يتم عمل حفرة مركزية واحدة مع عدة حفرة محيطية يوزع عليها كل من المستضد والاجسام المضادة ، توضع الاطباق بعدها في الحاضنة بدرجة 25° م لمدة 48-72 ساعة بعدها تتم قراءة النتائج إعتمادا على الخطوط الترسيبية المكتونة بين المستضدد والأضداد المتخصصة أو المناظرة له، وأستخدم هذا الاختبار من قبل (Pandey and Singh 1972 ; ; OIE , 2000; Bhanuprakash *et al* ,2004) .

2-16-5- اختبار الترحيل المناعي الكهربائي Immuno-electrophoresis :- وهو من الإختبارات الكفوءة في تشخيص المستضد الفيروسي في الإنسجة المصابة به مثل الجلد والعقد اللمفية والرئة (Uppal and Nilakantan , 1967) ، وهو أكثر حساسية من إختبار الترسيب المناعي في هلامة الأكار في تشخيص مرض جدري الأغنام (Rao *et al* , 1997b) .

2-16-6-اختبار التعادل المصلي Serum Neuterlization Test (SNT):- أستخدم هذا الاختبار من قبل العديد من الباحثين وذلك لدراسة العلاقة المستضدية بين فيروس جدري الأغنام وفيروس جدري الماعز ومرض الجلد المتكتل في الأبقار وكذلك لتاكيد المرض وتقييم الحالة المناعية بعد التلقيح (Davies and Otema ,1981) وهو إختبار متخصص لمعظم أنواع الفيروسات ، لكن الباحث (Plowright and Ferris , 1958) ذكر بأن هذا الأختبار ليس كفوءا جداً في تشخيص فيروس جدري الأغنام وذلك بسبب التعادل المصلي الجزئي فضلا عن كون هذا التعادل غير حقيقي في تحديد الحالة المناعية للحيوان ، كما إن كفاءة الأختبار تقل عند التحري عن الأضداد الخاصة بمرض جدري الأغنام في الحيوانات التي تكون بتماس مع الحيوانات المصابة وذلك لكون معيار الأضداد المعادلة فيها منخفض (OIE, 2010) .

2-16-7- اختبار الأضداد المعلمة بالفلورسين (IFA) Immuno-Fluorescent Antibody test :- تعد تقنية الاستشعاع المناعي احدى الطرق التخصصية المستخدمة في تشخيص التفاعل المناعي بين الاضداد والمستضد المناظر لها وذلك بهدف التاكد من تواجد هذه الاضداد في المصل او سوائل الجسم الاخرى ، وكذلك لغرض تشخيص المستضد في الانسجة باستخدام صبغة الفلورسين والتي تتميز باحتوءها على مجموعة تساهمية ترتبط مع جزيئات البروتين مع ثبوتيتها عند التخزين ووضوح صورتها عند استخدام الخلفيات المعتمة للمقاطع المحضرة منها ، وتجمع هذة التقنية بين الخصوصية والحساسية ولها نوعان هما:

* الطريقة المباشرة : والتي تقترن فيها الاجسام المضادة المتخصصة مع المركب المعلم بالفلورسين ومن ثم يضاف المصل المضاد الحاوي على هذه الاجسام المضادة الى النسيج وبالتالي يثبت الاخير المستضد ومن ثم تزال الاضداد غير المرتبطة بواسطة الغسل وبعدها يتم مشاهدة المقاطع المحضرة تحت ال Fluorescent microscope

* الطريقة غير المباشرة : والتي ترتبط فيها الاضداد غير المعلمة بالفلورسين مع المستضد ومن ثم ترتبط الكلوبيولينات المناعية المعلمة بالفلورسين مع الاضداد المرتبطة مسبقا مع المستضد وبذلك يمكن مشاهدتها تحت Fluorescent microscope (Nairn, 1969).

ويعد هذا الاختبار من الاختبارات البسيطة والمهمة في دراسة الفيروسات وتشخيصها وتشخيص وتحديد فيروس جدري الأغنام والدراسات الوبائية (Davies , 1976) ودراسة

الإمراضية (Gurel , 1979) والنمو الفيروسي (Sarkar *et al* , 1980) والتفاعل المتصالب بين فيروس جدري الأغنام وجدري الماعز ومرض تكتل الجلد بالأبقار (Ramyar and Hessami , 1967) والتشخيص السريع ودراسة الحالة المناعية في الحيوانات (Debnath *et al* , 1992)

2-16-8- اختبار التحلل الدموي الشعاعي المنفرد (SIH) Single Radial Hemolysis test :- حيث تستخدم هذه الطريقة للكشف عن الاضداد المضادة للفيروسات والمثبتة للمتمم ، وتعتمد الطريقة على الانتشار المناعي للاضداد في هلامة الاكار الحاوي على كريات الدم الحمر المحسسة مع المتمم ، ونتيجة لتفاعل الاضداد مع المستضد بوجود المتمم يودي الى تكوين نطاق دائري من التحلل لكريات الدم الحمراء اعتمادا على تركيز الاضداد ، حيث تحتاج هذه الطريقة الى تركيز عالي من الفيروس وتستخدم مع الفيروسات غير الملزنة لكريات الدم الحمر وهي طريقة سهلة واكثر حساسية من اختبار تثبيت المتمم . حيث يعتمد هذا الإختبار على قابلية المتمم في تحطيم كريات الدم الحمر في المعقد المناعي (Ag – Ab complex) وهو إختبار سهل ويستخدم لقياس كمية المستضد والأضداد المضادة لجدري الأغنام والمتكونة بعد التلقيح (Rao and Chandra, 1986 ; Sadri *et al* , 2002).

2-16-9- اختبار الإنتشار المناعي الشعاعي المنفرد-Single Radial Immuno Diffusion test (SRID) :- اكتشف هذا الاختبار عام 1970 ويعد نوع من أنواع الترسيب المناعي في هلامة الاكار ويعتمد على مزج المصل المضاد والحاوي على الاضداد مع هلام الاكاروز المذاب في طبق بتري بعدها يتم عمل حفرة مركزية في هلامة الاكار ويزال عنها الاكار المقطوع ثم تملأ الحفرة بالمستضد المعلوم مع عمل طبق اخر بنفس الطريقة ويوضع فيه المستضد المجهول وبعد مرور 24-48 ساعة يتم قياس قطر الحلقة الترسيبية المتكونة حول الحفرة و حيث يتناسب هذا القطر مع تركيز المستضد ، ويستخدم هذا الاختبار لتحديد الكلوبيولينات المناعية ومكونات المتمم والبروتينات مستضدية في سوائل الجسم المختلفة وقد تستخدم في بعض الاحيان صبغة ال Coomassie blue لمشاهدة حلقة الترسيب ، كما

ويستخدم في قياس الأضداد المناعية من نوع IgG المتكونة في الحملان ضد مرض جدري الأغنام (Sharma and Sharma , 1990).

2-16-10- المجهر الالكتروني (EM) Electron Microscope :- يعد من الوسائل المهمة في التشخيص الفيروسي من خلال التعرف على أشكال الفيروسات لكن لايمكنه تحديد أجناس Capri pox viruses وهي جدري الأغنام وجدري الماعز ومرض تكتل الجلد بالأبقار (Kitching *et al* , 1986) ، ويتم اجراء الفحص بتركيز فيروس جدري الاغنام في العينة وذلك باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد عالي السرعة ثم يعلق الفيروس في 2% من مادة Phosphtungstic acid بعدها تنقل قطرة منه على فلم خاص مغطى بمادة الكاربون والنحاس وتفحص المقاطع بواسطة Transmission microscope ويظهر عندها فيروس جدري الاغنام مغلف والسطح الخارجي له مكون من دهون وبروتينات ، ويتراوح طوله 200nm وعرضه 150nm ، بيضوي الشكل ومحاط بعدد كبير من الوحدات الانبوبية ، فضلا عن وجود حزمة مقعرة وسطية محاطة باثنين من الاجسام الطرفية (zhou *et al* ,2012) ، وعند فحصه بالمجهر الالكتروني الماسح scanning electron microscope وجد بان الجزيئة الفيروسية تكون محاطة بغلاف معقد التركيب يتكون من الفوسفولبيدات المندمجة بالبروتين , مع احتواءه على نبيبات Tubules ومن حولها جسور Ridges متقاطعة معاً Criss-crossed والتي تتكون اساساً من دون الوحدات subunit.

2-16-11- اختبار الإنزيم المناعي الممتز (ELISA) Enzyme Linked Immuo Sorbent Assay :- إن إختبار الإليزا غير المباشر يعتمد على الكشف عن الأضداد المتكونة ضد المستضد السطحي لفيروس جدري الأغنام وهو إختبار سريع وحساس في الكشف عن هذه الأضداد (Carn *et al* , 1994) ، وفي الأونة الآخيرة تم إستخدام نوع من هذا الإختبار يسمى ب Immuno-capture ELISA وذلك لتشخيص فيروس جدري الأغنام الموجود في معلق القشور المأخوذة من الحيوانات المصابة (Rao *et al* , 1997a ; Abbas *et al* , 2007) ، كما أستحدثت أنواع أخرى من هذا الأختبار ومنها direct ELISA ، Capripox virus-Ab ELISA (Carn *et al* , 1994 ;

Ab-detecting) indirect ELISA ، (Heine *et al* , 1999 ; OIE , 2010 ; ELISA) (Babiuk *et al* , 2009 ; OIE , 2010) ، وبالرغم من إستخدام هذه التقنية في التحري عن أضداد هذا المرض لكن لايتوفر في الأسواق التجارية العدة التشخيصية (ELISA Kit) الخاصة بهذا المرض في حين كانت هناك محاولات عديدة من قبل عدد من الباحثين في تحضير العدة التشخيصية الخاصة بكل من جدري الأغنام وجدري الماعز للتحري عن الأضداد المتكونة ضد المستضد السطحي P32 (Tian *et al* , 2010) .

2-16-12- تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)

:- نظرا لكون عملية عزل الفيروس سواء بالحقن على خلايا الزرع النسيجي أو في أجنة بيض الدواجن صعبة من الناحية التقنية وتحتاج إلى فترة زمنية ليست بالقصيرة إذ لا تعد عملية العزل من الطرق الروتينية الملائمة في التشخيص السريع (Tian *et al* , 2010) ، كما إن تشخيص الأمراض إعتمادا على العلامات السريرية والمجهر الالكتروني والفحوصات المصلية لا يعطي صورة نهائية للتشخيص (Ireland and Binepal , 1998) ، لكن وباستخدام هذه التقنية (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Lengh Poylmorphism) (PCR-RFLP) وتقنيات اخرى مثل (Restriction Endonuclease Analysis) (REA) يمكن تجاوز هذه المحددات ، ومن ميزاتها بأنها سريعة وحساسة ومتطورة وتعطي تشخيصاً دقيقاً لحالات الإصابة الفيروسية ومن ضمنها جدري الأغنام فضلا عن إستخدامها في التفريق بين كل من فيروس جدري الأغنام وجدري الماعز ومرض الجلد المتكتل بالأبقار(Ireland and Binepal , 1998 ; Heine *et al* , 1999 ; Mangana *et al* , 1999) .

إن العديد من الباحثين إستخدموا تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدية PCR (Heine *et al* , 1999; Mangana *et al*, 2000) ، وأستخدم آخرون تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل ذي الوقت الحقيقي Real Time PCR (RT-PCR) في تشخيص الجينوم الخاص بال Capripox virus إذ إن لهذه التقنية القدرة على القياس الكمي الدقيق ، وبالرغم من دقة هذه التقنية وخصوصيتها يتم اللجوء أحيانا إلى بعض الفحوصات التأكيدية الأخرى (Balinsky *et al* , 2008). واكتشفت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل عام 1980 من قبل الباحث Kary mullis وتعتمد هذه التقنية على قابلية انزيم ال DNA polymerase لبناء خيط جديد من

الحامض النووي مكملا للخيط النووي الاصلي وذلك باضافة القواعد النيوكليوتيدية حيث تحتاج هذه العملية الى الPrimer والذي يكون مسوؤلا عن اضافة اول قاعدة نيوكليوتيدية ، وتستمر عملية التضعيف لمرات عديدة وفي النهاية يكون هناك انتاج لملايين من نسخ الحامض النووي الذي تم تظخيمه وتدعى هذه النسخ ب (Amplicons) . ومن مكونات تفعل البلمرة المتسلسل التقليدي:

* قالب الحامض النووي ال DNA : حيث يحتوي القالب على تسلسل النيوكليوتيدات الهدف ، ففي بداية التفاعل يتم تعريض الحامض النووي الى حرارة عالية يحدث خلالها انفصال خيطي الحامض النووي الاصليين عن بعضهما البعض .

* يقوم انزيم الDNA polymerase ببناء خيط الحامض النووي الجديد في منطقة تسلسل القواعد النيوكليوتيدية الهدف ، حيث يتم استخدام نوع خاص من هذا الانزيم يدعى ب Taq DNA polymerase والذي يمتاز بخصوصيته العالية اثناء استنساخ الحامض النووي ، وتحتاج هذه العملية الى سلسلة قصيرة من النيوكليوتيدات تدعى بال Primer وذلك لاعطاء اشارة بدء التناسخ

* القواعد النيوكليوتيدية (deoxynucleotide triphosphate)(dNTPs) وهي كل من الادنين ، الكوانين ، الثايمين ، السايتوسين والتي تمثل الوحدات التركيبية للحامض النووي .كما وتوجد انواع اخرى من تفاعل البلمرة المتسلسل وهي تفاعل البلمرة المتسلسل ذي الوقت الحقيقي Real-Time PCR وتفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد Multiplex PCR والتي تستخدم ايضا في عمليات التشخيص الجزيئي (Ireland and Binepal , 1998).

2-17- التشخيص التفريقي Differential diagnosis :- يصاب الجلد في الأغنام بعدة أمراض والتي يمكن أن تتداخل سريريا مع مرض جدري الأغنام لذلك يجب تمييزها عن هذا المرض ومنها:-

ا- مرض اللسان الأزرق : ويصاحب هذا المرض خمول الحيوان مع تظخم في منطقة الأنف وحالات من الإجهاض في الإناث الحوامل .

ب- داء الحميقاء المعدي (Orf) : عادة ما تصاب الحملان بشدة بهذا المرض ويلاحظ وجود آفات تكاثرية في الفم وتصل نسبة الهلاكات في الحملان إلى 50% .

ج- طاعون المجترات الصغيرة : وتظهر الإصابة على شكل آفات متنخرة في الفم مع إسهال شديد ونسبة هلاكات عالية قد تصل إلى 90% في الحملان دون الشهر من عمرها .

د- التهاب الرئة الطفيلي : إذ يسبب علامات مشابهة نوعا ما لذات الرئة الفيروسي .

هـ- التهاب العقد اللمفية التجبني

و- الإصابة بالجرب والذي تصاحبه آفات جلدية (Bhanaprakash *et al* , 2006).

2-18- العلاج Treatment:- يتم عزل الحيوانات المصابة ويعطى لها غذاء متوازن كما يتم عزل المناطق المصابة بالمرض (Rao *et al* , 1994) ، وتعطى المضادات الحياتية بالحقن لتجنب الإصابات البكتيرية الثانوية ، كما يمكن إستخدام بعض المستحضرات البيطرية موضعيا منها محلول اليود السائل وذلك لتجنب تلوث الافات الخارجية الناتجة من المرض بالملوثات الجرثومية وبالتالي تعرضها للمضاعفات الناتجة من هذه الاصابات الجرثومية (Singari *et al* , 1990 ; Yeruham *et al* , 1994)

2-19- الادوية المضادة للفيروسات Antiviral drugs :- وهي مركبات او ادوية تعالج الاصابات الفيروسية وهناك انواع كثيرة من هذه الادوية وكل واحدة منها تستخدم ضد نوع معين من الفيروسات ، ومن الامثلة عليها دواء Acyclovir (Zovirax) والذي يستخدم في علاج جدري الدجاج وحالات الاصابة الفيروسية الناتجة من الخمج بفيروس الهربس ، وهذه الادوية لاتعالج الخمج لكنها تخفف منه وتزيد من سرعة التئام المناطق المتقرحة ، ومن الامثلة الاخرى لهذه الادوية Valacyclovir (Valtrex),famciclovir (famivir),Ganciclovir ، وهناك انواع اخرى تستخدم للوقاية او العلاج ضد بعض الانواع من فيروسات الانفلونزا وهي Amantadine,Remantadine . ان عملية التطور في انتاج هذه الادوية غالبا ما تكون صعبة وذلك لتاثيرها على الفيروس وخلايا المضيف على حد سواء حيث يكون الفيروس مختفيا داخل هذه الخلايا ، وتعمل هذه الادوية على كبح احدى مراحل دورة حياة الفيروس وتعتمد جرع وطريقة اعطاء هذه الادوية على نوع الفيروس المسبب للاصابة ويكون تاثيرها فعالا اذا ماكان تركيزها ثابت في الدم ومحدودا في حالة مرور فترة زمنية طويلة على الاصابة ، لكن عند استعمال هذه الادوية ربما يصاحبها افات جانبية مثل الاسهال ، صداع ، تقيؤ وغثيان ، اما

حاليا يستخدم ما يسمى ب Antipox agents مثل Cidofovir (De Clercq and Goris , 2004) كمواد مشابهة للقواعد النتروجينية في الحامض النووي للفيروس والذي يتداخل مع عملية تضاعف الحامض النووي له وبالتالي تثبيط لعملية تناسخ الفيروس .

2-20- الوقاية والسيطرة على المرض Prevention and control :- في البلدان التي تخلو من المرض يتم فيها ذبح الحيوانات المصابة والحيوانات التي تكون بملامسة مع تلك المصابة وهي الطريقة المثلى في التخلص من المرض في تلك البلدان ، وفي حالة ظهور المرض يجب إجراء الحجر على المنطقة التي ظهر بها المرض مع عزل الحيونات المصابة وعدم إدخالها إلى المناطق الخالية من المرض وتقييد حركتها فضلا عن تعقيم الحضائر وتطهيرها ، أما البلدان التي يتوطن بها المرض فيتم اللجوء إلى التلقيح الدوري ضد المرض في تلك البلدان (OIE , 2010).

2- 21-اللقاحات والتحصين ضد المرض Vaccines and vaccination:- تتوفر حاليا في الاسواق المحلية مجموعة من اللقاحات الحية المضعفة والتي تستخدم في التحصين ضد مرض جدري الاغنام وهي:

* لقاح جدري الاغنام المضعف / العترة التركية / شركة الكندي (العراق)
* لقاح جدري الاغنام المضعف / عترة (RM/65) / شركة جوفاك (الاردن)
* لقاح جدري الاغنام المضعف / العترة التركية / شركة فيتال (تركيا)
* لقاح جدري الاغنام المضعف / عترة NISHI / روسيا

إن الحيوانات التي تشفى بعد الإصابة الطبيعية بهذا المرض تتكون لديها مناعة قوية بنوعيها الخلطية والخلوية وتستمر لمدة طويلة نسبيا والتي تحمي الحيوان من جميع إنواع ال Capripox viruses (Kitching and Taylor ,1985). وتعد عملية التلقيح باستخدام اللقاح الحي المضعف من الطرق المفضلة في التلقيح ضد المرض إذ توجد العديد من اللقاحات في الأسواق التجارية . وتوجد عدة طرق للتلقيح ضد المرض ومنها :

* استخدام طريقة ال(Ovination) : إذ يتم مزج مجموعة من القشور المأخوذة من الحيوانات المصابة مع محلول الكلسرين والملح الفسيولوجي ويحقن في الأغنام وهذا المحلول ربما يعطي وقاية من الإصابة بالمرض وهذه الطريقة قديمة (Sapre and Kalia , 1980) ولهذه الطريقة نتائج سلبية وهو حدوث تفاعل موضعي قوي كما يمكن أن تكون هذه القشور ملوثة بالبكتيريا وبالتالي يصاحبها ارتفاع في حرارة جسم الحيوان مع إحتمالية إنتشار آفة المرض إلى أنحاء الجسم المختلفة ، وقد تودي إلى زيادة في فوعة الفيروس بوصفها عملية تمرير طبيعية للفيروس في مضيفه الطبيعي وبالتالي كانت هناك محددات لإستخدام هذه الطريقة (Bhanuprakash , 2001).

* إستخدام المصل الممنع : وهو مصل مضاد لفيروس الجدري لكنه لايحفز المناعة الخلوية والتي لها دور مناعي مهم ضد المرض. وتعد الحيوانات التي تماثلت للشفاء من الإصابة بالمرض مصدر لهذا المصل (Red' Ko , 1945).

* إستخدام الفيروس المحسس : تم إستخدام خليط من الفيروس الضاري مع أضداد فيروس جدري الأغنام وذلك بعد حضنه بدرجة 15-18 م لمدة 3 أيام ومن ثم حقنه بالحيوانات ونتج عنه مناعة لمدة 6 أشهر وتم استخدامه في عدة بلدان منها باكستان وفرنسا والجزائر (Singh *et al* , 1979) .

* اللقاحات المبطلة أو المقتولة :- ويتم إنتاج هذه اللقاحات من الفيروس الكامل virion وعند حقنها فإنها لاتحفز المناعة الخلوية وهذا ما يؤكد ضعف نجاح هكذا نوع من اللقاحات لإن الفيروس اللقاحي فيها مقتول ولا يتكاثر داخل جسم المضيف وهذه اللقاحات تعطي مناعة نوعا ما جيدة لكنها مؤقتة كون الأضداد المعادلة المتكونة غير عالية ولهذا السبب فإن إستخدامها غير مشجع (Davies and Mbugwa , 1985 ; Singh , 1983 ; OIE , 2010) . ويتم إستخدام العديد من المواد الكيميائية لإبطال مفعول المستضد الفيروسي منها الإيثانول ، مرثيولات الصوديوم ، بيتا بروبيو لاكتون ، Binary ethylene amine ، فينول ، إذ تعد مرثيولات الصوديوم من المواد الأكثر كفاءة في إبطال مفعول المستضدات الفيروسية (Bhanuprakash , 2001) وتستخدم عوامل مساعدة مع هذه اللقاحات مثل هيدروكسيد

الألمنيوم , أما ال thiomersal والحليب منزوع الدهن فهما من المواد الحافظة لمثل هذه اللقاحات (Celliker and Arik , 1962 ; Ramisse *et al* , 1978) .

* لقاح الفيروس الحي مع المساعد المناعي :- يستخدم هيدروكسيد الألمنيوم بصورة واسعة كمساعد مناعي ويمكن مزجه مع فيروس جدري الأغنام في تحضير لقاح ضد هذا المرض ومثل هذه اللقاحات تعطي مناعة قوية بعد إعطائها وتستمر إلى ما يقارب سنتين وهذه اللقاحات إقتصادية التحضير وأمينة ولا يصاحبها تفاعل في موضع الحقن عند إستخدامها في النعاج الحوامل(Pandey *et al* , 1969 ; Anandan *et al* , 1976) .

* اللقاحات الحية المضعفة المنماة على اجنة البيض او خلايا الزرع النسيجي:- ويتم انتاج هذا النوع من اللقاحات عن طريق اختزال فوعة الفيروس مع الاحتفاظ بحيويته وخاصيته الاستضدادية ، وكلمة تضعيف تعني تغيير الصفة الخمجية للفيروس لكي يصبح غير ممرضا وهي على العكس من تلك اللقاحات التي تنتج عن طريق ابطال مفعول الفيروس Inactivated vaccines ، وتتم عملية تضعيف الفيروس خلال تمريره في اوساط حية مختلفة عن المضيف الطبيعي له ومنها خلايا الزرع النسيجي واجنة بيض الدواجن ، ومن خلال عملية التمرير في هذه الاوساط تحدث طفرة للفيروس يحدث خلالها شطب لبعض الجينات المهمة بامراضيته وتسمح له بالنمو على الاوساط الجديدة وبالتالي عند اعادة حقنه بالمضيف الطبيعي له سوف لن ينمو بصورة تسمح له بالاحتفاظ بامراضيته وهذا ما يقصد بالتضعيف ويصبح عندها سهلا على الجهاز المناعي للمضيف مع تحفيزه على تكوين خلايا الذاكرة المناعية والتي تحمي المضيف اذا ما تعرض للفيروس الضاري والممرض وتكون هذه اللقاحات حاوية على الجزيئات الفيروسية الكاملة والحية الفاقدة لفوعتها ومن ميزات هذه اللقاحات بانها تحفز المناعة الخلوية والخلطية وينتج عنها تحفيز مناعي سريع ، وهنالك أنواع كثيرة من هذه اللقاحات تختلف فيما بينها من ناحية العتر المستخدمة في تحضيرها ومن الأمثلة على هذه العتر الجزائرية والكازخستانية والمنغولية والرومانية – فنار وRM/65 وغيرها كثير (Bhanuprakash , 2001) ، لقد وجد بأن العترة الرومانية تعطي حماية تصل إلى السنتين (Achour *et al* , 2000) ، أما الحماية الناتجة من عترة RM / 65 فتستمر إلى ما يقارب 22 شهرا ، ويتم التلقيح بهذا النوع من اللقاحات سنويا ويعطي مناعة للحملان حديثة الولادة تستمر لمدة شهرين

بعد الولادة (Precausta *et al* , 1979) وغالبا ما يستعمل المتوفر من هذه اللقاحات في الأسواق المحلية للسيطرة على المرض (Roth and Spickler , 2003 ; Bhanuprakash , 2004 ; Hosmani *et al* , 2004) .

* اللقاح المحضر من متعدد الببتيد : إن البروتين الفيروسي ذو قدرة إستضدادية عالية على تحفيز كل من المناعة الخلوية والخلطية (Rai *et al* , 1985) ، كما إن تلقيح الأغنام بهذا البروتين ممزوجا مع عامل فروند غير الكامل (Incomplete freund adjuvant) ينتج معياراً عالياً من الأضداد يصل إلى 256:1 وتصل نسبة الحماية ضد المرض إلى 67% فقط في اختبار التحدي (Rai *et al* , 1986) .

* اللقاحات المتعددة أو الممزوجة : ومن الأمثلة عليها هو لقاح جدري الأغنام الممزوج مع لقاح الجمرة الخبيثة أو لقاح الكلوستريديا ، وتعد هذه اللقاحات إقتصادية وتقلل من عملية الإجهاد على الحيوانات بعد التلقيح ، لكن هذا النوع من اللقاحات يحتاج إلى دراسة أكثر تعمقا وتفصيلا (Bhanuprakash *et al* , 2006) .

* اللقاحات المستقبلية : نظرا لعدم توفر لقاح مهجن (Recombinant vaccine) ضد Capripox virus في الاسواق المحلية في وقتنا الحاضر، تتجه الدراسات الحديثة والتي تهتم بانتاج اللقاحات الى جيل جديد ومتطور من هذه اللقاحات باستخدام تقنيات حديثة في هذا المجال ومنها استخدام النواقل (Vectors) البايولوجية لانتاج هكذا نوع من اللقاحات وذلك باستخدام الوراثة الجزيئية والتي تتضمن حشر للجينات المختارة (والتي قد تعود ربما لاكثر من واحد من واحد من الفيروسات) في المادة النووية لهذه النواقل ومن ثم حقنها في جسم المضيف حيث ان تكاثر هذه النواقل داخل جسم المضيف يودي الى التشفير لانتاج المستضدات البروتينية للمستضد الهدف وبالتالي تحفيز انتاج الاضداد لذلك المستضد (Berhe *et al* , 2003) ، وعند التعرض للمستضد الممرض طبيعيا فان الجهاز المناعي لديه خلايا الذاكرة المناعية والتي يكون لها الدور الكبير في محاربة المستضد المرضي فضلا عن دورها ايضا في تحفيز المناعة الخلوية . إن اللقاحات المتوفرة حاليا في الأسواق والمراكز البيطرية تحتوي على الجزيئة الفيروسية الكاملة كمستضد لقاحي ، لكن التوجهات الحديثة في إستخدام اللقاحات تعتمد بصورة خاصة على الجين الفيروسي المتخصص والمسوؤل عن فوعة الفيروس والذي يعمل بدوره على

تحفيز الجهاز المناعي . إن إستخدام الهندسة الوراثية مع فيروس جدري الأغنام الضاري وإجراء عملية شطب لجينات خاصة والمسماة بال Klech-like genes يمكن أن ينتج عنه فيروس ذو خواص مشابهة للمستضد اللقاحي (Blanisky *et al* , 2007) . كما توجد جينات أخرى يمكن الإعتماد عليها وإستخدامها في تضعيف الفيروس الضاري (Babiuk *et al* , 2008). كما ان هناك توجهات لانتاج لقاحات تدعى بال Subunit vaccine (التي تمثل جزء من الحامض النووي الفيروسي والذي يشفر للمستضدات المهمة والفعالة في استحداث استجابة مناعية ضد فيروس الجدري) وامكانية استخدامها تجريبيا في مناطق موبوءة ويتوطن بها المرض ، حيث ان دراسة القاعدة الوراثية لجينوم الفيروس وامراضيته مهمة جدا في تحضير مثل هذه اللقاحات والتي تعمل بدورها الى تجنب انتشار المرض في المناطق غير الموبوءة (Carn , 1993). اما احدث الدراسات تتجه نحو استخدام ال DNA vaccine من خلال التشفير لانتاج المستضد الغريب عند حقنه في الحيوان ، وتمتاز هذه اللقاحات بأمانها ، رخصها ، سهلة التحضير وعدم احداثها للتاثيرات الجانبية (Babiuk *et al* , 2008).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and methods

3-1- المواد والمحاليل المستخدمة

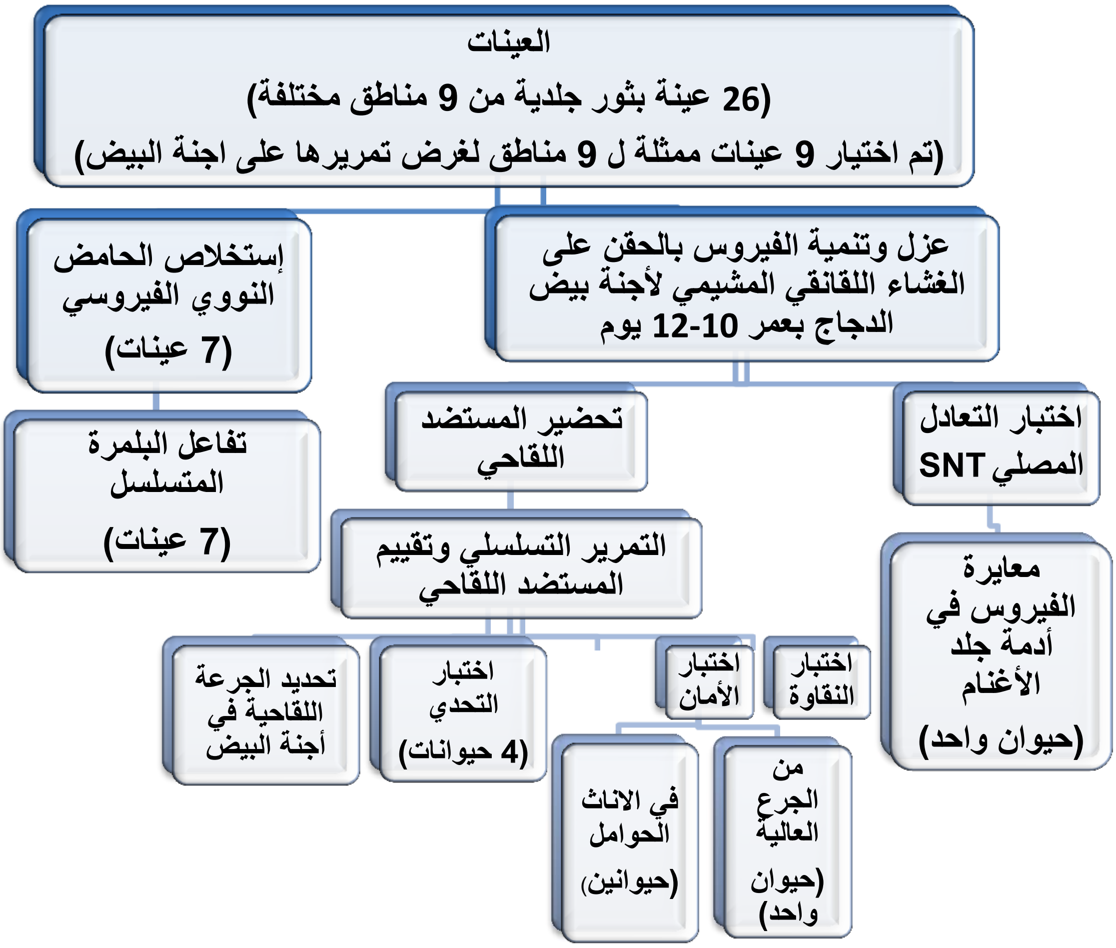
- محلول الكلسرين 10%
- محلول الملح الفسيولوجي المعقم (0.9% NaCl)
- رمل معقم
- مضادات حياتية (Pencillin , Streptomycin , Nystatin)
- لقاح جدري الاغنام الاردني (عبوة100 جرعة) (شركة جوفاك الاردنية)
- لقاح جدري الاغنام العراقي (عبوة 50 و100 جرعة)(شركة الكندي العراقية)
- كحول الايثانول 70%
- مسحوق الاكاروز (SIGMA,USA)
- محلول الفورمالين المتعادل
- كحول الايزوبروبانول
- محلول TBE Buffer (1 لتر) (PH=8.3) (Tris base 54gm,Boric acid 27.5gm,EDTA 20ML)
- محلول TE Buffer (PH=8) (Tris.Cl 10Mm , EDTA 1mM)
- محلول Ethidium bromide (2.5 mg/ml)(SIGMA ,USA)
- زايلول
- شمع البرافين
- صبغة الهيماتوكسلين والايوسين

3-2- الاجهزة والادوات المستخدمة :

جدول (1) الأجهزة والأدوات المستخدمة في الدراسة

اسم الجهاز او الاداة	الشركة المصنعة او بلد المنشأ
مقص	المانيا
ملقط	المانيا
حاويات زجاجية McCartney tubes	تركيا
هاون مع يدة	المانيا
انابيب اختبار بلاسيكية plain tube	الصين
جهاز طرد مركزي مبرد	المانيا Heraeus
سرنجات بلاستيكية معقمة حجم 10 مل	تركيا Ayset
سرنجات بلاستيكية حجم 1مل	تركيا Ayset
جهاز فحص البيض	-
جهاز ثقب البيض	-
حاضنة بيض محلية	العراق
حاضنة	المانيا Memmert
جهاز خلاط مغناطيسي Magnatic sterror	تركيا Nuve
موصدة Autoclave	المانيا Heraeus
حمام مائي	المانيا Kisker
اطباق بتري بلاستيكية صغيرة وكبيرة	الصين
جهاز vaccum	المانيا
انابيب ابندروف	تركيا
ماصات متعددة الاحجام	المانيا Eppendorf
جهاز مايكروويف	المانيا Whirpool
جهاز Themocycler (Master cycler gradient)	المانيا Eppendorf
جهاز Nanodrop	امريكا
جهاز طرد مركزي (خاص بانابيب ابندروف)	المانيا Hettich
طبق التخفيف Macrotiter plate	المانيا
مجهر ضوئي	ايطاليا Optica
كاميرا دجيتال	اليابان Sony
المشراح Microtomatic SR-450	امريكا
جهاز ترحيل كهربائي Gel Tank and power supply	امريكا OWL
جهاز تقطير	المانيا Memmert
جهاز اشعة فوق البنفسجية UV transluminator	امريكا Cleaver

3-3- العينات Samples :- تضمنت هذه الدراسة جمع 26 عينة (بثور جلدية) من أغنام مصابة سريريا بمرض الجدري (نعاج وحملان) وتم ذلك خلال شهر كانون الاول وشباط من عام 2014 ، توزعت هذه الحيوانات في مناطق وقرى عديدة من محافظة نينوى وهذه المناطق هي : كوكجلي وترجلة وأبو جربوعة ودراويش وبازكرتان وربيعة (قرية تل سمير) ومنارة شبك وشاقولي وتل اسود ، وإختلفت أعداد العينات التي جمعت من هذه الحيوانات المصابة في هذه المناطق وبصورة متباينة إعتمادا على تواجد الإصابة فيها ومنها تم إحتساب النسبة المئوية للاصابة في القطعان المتواجدة في المناطق المذكورة اعلاه ، حيث تم جمع هذه العينات باستخدام مقص وملقط معقم وبعد إزالتها من الجلد وضعت في حاويات زجاجية معقمة (MaCartney tubes) تحتوي على مادة الكلسرين المخفف مع محلول الملح الفسيولوجي المعقم بتركيز 10% ، بعدها نقلت هذه العينات إلى مختبر الفيروسات / كلية الطب البيطري / جامعة الموصل وتم حفظها بدرجة -20° م لحين الإستخدام (Timothy *et al* , 2007 ; Nagalakshimi , 2008) ، ثم تم إختيار 9 عينات منتخبة لتمثل كل عينة منها إحدى المناطق المذكورة في أعلاه ، إذ تم تقطيع (1-2 غم) من العينة الواحدة في هاون خزفي باستخدام مقص وملقط معقم وأضيف إليها الرمل الناعم المعقم بكمية (1-2 غم) مع اضافة 2مل المضادات الحياتية (Pencillin 2000 IU/ml , Streptomycin 2000 µg/ml , Nystatin 200 U/ml) والمذابة في 100 مل من محلول الملح الفسيولوجي المعقم ، ثم تم سحنها باستخدام الهاون الخزفي لمدة خمس دقائق (Sheikh Ali , *et al* , 2004 ;OIE , 2010 ; Abdulsajid , 2010) ، بعدها نقلت العينات الى أنابيب إختبار بلاستيكية ومن ثم نبذت بإستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بدرجة 4 م وبسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 30 دقيقة ، بعدها أهمل الراسب بينما تم توزيع الراشح الى عدة أنابيب بلاستيكية ووضع بعدها بدرجة 20°- م لحين الإستخدام في الإختبارات اللاحقة (Ravozzo and Burke , 1973 ; Varshovi *et al* , 2009) .



الشكل (1) الخطة البحثية للدراسة الحالية

3-4- تحضير المصل عالي التمنيع Preperation of Hyper Immune Serum (HIS) :- تم إستخدام حملان عدد 3 بعمر 4-5 أشهر إثنان منما لإنتاج المصل عالي التمنيع (HIS) بينما ترك الأخير كمجموعة سيطرة سالبة (غير ملقح) (مصدر للمصل المرجعي السالب) ، وذلك بعد التأكد من تاريخ الحالة لهذه الحيوانات كونها غير ملقحة وغير مصابة بمرض جدري الأغنام ، إذ تم تلقيح حملان عدد 2 أسبوعيا بلقاح جدري الأغنام المنتج من شركة جوفاك الأردنية (عترة RM/65، الجرعة اللقاحية الواحدة تحتوي $10^{2.5}$ $TCID_{50}$/ml ، رقم الوجبة 200513/01) وذلك عن طريق الحقن تحت الجلد وبالعضلة بمقدار 1 مل (1مل يمثل جرعة لقاحية واحدة) لكل من الحيوانين ثم تم إعادة التلقيح أسبوعيا ولثلاثة أسابيع أخرى متتالية وبنفس الطريقة والكمية (الحقن تحت الجلد وبالعضلة) ، بعدها تم تحضير منطقة الرقبة لهذين الحيوانين وذلك بإزالة الصوف منها وتعقيمها بالكحول (إيثانول 70%) لغرض جمع الدم من الوريد الوداجي لهذه الحيوانات بإستخدام سرنجات بلاستيكية معقمة (حجم 10مل) بعد مرور أسبوع واحد فقط من آخر تلقيح ووضع الدم في أنابيب بلاستيكية معقمة وبكمية 3-4 مل وترك ليتجلط بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعة واحدة ثم وضع في الثلاجة لمدة 24 ساعة بعدها تم نبذه باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 1500 دورة بالدقيقة ولمدة 10 دقائق ثم تم فصل المصل عالي التمنيع وتوزيعه في أنابيب بلاستيكية وحفظ بعدها بدرجة -20° م لحين إستخدامه في الفحوصات المصلية قيد الدراسة (Pandy and Singh , 1972 ; Lennett and Schmidt , 1979; Rao *et al* ,1996) ، كما تم جمع الدم من حيوان السيطرة السالبة وبنفس الطريقة ، في حين تم جمع الدم من حيوان ملقح مسبقا (نعجة ملقحة بلقاح جدري الاغنام المنتج من شركة جوفاك الاردنية عترة RM/65 ، الجرعة اللقاحية الواحدة تحتوي $10^{2.5}$ $TCID_{50}$/ml ، رقم الوجبة 200513/01) وإستخدامه كمصل مرجعي موجب (Elshafi and Ali , 2008).

3-5- البيض المستخدم في عملية التمرير التسلسلي :- تم إستخدام بيض الدواجن المخصب (تركي المنشأ) لأمهات افراخ فروج اللحم بعد الحصول عليه من مفقس النبراس/ موصل (كوكجلي) وذلك لإجراء عمليات التمرير التسلسلي المتكرر فيه والتعرف على التأثيرات

المرضية المترافقة مع نمو العزلات الفيروسية قيد الدراسة على الغشاء اللقانقي المشيمي (Chorio-Allantoic Membrane) (CAM) .

3-6- التمرير التسلسلي للفيروس الحقلي في أجنة بيض الدواجن The serial passage of field virus in fertile chicken embryos :- تم تمرير 9 عينات مختارة وممثلة لتسع مناطق مختلفة من محافظة نينوى والتي تم تحضيرها مسبقاً للحقن على الغشاء اللقانقي المشيمي لأجنة بيض الدواجن ولثلاث تمريرات متتالية (Van Rooyen *et al* , 1969 ; Nakano , 1979) ، وتضمنت طريقة الحقن إستخدام البيض المخصب والمحضن بدرجة 37° م وبعمر10-12 يوم ، حيث تم تأشير موقع الفسحة الهوائية للبيضة والجهة المقابلة للجنين بواسطة جهاز فحص البيض (egg candler) بعدها تم عمل فتحة مثلثة الشكل في الجهة المقابلة للجنين وذلك بعد تعقيمها بالكحول (إيثانول70%) وبإستخدام جهاز ثقب البيض (egg drill) ومن ثم أزيلت القطعة المثلثة من قشرة البيضة المخصبة مع عمل ثقب صغير في أعلى موقع من الفسحة الهوائية بواسطة نيدل خاص يدعى (evacutainer niddle) ، بعدها تم تسليط ضغط سالب على الثقب المحدث في أعلى الفسحة الهوائية بأستخدام ماصة مطاطية لينتج عنه إنخفاض في الغشاء اللقانقي المشيمي (Chorioallantoic Membrane)(CAM) في منطقة الفتحة المثلثة تاركا فسحة مناسبة تم خلالها حقن السائل الفيروسي بكمية 0.1 مل بطريقة التقطير على الغشاء اللقانقي المشيمي وباستخدام سرنجة حجم 1مل ، ثم تم غلق الثقب المحدث بأعلى الفسحة الهوائية والفتحة المثلثة الشكل بنفس القشرة المزالة بإستخدام شمع البرافين السائل وتركه ليتصلب ، كما وتم تعليم البيض المحقون لمعرفة رقم العينة وتسلسل التمريرة وتاريخ الحقن ، بعدها أعيد البيض المحقون الى الحاضنة مع مراقبته يومياً ولمدة 6 ايام متتالية بعد الحقن وتسجيل نتائج التمريرات الأولية الثلاثة حيث تم نبذ الهلاكات التي حدثت للأجنة في اليوم الاول بعد الحقن وذلك لكونها قد تحدث نتيجة أخطاء تكنيكية ، أما البيض المتبقي بعد مرور 6 أيام من الحقن فتم وضعه في الثلاجة لمدة 4 ساعات بدرجة 4°م لغرض قتل الأجنة والسماح بتجلط الدم داخل الاوعية الدموية للغشاء اللقانقي المشيمي تجنباً لحدوث النزف لتلك الاوعية ، بعدها تم فتح البيض من جهة الفسحة الهوائية وإخراج الجنين مع الغشاء اللقانقي المشيمي المحيط به ووضعه في طبق بتري معقم لمشاهدة التغيرات والتأثيرات والأفات أو البثور

التي تصاحب نمو الفيروس على هذا الغشاء ، ومن ثم أعيد سحن الغشاء مع الرمل المعقم ونبذه بواسطة جهاز الطرد المركزي المبرد بدرجة 4 م وبسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 30 دقيقة ، بعدها أهمل الراسب بينما تم حفظ الراشح بدرجة −20°م لحين إستخدامه في التمريرة اللاحقة مع وجود مجموعة أخرى من البيض المخصب حقنت بمحلول الملح الفسيولوجي المعقم وأعتبرت كمجموعة سيطرة سالبة مع كل تمريرة ، ومن خلال التغيرات والأفات التي تم مشاهدتها والتي رافقت نمو الفيروس على الغشاء اللقانقي المشمي تم إنتخاب واحدة من ثلاثة عينات والتي أعطت نتيجة موجبة وواضحة لعملية الحقن وذلك لإستعمالها في عمليات التمرير المتسلسل اللاحقة بهدف تضعيف الفيروس الحقلي الضاري.

3-7- حساب الجرعة الخمجية للعزلة الفيروسية (التمريرة السادسة) Calculation the infective dose of viral isolate (sixth passage):- تم عمل تخافيف عشارية لهذه العزلة بإستخدام محلول الملح الفسيولوجي المعقم (NS) (Sterile Normal Saline 0.9%) ابتداءاً من التخفيف 10^{-1} وحتى التخفيف10^{-6} ، حيث أجريت التخافيف بأستخدام 6 أنابيب إختبار بلاستيكية إحتوى كل منها على 9 مل من محلول الملح الفسيولوجي المعقم بعدها أضيف 1 مل من العزلة الفيروسية الى الانبوب الاول والذي كان يمثل التخفيف 10^{-1} ومن ثم تم نقل 1مل من الانبوب ذو التخفيف 10^{-1} الى الانبوب الثاني ليصبح تخفيفه 10^{-2} وهكذا حتى التخفيف10^{-6} حيث أهمل اخر 1مل من التخفيف الاخير ، بعدها حقنت هذه التخافيف في أجنة بيض الدواجن المخصبة بعمر10−12 يوم بطريقة الحقن على الغشاء اللقانقي المشيمي بكمية 0.1 مل باستخدام سرنجة حجم 1مل وبواقع 4 بيضات لكل تخفيف (4 مكررات) مع وجود مجموعة سيطرة موجبة محقونة بالعزلة الفيروسية غير المخففة وأخرى سالبة محقونة بمحلول الملح الفسيولوجي المعقم فقط ، بعدها تم مراقبة العلامات والتغيرات المرضية التي ترافق نمو الفيروس وتظهر على الأجنة وتسجيلها وإهمال أو نبذ الهلاكات التي تحدث في في اليوم الاول بعد الحقن ومن ثم حساب الجرعة الخمجية للفيروس لتحديد المعيار الحجمي له والمعبر عنه بحجم 0.1 مل والذي يحدث تاثيراً مرضيا في 50% من أجنة البيض المحقونة (EID_{50}/0.1 ml) بإستخدام معادلة ريد ومنش (Reed and Muench , 1938 ; Abdel Aziz *et al* , 2005) (جدول2).

جدول (2) طريقة حساب معيار الجرعة الخمجية للفيروس بإستخدام معادلة ريد ومنش لقياس الجرعة الخمجية ل 50% من الاجنة المحقونة (EID_{50}/0.1 ml)

تخفيف الفيروس	الاجنة المصابة	الاجنة غير المصابة	مجموع الاجنة المصابة	مجموع الاجنة غير المصابة	نسبة الاصابة	النسبة المئوية للاصابة
10^{-1}	4	0	12	0	12/12	%100
10^{-2}	4	0	8	0	8/8	%100
10^{-3}	3	1	4	1	5/4	%80
10^{-4}	1	3	1	3	4/1	%25
10^{-5}	0	4	0	4	4/0	%0
10^{-6}	0	4	0	4	4/0	%0

المسافة الطردية = النسبة المئوية للاصابة في أعلى من 50% - 50%

النسبة المئوية للأصابة في أعلى من 50% - النسبة المئوية للأصابة بأقل من 50%

= 30 /55 = 0.5 ويصحح هذا الرقم بضربه في معامل التخفيف (لوغاريتم 10=1)

المسافة الطردية المصححة = 0.5 x 1 = 0.5

اللوغاريتم السالب لمعيار الجرعة الخمجية (EID_{50}) = اللوغاريتم السالب للتخفيف فوق 50% + المسافة الطردية المصححة

= 3 + 0.5 = 3.5

الجرعة الخمجية (EID_{50}) = $10^{3.5}$ = ($10^{3.5}EID_{50}$/0.1ml)

3-8- اختبار التلازن الدموي (HA) Haemagglutination Test:- أجري هذا الإختبار للتعرف على قابلية العزلة الفيروسية الناتجة من التمريرة السادسة ($10^{3.5}EID_{50}$/0.1ml) وذلك بعد حقنها في أجنة البيض المخصب على تلزين كريات الدم الحمر للأغنام (RBCs)

(المضاف لها مانع تخثر والمغسولة لثلاث مرات متتالية بمحلول الملح الفسيولوجي المعقم) من عدمه ، وقد خففت العزلة ثنائياً بإستخدام محلول الملح الفسيولوجي المعقم ، حيث تم وضع 0.2 مل من محلول الملح الفسيولوجي المعقم (NS) في كل حفرة (10 حفر) من طبق التخفيف نوع Macrotiter plate بعدها أضيف 0.2 مل من العزلة الفيروسية أعلاه الى الحفرة الاولى والتي كان تخفيفها (1:2) ثم مزجت مع محلول الملح الفسيولوجي المعقم ونقل بعدها 0.2 مل الى الحفرة الثانية (1:4) وهكذا حتى الحفرة العاشرة بتخفيف (1:1024) حيث تم إهمال آخر 0.2 مل . بعدها أضيف 0.2 مل من كريات الدم الحمراء المغسولة للأغنام (RBCs) بتركيز 1% الى جميع الحفر ، مع وجود مجموعة سيطرة سالبة مكونة من محلول الملح الفسيولوجي المعقم مع كريات الدم الحمراء المغسولة فقط وأخرى موجبة إحتوت على الفيروس غير المخفف مع كريات الدم الحمراء المغسولة ومحلول الملح الفسيولوجي المعقم ، وتم وضع الطبق بعدها في الحاضنة بدرجة 37م لمدة ساعة واحدة ومن ثم تمت قراءة النتيجة لمشاهدة وجود التلازن الدموي بين الفيروس مع كريات الدم الحمراء من عدمه وتسجيل لمعيار الفيروس أذا ما تمت ملاحظته (Uppal and Nilakantan,1974).

3-9- اختبار الترسيب المناعي في هلامة الأكار(AGID) Agar Gel Immunodiffussion Test :- أجري هذا الإختبار حسب طريقة (Kitching *et al* , 1986 ; Rao *et al* , 1997a) وتم إستخدام أطباق بتري بلاستيكية صغيرة الحجم لصب الأكاروز المحضر وذلك بعد إذابته بمحلول الملح الفسيولوجي المعقم بتركيز (1%) حيث يمزج ويغلى الأكاروز المذاب بواسطة جهاز الخلاط المغناطيسي الحراري (Magnatic stirrer) لحين تجانسه ثم يعقم الأكاروز بجهاز الموصدة (Autoclave) تحت ضغط 15 باوند وبدرجة حرارة 121 مئوية ولمدة 15 دقيقة بعدها يبرد ألاكاروز بواسطة حمام مائي بدرجة 45°م ، ويصب طبقة خفيفة منه في طبق بتري صغير بمقدار 1-2 مل وبعد أن يجف تماماً تصب الطبقة الثانية من الأكاوزر بمقدار 3-4 مل ويترك بعدها لمدة ساعة كاملة ليتصلب ثم يستخدم قالب خاص لعمل 5 حفر دائرية إحداهما في المركز وأربع حفر محيطية قطرها 5 ملم والمسافة بين هذه الحفر 5-6 ملم ، بعدها تتم إزالة الأكاروز المقطوع بإستخدام ماصة باستور مربوطة بجهاز تخلخل الضغط (Vaccum) لتكون بذلك جاهزة للاختبار ، ووضعت بعدها

العزلة الفيروسية (التمريرة السادسة) ($10^{3.5}EID_{50}$/0.1ml) في الحفرة الوسطية بينما وضعت الأمصال عالية التمنيع (حملان عدد 2) في الحفرة 1و2 ومصل السيطرة الموجبة والماخوذ من نعجة ملقحة مسبقا في الحفرة 3 (Nour *et al* , 2012) في حين وضع المصل السالب ومصدره نعجة غير ملقحة في الحفرة 4 ، ثم وضعت الأطباق في الحاضنة بدرجة 22–25°م مع وجود مصدر للرطوبة داخل الحاضنة وتم الأستمرار بإضافة كل من العزلة والأمصال إلى الحفر المخصصة لكل منها ، وبعد مرور 48 ساعة من الاختبار تم قراءة نتائج هذه التجربة ، كما أجري هذا الأختبار باستخدام مكررين من الأمصال عالية التمنيع (المحضرة مسبقا) على نفس الطبق وبدون سيطرة سالبة أو موجبة في حين وضعت العزلة الفيروسية الناتجة التمريرة التاسعة في الحفرة الوسطية لمشاهدة الخطوط الترسيبية بين العزلة الفيروسية وهذه الامصال .

3–10– الفحص النسجي Histopathological Examination :– تم إستخدام عينات من الغشاء اللقانقي المشيمي الذي ظهرت عليه ال Pock Lesions لغرض الفحص النسجي وذلك بوضعها في محلول الفورمالين المتعادل Neuteral buffered formaline بتركيز 10% ، وتم إتباع طريقة (Luna , 1968) في تحضير المقاطع النسجية وذلك بتعريضها الى سلسلة من الكحولات متصاعدة التراكيز وذلك لازالة الماء منها ثم الزايلول لغرض توضيحها ومررت بعدها بمادة البرافين بدرجة 62° م ثم طمرت بقوالب البرافين وبعد التبريد قطعت باستعمال جهاز المايكروتوم بسمك 5 مايكروميتر، ثم ثبتت المقاطع باستعمال بياض البيض مع الكلسرين وأضيف له الثايمول لمنع تعفن المقاطع النسجية بعدها جرى تصبيغها بالطريقة التقليدية بصبغة الهيماتوكسلين والأيوسين (H&E) ، ومن ثم فحصت الشرائح المحضرة بواسطة المجهر الضوئي وبالعدسة الزيتية (Oil immersion) (قوة التكبير100X).

3–11– اختبار التعادل المصلي Serum Neuterlisation Test (SNT) :– أجري هذا الاختبار اعتمادا على طريقة استخدام التراكيز المختلفة للمصل مع التركيز الثابت للفيروس ، حيث تم معاملة المصل عالي التمنيع المستخدم في هذا الإختبار والمحضر مسبقاً في الحملان بدرجة 56°م ولمدة 30 دقيقة وذلك للتخلص من العوامل غير المتخصصة (Amitha *et al* 2010,) ، ومن ثم تم عمل تخافيف ثنائية من هذا المصل وذلك بوضع 1 مل مع محلول الملح

الفسيولوجي المعقم في أنابيب إبندروف حجم 2 مل (عدد 8 أنابيب) بعدها أضيف 1 مل من المصل عالي التمنيع الى الانبوب الاول والذي أصبح تخفيفه 1:2 ونقل بعده 1 مل الى الانبوب الثاني بتخفيف 1:4 وهكذا حتى التخفيف الاخير 1:256 ، بعدها تم إهمال آخر 1مل من الانبوبة الأخيرة ، ثم أضيف إلى هذه التخافيف كمية 1مل من العزلة الفيروسية (التمريرة السادسة) بتركيز ($10^{3.5}EID_{50}/0.1ml$) ، وحضنت الأنابيب في الحاضنة بدرجة 37 م لمدة ساعة واحدة ، ومن بعدها تم حقن 4 بيضات مخصبة من كل تخفيف بكمية 0.1 ml (عزلة الفيروس من التمريرة السادسة مع المصل عالي التمنيع والمخفف) لكل بيضة على الغشاء اللقانقي المشيمي (CAM) ، وتضمن الإختبار أيضا وجود مجموعة سيطرة موجبة محقونة بالعزلة الفيروسية فقط وسيطرة سالبة تم حقنها بالمصل عالي التمنيع فقط ومجموعة أخرى غير محقونة ، بعد ذلك تم فحص البيض المحقون يومياً بواسطة جهاز فحص البيض egg candler ولمدة 6 أيام متتالية ومن ثم تم حساب معيار الأضداد المناعية المعادلة للعزلة الفيروسية (التمريرة السادسة) والمعبر عنه بمقلوب أعلى تخفيف من المصل عالي التمنيع والذي يحمي 50% من الأجنة المحقونة من ظهور التأثيرات المرضية للفيروس (OIE,2004) وذلك حسب معادلة (Reed and Muench , 1938).

3-12- التشخيص الجزيئي Moleculer Diagnosis :- تم إجراء عملية السحن لعينات الغشاء اللقانقي المشيمي التي ظهرت عليها ال Pock Lesions بإستخدام الهاون والرمل المعقم ، حيث تم أخذ 1-2 غم من العينة وأضيف اليها كمية مماثلة من الرمل المعقم مع 2 مل من محلول الملح الفسيولوجي المعقم بعدها نبذت العينات بواسطة جهاز الطرد المركزي المبرد بدرجة 4 م وبسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 30 دقيقة ، أهمل الراسب أما الراشح فتم إستخدامه كمصدر لإستخلاص الحامض النووي الفيروسي منه ، كما تم إستخدام كل من عينات الدم والبلازما لحيوانين مصابين بالمرض كل على حدة للتحري عن تواجد الفيروس في هذه العينات بإستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

3-12-1- استخلاص الحامض النووي الفيروسي :- تم إستخلاص الحامض النووي للفيروس من خلال إتباع الطريقة المذكورة في بروتوكول الشركة المنتجة (Bioingentich.Ltd.Chile) لعدة الإستخلاص وهي كالاتي :

- مرحلة تحلل الخلايا : تم إستخدام 200 مايكروليتر من العينات المذكورة في (جدول2) ومزجت مع 900 مايكروليتر من المحلول المحلل للخلايا (cell lysis solution) وذلك باستخدام انابيب ابندروف حجم 2 مل ، وحضن الخليط بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق ، ومن ثم تم إجراء عملية النبذ المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقتين، أهمل بعدها الراشح أما الراسب فتم إستخدامه في الخطوة اللاحقة
- مرحلة تحلل أنوية الخلايا :- تم إضافة محلول (تحطيم أنوية الخلايا) إلى الراسب وبعد مزجه جيدا أضيف إليه 2 مايكروليتر مادة proteinase K (لتحليل البروتين في العينة) بشكل جاهز من الشركة المنتجة وحضن بدرجة 60° م لمدة نصف ساعة كما تم حضنه مباشرة لمرة ثانية بدرجة 90 م ولمدة 3 دقائق فقط ، ومن ثم أضيف إليه RNase solution بشكل جاهز من الشركة المنتجة وبكمية 1 مايكروليتر وحضن بدرجة 40° م لمدة 20 دقيقة.
- ترسيب البروتين : وتم ذلك باستخدام 42 مايكروليتر من محلول ترسيب البروتين إلى الخطوة السابقة مع المزج لمدة 20 ثانية ، بعدها تم نبذه مركزيا بوسطة جهاز الطرد المركزي المبرد Microcentrifuge بسرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة دقيقتين فقط.
- عملية Rehydration للحامض النووي : إذ أضيف 150 مايكروليتر من مادة أيزوبوبانول إلى السائل الطافي في الخطوة السابقة بعدها تم نبذه مركزيا بسرعة 12000 دورة / دقيقة لدقيقتين وأهمل الراشح وأضيف 150 مايكروليتر من الإيثانول إلى الراسب بعدها تم نبذه بواسطة جهاز الطرد المركزي المبرد Microcentrifuge بسرعة 12000 دورة / دقيقة لدقيقتين أيضا ، وسحب الإيثانول وترك الراسب ليتبخر منه ماتبقى من الإيثانول ولمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ، وأخيرا تم إضافة 20 مايكروليتر من محلول DNA Rehydration وحفظت العينات بدرجة 20°- لحين استخدامها في تفاعل البلمرة المتسلسل (جدول3).

الجدول (3) كميات وتفاصيل المواد المستخدمة في استخلاص الحامض النووي الفيروسي والمجهزة من قبل الشركة المنتجة للعدة التشخيصية

حجم العينة	محلول التحلل		محلول البروتينيز K	محلول ال RNase	محلول ترسيب البروتين	الايزو بروبانول	الإيثانول	محلول ال DNA Rehydration
	للخلايا	للنواة						
200 µl	900 µl	120 µl	2 µl	1 µl	42 µl	150 µl	150 µl	20 µl

3-12-2- حساب تركيز الحامض النووي المستخلص:- تم إستخدام جهاز (Nanodrop) لقياس تركيز ونقاوة الحامض النووي الذي تم إستخلاصه من العينات المنتخبة وذلك بوضع 1 ميكروليتر من عينة الحامض النووي المستخلص في الحفرة المخصصة له وتسجيل القراءة لكل عينة ، في حين تم تصفير الجهاز بصورة متكررة وذلك بعد فحص كل عينة على حدة بإستخدام DNase / RNase free water وهكذا بالنسبة لباقي العينات أيضا.

3-12-3 تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل لتشخيص فيروس جدري الأغنام :- تم تحضير مزيج التفاعل لكل من العينات (1,2,3,4,5,6,7) (جدول4) ، السيطرة الموجبة ، السيطرة السالبة ، حيث يتم مزج 5.5 مايكروليتر من ال premixture والمرفق بصورة جاهزة مع العدة التشخيصية مع 6 مايكروليتر من DNase / RNase free water ثم أضيف لهما 2 مايكروليتر من الحامض النووي المستخلص من العينات كل على حدة وكذلك الحال بالنسبة للسيطرة الموجبة والتي تضمنت (5.5 مايكروليتر من ال premixture مع 6 مايكروليتر من DNase / RNase free water ثم أضيف لهما 2 مايكروليتر من الحامض النووي للسيطرة الموجبة) والسيطرة السالبة المتضمنة (5.5 مايكروليتر من ال premixture مع 6 مايكروليتر من DNase / RNase free water ثم أضيف لهما 2 مايكروليتر من الحامض النووي للسيطرة السالبة) ، بعدها تمت إضافة 11 مايكروليتر من محلول الزيت المعدني الى جميع العينات المحضرة وكذلك السيطرة الموجبة والسالبة وذلك لتجنب تبخر مكونات مزيج التفاعل أثناء إجراء عملية التضخيم في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل Thermocycler الجدول (5) ، علما إن تسلسل القواعد النيوكليوتيدية لل primer هو:

Forword primer : 5-CTA AAA TTA GAG AGC TAT ACT TCT T-3
Reverse primer : 5-CGA TTT CCA TAA ACT AAA AAA GTA-3

الجدول(4) تفاصيل العينات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

نوع العينة	رقمها
دم من حيوان مصاب	1
بلازما من حيوان مصاب	2
العزلة الفيروسية (تمريرة1)	3
العزلة الفيروسية (تمريرة3)	4
العزلة الفيروسية (تمريرة 6)	5
العزلة الفيروسية (تمريرة 9)	6
العزلة الفيروسية (تمريرة 16)	7

الجدول (5) الكميات المطلوبة من مواد مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

الإضافات / المكونات	العينات الفيروسية	السيطرة الموجبة	السيطرة السالبة
Premixture	5.5µl	5.5 µl	5.5 µl
الماء الخالي من DNase / RNase	6 µl	6 µl	6 µl
الحامض النووي المستخلص من العينات	2 µl		
السيطرة الوجبة لفيروس الجدري		2 µl	
السيطرة السالبة لفيروس الجدري			2 µl
محلول الزيت المعدني	11 µl	11 µl	11 µl
المجموع	24.5 µl	24.5 µl	24.5 µl

بعدها وضع مزيج هذه المواد أعلاه في جهاز ال Thermocycler (Master cycler gradient) (Eppendorf) وتم تحديد برنامج عمل الجهاز إعتمادا على بروتوكول الشركة المجهزة له (Bioingentich.Ltd.Chile) كما في الجدول (6) .

الجدول (6) خطوات وبرنامج عمل جهاز الThermocycler حسب بروتوكول الشركة المجهزة (Bioingentich.Ltd.Chile)

دورات تفاعل البلمرة المتسلسل		الحرارة	الوقت
دورة واحدة	Initial Denaturation	94°C	2 دقيقة
30دورة	Denaturation	94°C	30 ثانية
	Annealing	55.5°C	30 ثانية
	Extension	72°C	30 ثانية
دورة واحدة	Final extension	72°C	5 دقائق

3-12-4- الكشف عن نواتج عملية تضخيم الحامض النووي :-

- تم تحضير هلام الأكاروز بتركيز 1.5% وذلك بإذابة 1.5 غم من مسحوق الاكاروز في 100 مل من محلول (TBE Buffer pH8.3) المخفف ، بعدها تم وضعه في جهاز المايكروويف حتى الغليان ولعدة مرات ومن ثم صبه في قالب خاص حاوي على مشط مسنن لإستحداث 10 حفر في هلام الاكاروز ، وترك ليتصلب بعدها سحب المشط من الاكار المتصلب تاركاً حفراً فارغة وجاهزة لوضع نواتج التفاعل الناتجة من جهاز ال Thermocycler
- تم وضع هلام الأكاروز المحضر المتصلب في وعاء خاص حاوي على 300 مل من محلول TE Buffer والذي احتوى بدوره على 7.5 مايكروليتر من ال Ethidium Bromide ومن بعدها تم وضع 7 مايكروليتر من مزيج نواتج التضخيم (العينات) في الحفر 2,3,4,5,6,7,8 وكذلك 7 مايكروليتر من مزيج السيطرة الموجبة والسيطرة السالبة في الحفرتين 10,9 على التوالي ، أما المؤشر marker (100bp) فقد تم وضع 2 مايكروليتر منه في الحفرة 1 (Nagalakshimi , 2008) .

- تم تسليط فرق جهد كهربائي على محلول ال TBE مع ال Ethidium Bromide والحاوي على وسط الأكاروز بواسطة مجهز فولتية خاص ومبرمج بمقدار 100 فولت لمدة 40 دقيقة.
- وأخيرا تم إستخدام جهاز خاص بالأشعة فوق البنفسجية للكشف عن نواتج التضخيم بعد ترحيلها كهربائياً (Hasuksoz *et al* , 2014) .

3-13- طرق تقييم فيروس جدري الأغنام المضعف :-

3-13-1- معيار الجرعة اللقاحية للعزلة الفيروسية (التمريرة السادسة عشر) :- تم أجراء تخافيف عشارية لهذه العزلة بإستخدام محلول الملح الفسيولوجي المعقم (NS)(Normal Saline 0.9%) ابتداءاً من التخفيف 10^{-1} وحتى التخفيف 10^{-6} ، حيث أجريت التخافيف بأستخدام 6 أنابيب إختبار بلاستيكية إحتوى كل منها على 9 مل من محلول الملح الفسيولوجي المعقم ، بعدها أضيف 1 مل من العزلة الفيروسية السادسة عشر الى الانبوب الاول والذي كان يمثل التخفيف 10^{-1} ومن ثم تم نقل 1مل من الانبوب ذو التخفيف 10^{-1} الى الانبوب الثاني ليصبح تخفيفه 10^{-2} وهكذا حتى التخفيف 10^{-6} حيث أهمل اخر 1مل من التخفيف الاخير ، بعدها حقنت هذه التخافيف في أجنة بيض الدواجن المخصبة بعمر 10–12 يوم بطريقة الحقن على الغشاء اللقانقي المشيمي وبواقع 5 بيضات لكل تخفيف (5 مكررات) مع وجود مجموعة سيطرة موجبة محقونة بالعزلة الفيروسية غير المخففة وأخرى سالبة محقونة بمحلول الملح الفسيولوجي المعقم فقط ، بعدها تمت مراقبة العلامات والتغيرات التي ترافق نمو الفيروس وتظهر على الأجنة وتسجيلها من خلال فحصها بجهاز Egg candler ومتابعة هذه العلامات والتغيرات التي ترافق نمو الفيروس وتظهر على ألاجنة بعد فتح البيض المحقون بهذه العزلة ومن ثم تم حساب الجرعة اللقاحية للفيروس بإستخدام معادلة ريد ومنش (Reed and Muench , 1938 ; Abdul Aziz *et al* , 2005).

3-13-2- اختبار درجة تضعيف الفيروس (معايرة الفيروس التمريرة السادسة عشر) في أدمة جلد الأغنام :- تم إتباع الطريقة التي ذكرها (El Zein *et al* , 1983 ; Abbas *et al* , 2007) ، إذ تم إجراء فحص التعادل المصلي لمصل الحيوان المستخدم في هذه التجربة للتأكد من خلوه من الأضداد المعادلة لفيروس جدري الأغنام ، بعدها أزيل الصوف من منطقة الخاصرة

للحيوان ومن كلا الجهتين ، ثم عملت تخافيف عشارية لهذه العزلة بإستخدام محلول الملح الفسيولوجي المعقم (NS) (Normal Saline 0.9%) ابتداءاً من التخفيف 10^{-1} وحتى التخفيف10^{-6} ، حيث أجريت التخافيف بأستخدام 6 أنابيب إختبار بلاستيكية إحتوى كل منها على 9 مل من محلول الملح الفسيولوجي المعقم بعدها أضيف 1 مل من العزلة الفيروسية السادسة عشر الى الانبوب الاول والذي كان يمثل التخفيف 10^{-1} ومن ثم تم نقل 1مل من الانبوب ذو التخفيف 10^{-1} الى الانبوب الثاني ليصبح تخفيفه 10^{-2} وهكذا حتى التخفيف10^{-6} حيث أهمل اخر 1مل من التخفيف الاخير مع وجود انبوبة للسيطرة الموجبة تمثلت بالعزلة الفيروسية غير المخففة (.Conc) (10^{0}) وانبوبة اخرى للسيطرة السالبة تمثلت بمحلول الملح الفسيولوجي المعقم (C-) ، إذ تم حقن كمية 0.1 ml من كل تخفيف وبواقع 5 مكررات في منطقة الخاصرة (أدمة الجلد) في الحيوان نفسه وبشكل عمودي مع وجود حيوان آخر للسيطرة السالبة ، وتم متابعة التجربة لمدة 14 يوماً بعد الحقن (الشكل2,3)، ومن خلال التجربة تم ملاحظة التفاعل الموضعي في مناطق الحقن مع تسجيل درجة حرارة الجسم يومياً ولمدة أسبوعين متتاليين ، بعدها تم حساب الجرعة المحدثة للتفاعل (RD_{50}/0.1 ml) (Reactive Dose) والمعبر عنها بحجم 0.1ml من الفيروس والذي يستطيع إحداث تفاعل موضعي في 50% من مواضع الحقن في جلد الحيوان حسب معادلة (Reed and Menuch , 1938) .

الشكل (2و3) منطقة الخاصرة بعد تحضيرها لمعايرة العزلة الفيروسية (التمريرة 16) في أدمة جلد الاغنام (يمثل العزلة الفيروسية غير المخففة=CONC) (يمثل السيطرة السالبة= C−) (−1= التخفيف 10^{-1}) (−2= التخفيف10^{-2}) (−3= التخفيف10^{-3}) (−4= التخفيف10^{-4}) (−5=التخفيف 10^{-5}) (−6= التخفيف 10^{-6})

3-13-3- اختبار التحدي Challenge test :- تم إستخدام حملان عدد 4 ، حيث تم تلقيح 2 منها تجريبياً بعمر 4-5 أشهر بالعزلة الفيروسية المضعفة (التمريرة السادسة عشر) ($10^{4.49}EID_{50}$/0.1 ml) وبمقدار 0.1 مل وذلك بطريقة الحقن تحت الجلد ، وتم مراقبة الحيوانات المحقونة يومياً من خلال ملاحظة شدة التفاعل الموضعي وقياس درجة الحرارة والأعراض السريرية إن وجدت. وبعد مرور 28 يوماً من التلقيح تم حقن كلا الحيوانين وحيوان السيطرة الموجبة أيضا بالعزلة الفيروسية الضارية (التمريرة السادسة) ($10^{3.5}EID_{50}$/0.1 ml) بكمية 1.5 مل في منطقة الأدمة وفي سبعة مواقع مختلفة من الجسم (العطار،1986) ، مع وجود حيوان واحد للسيطرة السالبة ، بعدها تم مراقبة الحيوانات يومياً ولمدة أسبوعين لملاحظة حرارتها وموضع الحقن علما إن تاريخ الحالة لهذه الحيوانات تم التأكد منه وذلك بعدم وجود تلقيح أو تسجيل لإصابة مسبقة بفيروس جدري الأغنام

3-13-4- إختبار النقاوة Sterility test:- تم فحص نموذج من العزلة الفيروسية المضعفة (التمريرة السادسة عشر) ($10^{4.49}EID_{50}$/0.1ml) للتأكد من خلوها من الملوثات الجرثومية والفطرية وذلك بزرعها على وسط الأكار المغذي وأكار الدم ووسط أكار السبارود الخاص بالفطريات ، وبعد زرع هذه الأوساط بالنموذج المشار إليه حضنت الأطباق بدرجة 37° م في ظروف هوائية وأخرى لاهوائيا ولمدة 48 ساعة ، أما بالنسبة للوسط الخاص بالفطريات فقد حضن بعد الزرع بدرجة 25° م ولمدة 14 يوما (OIE , 2010).

3-13-5- اختبارات الأمان Safety test:-

- اختبار الأمان من إستخدام جرع عالية من العزلة الفيروسية المضعفة (التمريرة السادسة عشرة) ($10^{4.49}EID_{50}$/0.1 ml) :- تم إستخدام العزلة الفيروسية المضعفة وذلك بحقنها بمقدار 1 مل ومن دون تخفيف تحت الجلد وبعدها تم مراقبة موضع التفاعل ودرجة حرارة الحيوان المستخدم ولمدة 14 يوماً بعد الحقن (OIE , 2010).
- اختبار الأمان من إستخدام العزلة الفيروسية المضعفة (التمريرة السادس عشرة) ($10^{4.49}EID_{50}$/0.1 ml) في الإناث الحوامل :- تم إستخدام العزلة أعلاه وذلك بحقنها في الإناث الحوامل عدد 2 عند الشهر الثالث من الحمل بمقدار 0.1 مل تحت الجلد وذلك

للتأكد من عدم إحداثها للإجهاض في هذه الحيوانات مع مراقبة درجة الحرارة والتفاعل الموضعي لمدة 14 يوماً بعد الحقن (OIE,2010).

3-14- معايرة بعض اللقاحات المستخدمة في تلقيح الأغنام في أجنة بيض الدواجن :-

3-14-1- معايرة لقاح جدري الأغنام العراقي :- تم إستخدام عبوتين منفصلتين من لقاح جدري الأغنام العراقي المنتج من شركة الكندي لإنتاج اللقاحات والأدوية البيطرية (كانت العبوة الأولى تحتوي على 100 جرعة لقاحية وتاريخ إنتاجها وإنتهائها 2014/9، 2014/11 على التوالي ، أما الثانية فكانت تحتوي على 50 جرعة لقاحية وتاريخ إنتاجها 2013/5 والإنتهاء 2014/9 مع عدم وجود رقم الوجبة على كلا العبوتين) ، حيث تم تحليل العبوتين بالماء المقطر والمعقم وبكمية 10 و5 مل على التوالي بحيث إن كل 0.1 مل يحتوي على جرعة لقاحية واحدة وفقا لتعليمات الشركة المنتجة.

3-14-2- معايرة لقاح جدري الأغنام الأردني :- تم إستخدام عبوة واحدة من اللقاح المنتج من شركة جوفاك الأردنية والذي سبق أن ذكرت تفاصيله في تحضير المصل عالي التمنيع وبعد إذابة اللقاح بكمية 10 مل من الماء المقطر والمعقم كان محتوى كل 0.1 مل اللقاح هو جرعة لقاحية واحدة

بعدها تم إجراء تخافيف عشارية للعبوات اللقاحية الثلاثة (2 عبوة لقاح عراقي + 1 عبوة لقاح أردني) بإستخدام محلول الملح الفسيولوجي المعقم (Normal Saline 0.9%)(NS) ابتداءاً من التخفيف 10^{-1} وحتى التخفيف 10^{-6} ، حيث أجريت التخافيف بأستخدام 6 أنابيب إختبار بلاستيكية إحتوى كل منها على 9 مل من محلول الملح الفسيولوجي المعقم بعدها أضيف 1 مل من الفيروس اللقاحي الى الانبوب الاول والذي كان يمثل التخفيف 10^{-1} ومن ثم تم نقل 1مل من الانبوب ذو التخفيف 10^{-1} الى الانبوب الثاني ليصبح تخفيفه 10^{-2} وهكذا حتى التخفيف 10^{-6} حيث أهمل اخر 1مل من التخفيف الاخير ، بعدها حقنت هذه التخافيف في أجنة بيض الدواجن المخصبة بعمر 10-12 يوم بطريقة الحقن على الغشاء اللقانقي المشيمي وبواقع 4 بيضات لكل تخفيف (4 مكررات) مع وجود مجموعة سيطرة موجبة محقونة بالعزلة اللقاحية غير المخففة وأخرى سالبة محقونة بمحلول الملح الفسيولوجي المعقم فقط ، حيث أجري

هذا الاختبار بشكل منفرد على كل عبوة لقاحية ، بعدها تم مراقبة العلامات والتغيرات المرضية لمدة 6 ايام بعد الحقن والتي ترافق نمو الفيروس وتظهر على الأجنة وتسجيلها وإهمال أو نبذ الهلاكات التي تحدث في اليوم الاول بعد الحقن ومن ثم تحديد المعيار الحجمي للفيروس المضعف في هذه اللقاحات والمعبر عنه بحجم 0.1 مل والذي يحدث تاثيراً مرضياً في 50% من الأجنة المحقونة (EID_{50}/0.1ml) وذلك حسب معادلة ريد ومنش (Reed and Muench , 1938 ; Nakano, 1979 ; Abdel Aziz *et al* , 2005).

الفصل الرابع

النتائج

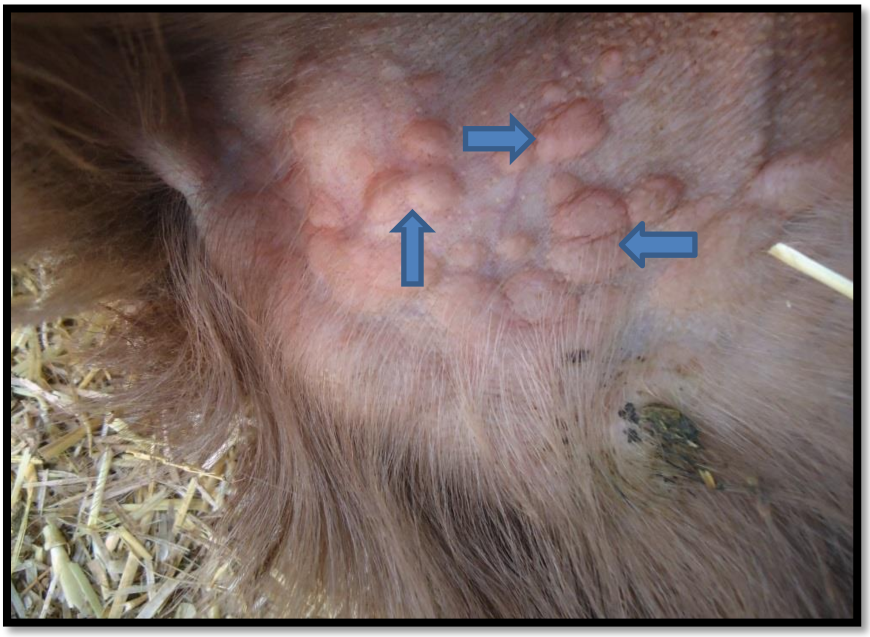
Results

4-1- الآفات العيانية Gross lesions :- تمثلت الآفات العيانية في الحيوانات المصابة طبيعيا بالمرض بوجود عقيدات مميزة لهذا المرض متوزعة على مناطق مختلفة من الجسم وكانت هذه العقيدات منتفخة وبارزة عن جلد الحيوان وذات ملمس صلد وبأشكال وأحجام متفاوتة حيث تراوح حجمها من 5-25 ملم وهي تمثل الشكل العقدي للمرض (الأشكال4و5) ، وكانت أعلى نسبة مئوية للاصابة بالمرض في منطقة دراويش وبلغت 10% ، بينما اقل نسبة لها كانت في قرية بازكرتان (3.2%) . جدول (7)

جدول (7) المناطق التي جمعت منها العينات (26 عينة) وعدد الحيوانات المصابة مع النسبة المئوية للاصابة في هذه المناطق

مناطق جمع العينات	عدد الحيوانات المصابة (عدد العينات)	المجموع الكلي للحيوانات	النسبة المئوية للاصابة
كوكجلي	3	49	%6.1
ترجلة	2	32	%6.25
ابو جربوعة	4	41	%9.75
دراويش	4	40	%10
بازكرتان	2	62	%3.2
ربيعة	6	72	%8.3
منارة شبك	1	28	%3.5
شاقولي	1	20	%5
تل اسود	3	50	%6
المجموع	26 عينة	394	

الشكل (4) آفات عقدية متعددة الشكل والحجم تحت الإبط لحملان بعمر 3-4 اشهر مصابة طبيعيا بمرض الجدري في منطقة ابو جربوعة



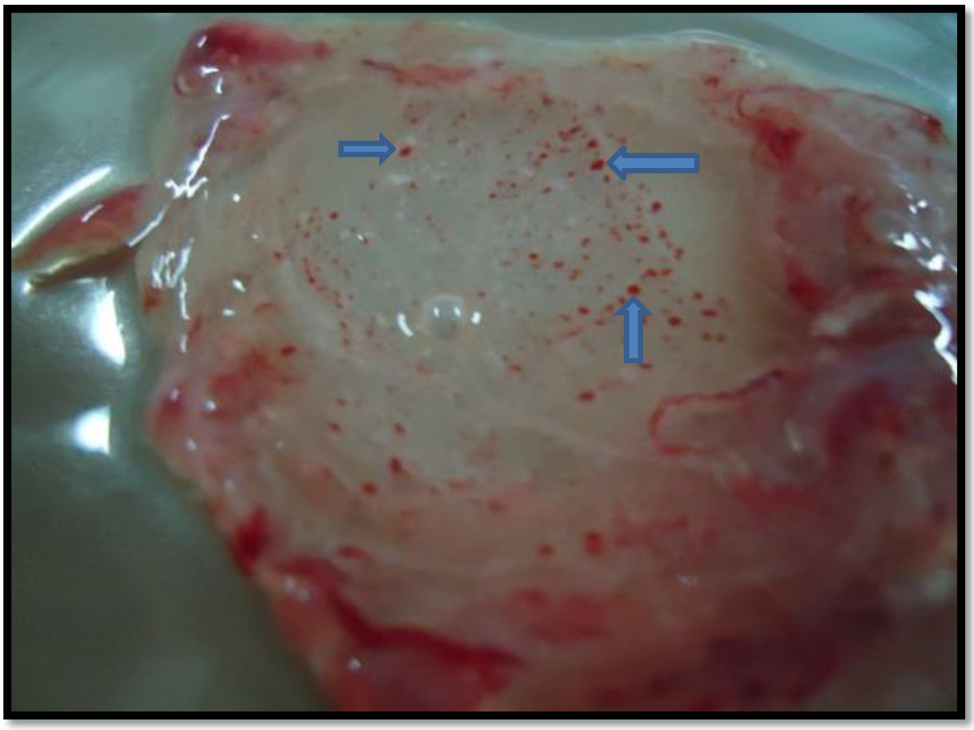
الشكل (5) آفات عقدية متعددة الشكل والحجم لمرض الجدري في منطقة الفخذ لحملان بعمر 3-5 اشهر مصابة طبيعيا بالمرض في منطقة دراويش

4-2- نتائج التمرير التسلسلي الأولي للفيروس الحقلي في أجنة بيض الدواجن :- أظهرت نتائج التمرير الأولي للعينات الحقلية (عدد9) وبواقع ثلاث تمريرات متتالية نموا متفاوتا للفيروس على أجنة بيض الدواجن ، وأظهرت بعض هذه العينات نتائج موجبة تمثلت بتكوين Pock Lesions حمراء اللون ومميزة على الغشاء اللقانقي المشيمي وبكثافة وشدة متفاوتة ، حيث تفاوتت أحجام وشدة الآفات المتكونة بعد الحقن لثلاث عينات فقط اعطت نتائج موجبة للحقن ، لكن أكثرها وضوحا وأشدها كثافة كان مع العزلة الفيروسية الماخوذة من قرية أبو جربوعة (محافظة نينوى) (عينة3) ، ومن بعدها تم إعتماد هذه العزلة وذلك بإخضاعها للتمرير التسلسلي بهدف تضعيفها وتحويلها إلى بذرة لقاحية. جدول (8).

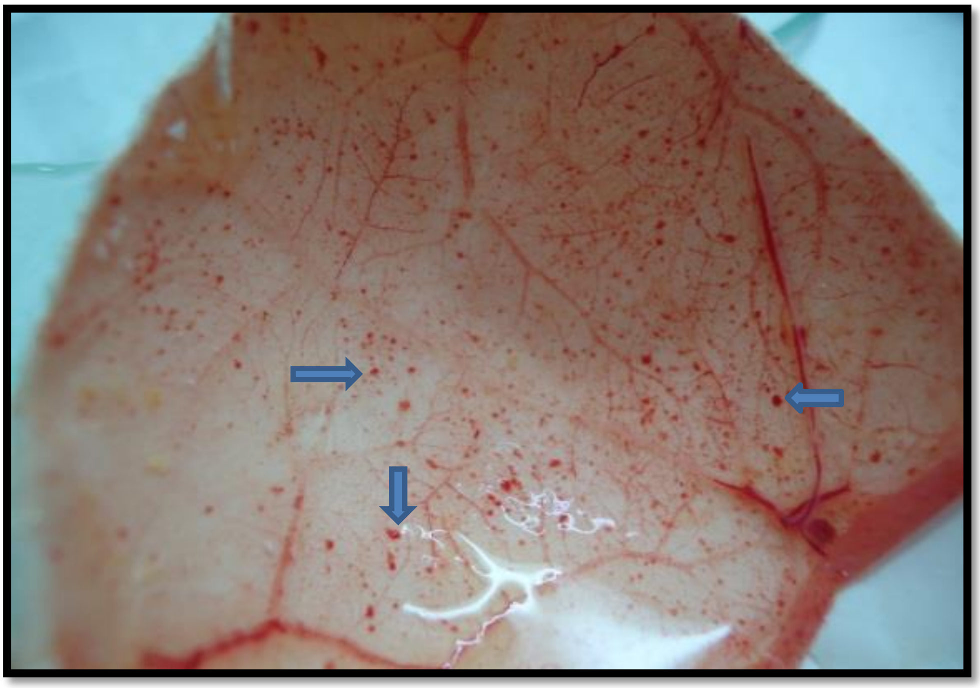
الجدول (8) نتائج التمريرات الثلاثة الأولى للعينات المنتخبة في أجنة بيض الدواجن

	كوكجلي (عينة1)	ترجلة (عينة2)	أبوجربوعة (عينة3)	بازكرتإن (عينة4)	دراويش (عينة5)	ربيعة (عينة6)	شاقولي (عينة7)	منارة شبك (عينة8)	تل اسود (عينة9)
التمريرة 1	-	-	+	-	-	+	-	-	-
التمريرة 2	-	-	++	-	+	+	-	-	-
التمريرة 3	-	-	+++++	-	++	+	-	-	-

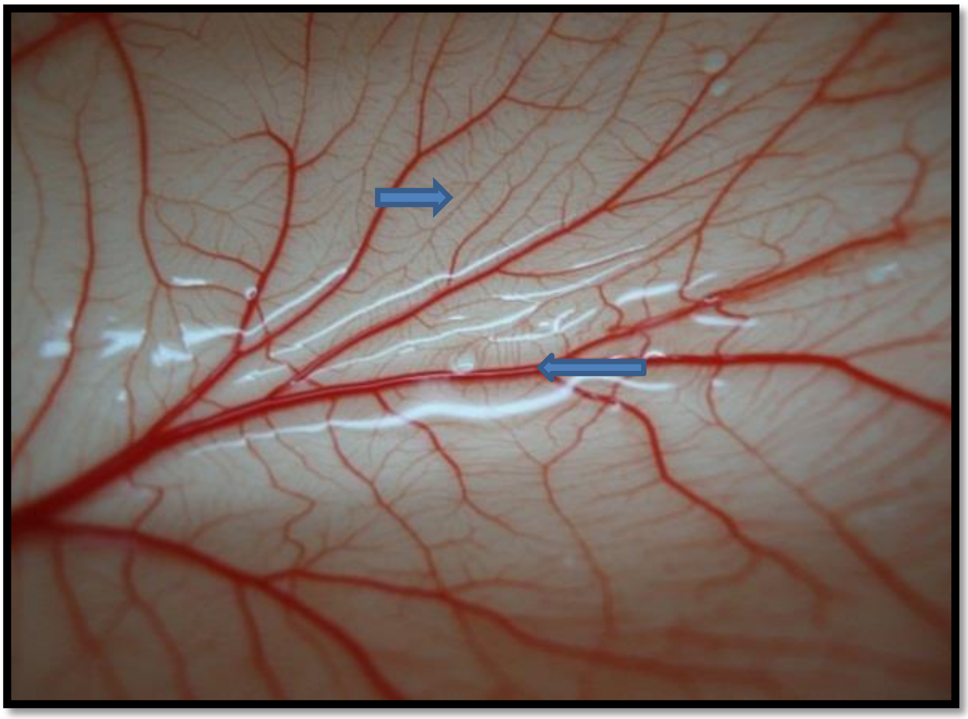
وعندما تم الاستمرار بعمليات التمرير المتسلسل للعزلة الفيروسية رقم (3) (أبو جربوعة) مع ملاحظة شدة الآفات وحجمها وكثافتها وتأثيرها على حيوية الجنين ، إذ أظهرت التمريرة السادسة لهذه العزلة موت الجنين بعد 48 ساعة فقط من الحقن وعدت عزلة ضارية بينما أظهرت التمريرة التاسعة موت الجنين بعد مرور 72-96 ساعة من الحقن مما يشير إلى بداية تضعيفها ، كما استمر التمرير المتسلسل وصولا إلى التمريرة 16 إذ لم يصاحبها موت الجنين بعد الحقن وكانت الآفات عندها أكثر تجانسا من حيث إنتشارها (الأشكال6,7) ، في حين لم تلاحظ اية افات تذكر مع السيطرة السالبة (الشكل8) . ولأجل ذلك تم إخضاع هذه التمريرة من العزلة الفيروسية للاختبارات الأخرى بهدف استخدامها كبذرة لقاحية .



الشكل (6) إنتشار لل pock lesions على الغشاء اللقانقي المشيمي بلون أحمر وبحجم كبير للعزلة الفيروسية رقم 3 (التمريرة3)



الشكل (7) ال pock lesions منتشرة على الغشاء اللقانقي المشيمي وبشكل متجانس للعزلة الفيروسية رقم 3 (التمريرة 16)

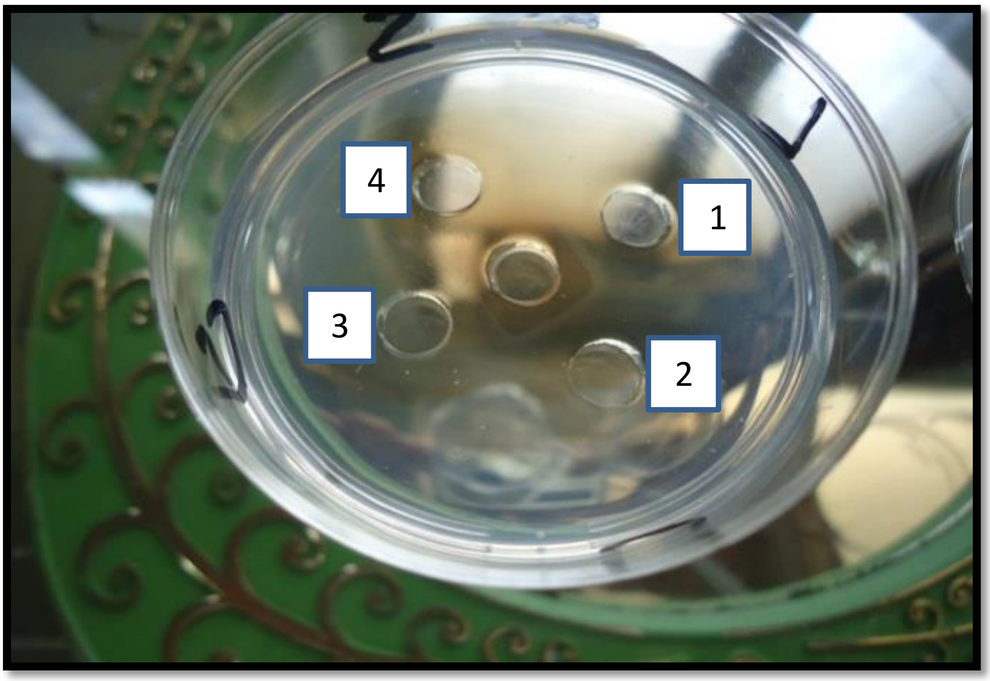


الشكل (8) الغشاء اللقانقي المشيمي لمجموعة السيطرة السالبة والذي يخلو من ال Pock Lesions المحدثة من قبل فيروس الجدري

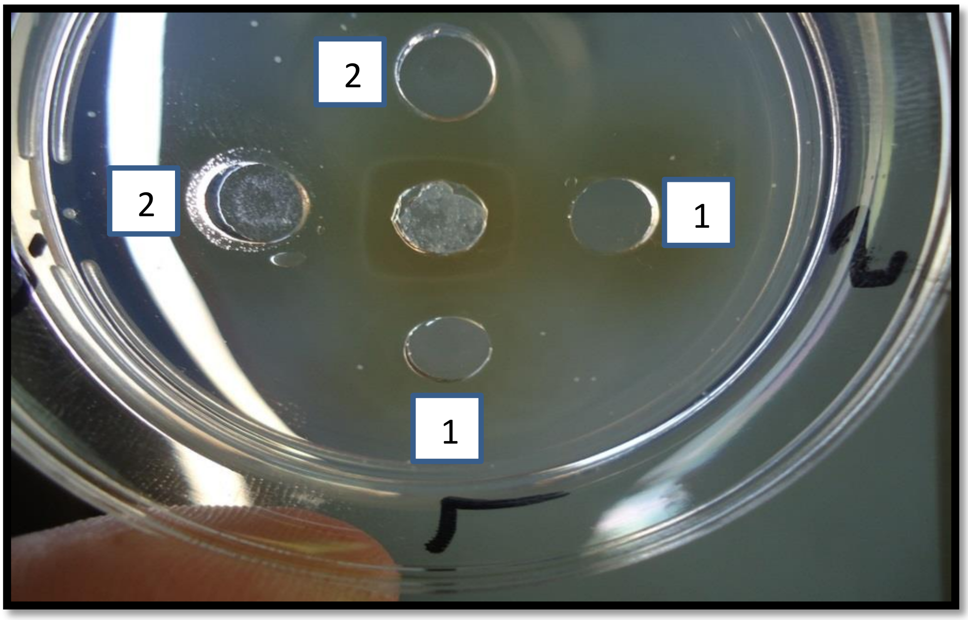
4-3- معيار الجرعة الخمجية للعزلة الفيروسية (التمريرة السادسة) :- كان معيار العزلة الفيروسية لهذه التمريرة ($10^{3.5}$ EID_{50}/0.1 ml) وذلك حسب معادلة (Reed and Meunch , 1938).

4-4- اختبار التلازن الدموي (HA) Hemagglutination test:- لم تظهر العزلة الفيروسية (التمريرة السادسة) أي قدرة على تلزين كريات الدم الحمر المغسولة للأغنام .

4-5- الترسيب المناعي في هلامة الأكار (AGID) Agar Gel Immunodiffussion Test :- أظهرت نتائج هذا الاختبار تكوين خطوط ترسيبية واضحة بين العزلة الفيروسية التمريرة السادسة (الحفرة المركزية) وعينات المصل العالي التمنيع (حفرة 2,1) ومصل السيطرة الموجبة (حفرة3) ، في حين لم يظهر أي خط ترسيبي مع السيطرة السالبة (حفرة4) (الشكل9)، أما نتائج هذا الاختبار باستخدام مكررين من المصول عالية التمنيع (المحضرة مسبقا في الحملان) فقط فتمثلت بظهور الخطوط الترسيبية بين الحفرة المركزية (التمريرة التاسعة) وجميع الحفر المحيطية (الشكل10).



الشكل (9) ظهور الخطوط الترسيبية بين العزلة الفيروسية التمريرة السادسة (الحفرة المركزية) والحفرة (2,1) الحأوية على المصل عالي التمنيع والحفرة (3) الحأوية على المصل الموجب (نعجة ملقحة)، عدم وجود أي خط ترسيبي مع الحفرة الطرفية (4)



الشكل (10) ظهور الخطوط الترسيبية بين الحفرة المركزية (العزلة الفيروسية التمريرة التاسعة) والحفر المحيطية الحاوية جميعها على المصل عالي التمنيع، (رقم 1 يمثل المصل عالي التمنيع من الحيوان رقم1 ، رقم 2 يمثل المصل عالي التمنيع من الحيوان رقم 2)

4-6- الفحص النسجي Histopathological Examination :- بينت المقاطع النسجية للغشاء اللقانقي المشيمي الذي ظهرت عليه Pock lesions وجود أجسام إشتمالية واضحة داخل سايتوبلازم الخلايا المصابة بالفيروس.

4-7- اختبار التعادل المصلي Serum Neuterlisation Test (SNT) :- أوضحت نتائج هذا الاختبار وجوداً للأجسام المضادة المعادلة لفيروس جدري الأغنام في مصل الحيوانين المستخدمين في تجربة تحضير المصل عالي التمنيع إذ كان معيار الأضداد المعادلة للفيروس في المصل لكلا الحيوانين هو1:64 ، في حين ظهرت الآفات المرضية Pock lesions على الأجنة في مجموعة السيطرة الموجبة والمحقونة بالعزلة الفيروسية فقط (التمريرة السادسة) ، بينما لم يلاحظ أية آفات على أجنة السيطرة السالبة والمحقونة بالمصل عالي التمنيع فقط.

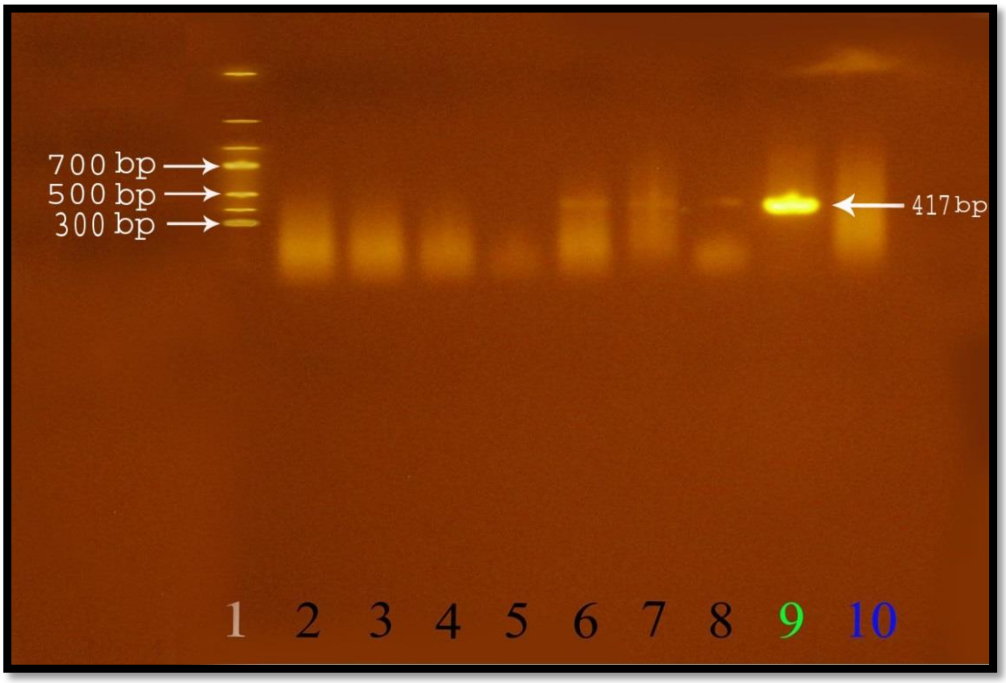
4-8-التشخيص الجزيئي :-

4-8-1- تركيز الحامض النووي (DNA) :- تم قياس نقاوة وتركيز الحامض النووي المستخلص من العينات المختارة وكان اعلى تركيز للحامض النووي مع العينة 7 (التمريرة 16 للعزلة الفيروسية) وبلغ 41 نانوغرام/ مايكروليتر ، بينما اقل تركيز كان مع العينة 2 (بلازما لحيوان مصاب) (4 نانوغرام /مايكروليتر) ، بينما لوحظ هناك تباين في تركيز باقي العينات حسب نوعها . جدول (9).

الجدول (9) تركيز ونقاوة الحامض النووي للعينات المستخدمة في الاستخلاص

العينة	التركيز (نانوغرام/مايكروليتر)	النسبة المئوية للنقاوة %
دم من حيوان مصاب (عينة1)	7	1.7
بلازما من حيوان مصاب (عينة2)	4	1.6
العزلة الفيروسية (تمريرة1) (عينة3)	6	1.8
العزلة الفيروسية (تمريرة3) (عينة4)	19	1.7
العزلة الفيروسية (تمريرة 6) (عينة5)	28	1.7
العزلة الفيروسية (تمريرة 9) (عينة6)	36	1.7
العزلة الفيروسية (تمريرة 16) (عينة7)	41	1.6

4-8-2- تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) :- بينت نتائج هذا الاختبار ظهور حزم ترسيبية مع العينات (7،6،5) والتي تمثل كل من التمريرات (16،9،6) على التوالي ، مع ظهور الحزمة الترسيبية مع السيطرة الموجبة ، بينما لم تظهر أي حزم ترسيبية مع العينات (4،3،2،1) وكذلك السيطرة السالبة (الشكل 11)،



الشكل (11) نتائج اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل ، الممر (1) (Marker) ، الممرات (8،7،6،5،4،3،2) تمثل العينات (6،5،4،3،2،1) ، الممر (9) يمثل السيطرة الموجبة ، الممر (10) يمثل السيطرة السالبة.

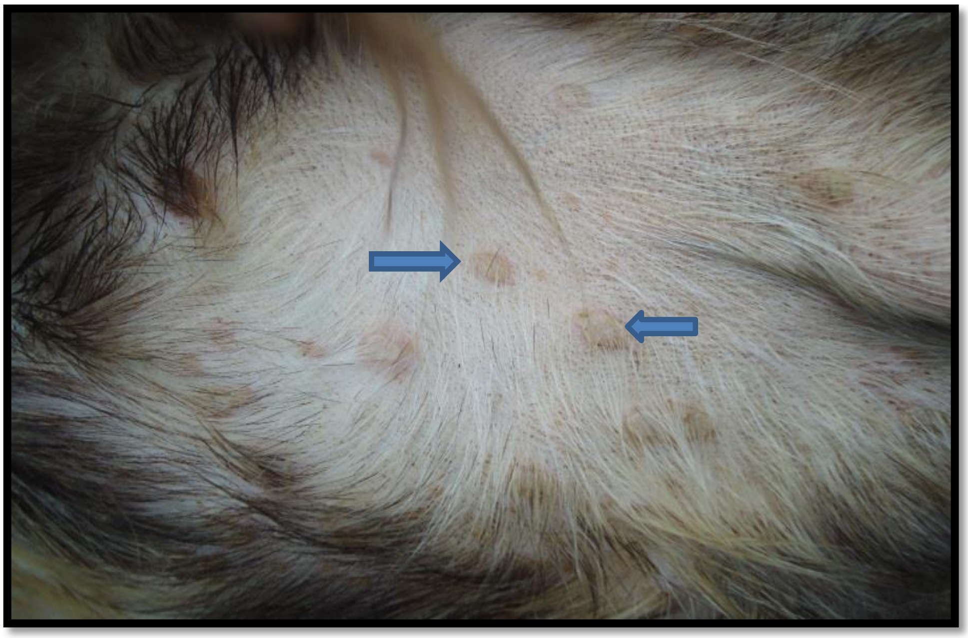
4-9- تقييم فيروس جدري الأغنام المضعف :-

4-9-1- معيار الجرعة اللقاحية للعزلة الفيروسية (التمريرة السادسة عشر) :- تم حساب معيار الجرعة اللقاحية لهذه العزلة بطريقة الحقن في أجنة بيض الدواجن وكان معيارها ($10^{4.49}EID_{50}/0.1$ ml) وذلك لغرض استخدامها في تلقيح الحيوانات.

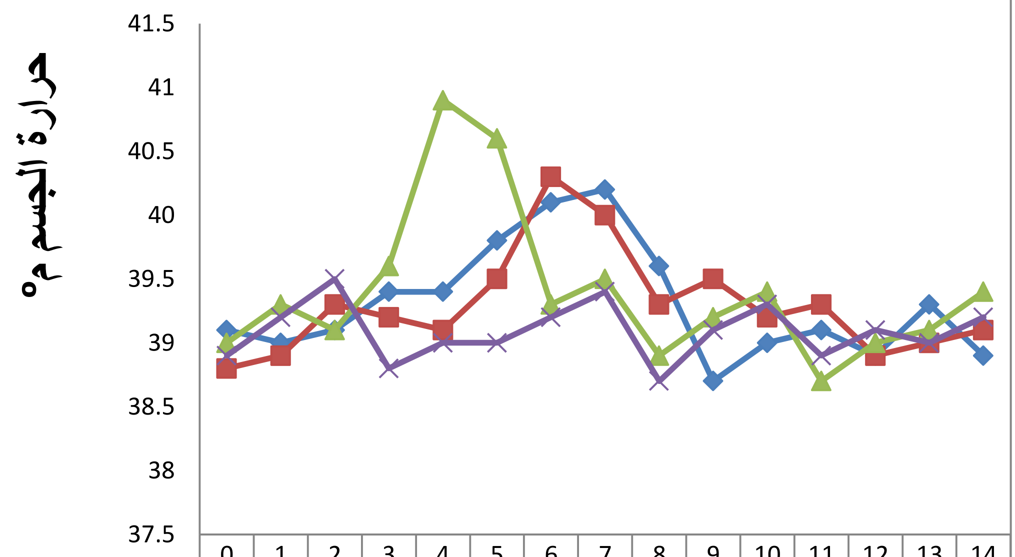
4-9-2- اختبار درجة تضعيف العزلة الفيروسية (المعايرة في أدمة الجلد):- أظهرت العزلة الفيروسية الناتجة من التمريرة السادسة عشر ($10^{4.49}EID_{50}/0.1$ ml) تفاعلاً موضعياً بسيطاً في اليوم الثالث من الحقن على شكل عقد جلدية صغيرة تراوحت قطرها بين 0.75-1 سم في

جميع تخافيف الفيروس التي أعطت نتيجة موجبة ، وتطورت هذه العقد بعد ثلاثة أيام لتصبح بثوراً إذ كان هنالك تباين في تطور العقد إلى بثور وبصورة طردية مع تخافيف العزلة الفيروسية ، كما لم يظهر على جسم الحيوان المحقون أية آفات تذكر في مواقع أخرى سوى موضع الحقن فقط وكذلك لم يلاحظ ظهور لعلامات سريرية تذكر سوى ارتفاع طفيف بدرجة حرارة الجسم (39.9°م) مقارنة بحيوان السيطرة السالبة (39.1°م) وكان معيار الفيروس في أدمة الجلد ($10^{4.49}$ EID_{50}/0.1 ml) وذلك باستخدام معادلة (Reed and Muench ,1938). إن نتائج هذا الاختبار المتمثلة بمعدل الارتفاع بدرجة حرارة جسم الحيوان وحجم وطبيعة التفاعل الموضعي تشير إلى ضعف ضراوة الفيروس عند هذا التمرير وإمكانية اعتماده والاستفادة منه كلقاح حي مضعف لجدري الأغنام إذ أن هذه النتائج تبعها اختبارات أخرى للتاكد من درجة تضعيف الفيروس وكفاءته المناعية وخاصية الأمان له.

4-9-3- اختبار التحدي Challenge test:- بينت نتائج هذا الاختبار بأن نسبة الحماية بهذه العزلة كانت 100% وذلك بعد حقن الحيوانين الملقحين (ملقح + تحدي) بجرعة التحدي (التمريرة السادسة) وبكمية ($10^{3.5}$ EID_{50}/0.1 ml) بطريقة الحقن تحت الجلد وذلك بعد مرور 28 يوماً من التلقيح بالعزلة الفيروسية المضعفة (التمريرة السادسة عشرة) ($10^{4.49}$ EID_{50}/0.1 ml) . إذ أظهر الحيوانان ارتفاعا طفيفا في حرارة الجسم بلغت 40.1 م و 40.3م على التوالي وذلك بعد مرور 6 أيام من جرعة التحدي واستمر هذا الارتفاع ليومين متتاليين فقط مع إنتفاخ واحمرار بسيط لموضع الحقن ، ثم بدأت بالانخفاض في الايام اللاحقة. أما حيوان السيطرة الموجبة (غير ملقح + تحدي) فقد ظهرت عليه الآفات المرضية بعد مرور 5 أيام من الحقن بفيروس التحدي وتمثلت بظهور الحويصلات في مناطق أخرى غير مناطق الحقن (الشكل12) والتي تطورت فيما بعد إلى بثور ومن ثم القشور مع ارتفاع واضح في درجة الحرارة لتصل إلى 40.9 م صاحبها فقدان في الشهية مع تدمع العينين وخمول الحيوان ، في حين كانت درجة الحرارة في حيوان السيطرة السالبة (غير ملقح وبدون تحدي) ضمن الحدود الطبيعية لها في الاغنام (الشكل13).



الشكل (12) افات مرض الجدري تحت الابط في حيوان السيطرة الموجبة (غير ملقح + تحدي) في اختبار التحدي



	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ملقح+تحدي1	39.1	39	39.1	39.4	39.4	39.8	40.1	40.2	39.6	38.7	39	39.1	38.9	39.3	38.9
ملقح+تحدي2	38.8	38.9	39.3	39.2	39.1	39.5	40.3	40	39.3	39.5	39.2	39.3	38.9	39	39.1
غير ملقح+تحدي	39	39.3	39.1	39.6	40.9	40.6	39.3	39.5	38.9	39.2	39.4	38.7	39	39.1	39.4
غير ملقح وبدون تحدي	38.9	39.2	39.5	38.8	39	39	39.2	39.4	38.7	39.1	39.3	38.9	39.1	39	39.2

العمر بالايام بعد الحقن

الشكل (13) مخطط لدرجات الحرارة للحيوانات الاربعة المستخدمة في اختبار التحدي

4-9-4- اختبار النقاوة :- لم تظهر نتائج الفحص الجرثومي والفطري على الأوساط الزرعية الخاصة بكل منهما (فحص النقاوة) أي تلوث بكتري أو فطري يذكر للعزلة الفيروسية التي تم اختبارها.

5-9-4- اختبارات الأمان للعزلة الفيروسية المضعفة :-

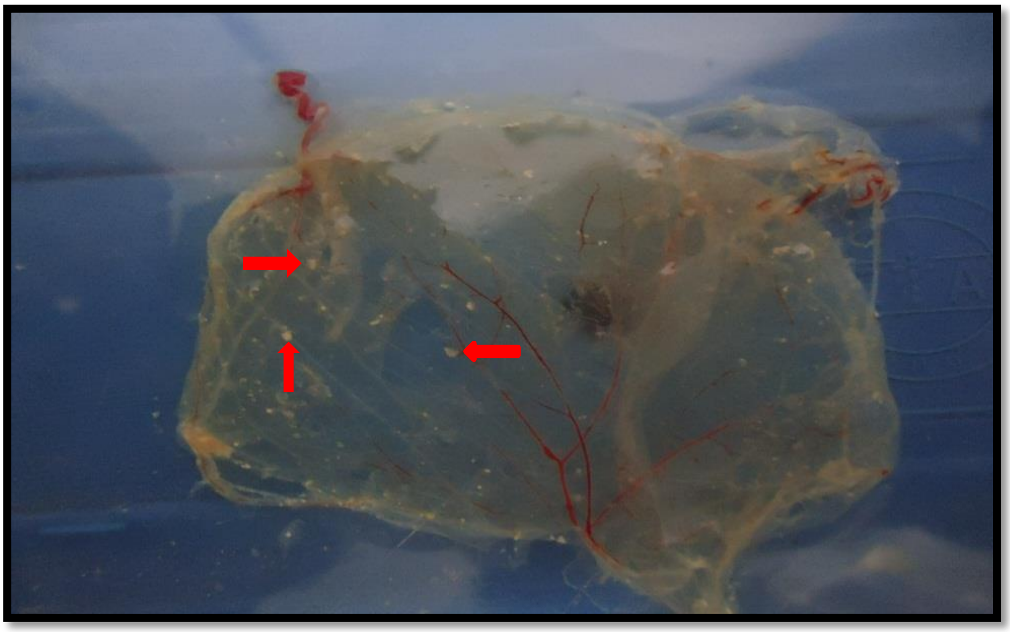
1-5-9-4- من استخدام جرع عالية :- أظهر الحيوان المحقون بهذا الاختبار مقاومة للعزلة الفيروسية المضعفة بتركيز ($10^{4.49}$ EID_{50}/0.1 ml) ومن دون حدوث أي علامات أو آفات مرضية لكن رافقها حدوث تفاعل بسيط في موضع الحقن مع ارتفاع طفيف في درجة حرارة الجسم.

2-5-9-4- الأمان في الإناث الحوامل :- لم يكن هنالك أي حالة إجهاض في إناث الأغنام الحوامل المستخدمة في هذا الاختبار ، والتي تم حقنها بالعزلة الفيروسية المضعفة بتركيز ($10^{4.49}$ EID_{50}/0.1 ml) ومن دون حدوث أي علامات أو أعراض مرضية تذكر.

10-4-معايرة اللقاحات في أجنة بيض الدواجن

1-10-4-معيار اللقاح العراقي في أجنة بيض الدواجن :- لم تظهر أي من العبوتين المستخدمتين في التحري عن معيار المستضد الفيروسي اللقاحي فيهما عن تكون أو ظهور لل Pock lesions على الغشاء اللقانقي المشيمي لاجنة البيض المحقونة ، في حين لوحظ وجود نزف وتثخن وإحتقان فقط على هذا الغشاء.

2-10-4- معيار اللقاح الأردني في أجنة بيض الدواجن :- كان معيار هذا اللقاح عند حقنه في أجنة البيض ($10^{2.77}$$EID_{50}$/0.1 ml) وذلك من خلال ملاحظة ال Pock lesions البيض إلى رمادية اللون على الغشاء اللقانقي المشيمي للاجنة المحقونة.(الشكل14).



الشكل (14) ظهور ال pock lesions بلون أبيض- رمادي صغيرة الحجم ومنتشرة بصورة عشوائية على الغشاء اللقانقي المشيمي والمحدثة بواسطة المستضد اللقاحي الأردني

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

يعد جدري الأغنام من الأمراض الفيروسية المعدية والمتوطنة في العراق ويؤدي المرض إلى أضرار فادحة في قطعان الأغنام نتيجة لإحداثه لحالات الإجهاض في الإناث الحوامل ونقصان في إنتاج الحليب مع تضرر الصوف والجلد للحيوانات المصابة وصنف المرض من قبل منظمة الصحة العالمية (OIE , 2000) بأنه من الأمراض الخطيرة الذي تنتج عنه مشكلات كبيرة ، كما إن عملية التلقيح والتقليل من تأثير الإجهاد على الأغنام أثناء النقل يعدان جزءاً من إجراءات السيطرة وذلك للتقليل من الخسائر الناتجة من الإصابة بالمرض (Irland and Binepal ,1998) وأن الوقاية من الإصابة بالمرض ربما تكون صعبة نوعا ما كون هذا الفيروس يبقى حياً في صوف الحيوانات المصابة مسبقا ولعدة أشهر فضلا عن مقاومة الفيروس للظروف البيئية (Garner *et al* ,2000 ; Mohamad Ali *et al* , 2004).

إن عملية السيطرة والقضاء على هذا المرض تعتمد على التشخيص الدقيق باستخدام الفحوصات السريعة والحساسة فضلا عن إجراء عمليات التلقيح في المناطق الموبوءة به ، وقد تطورت في السنوات الأخيرة تقنيات التشخيص الجزيئي في تشخيص الأمراض المعدية ومن ضمنها تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل والتي أستخدمت بنجاح في تشخيص هذا المرض وذلك لإعتماد هذه التقنية على تضخيم الجين المشفر لإنتاج المستضد الفيروسي P32 والذي يمثل البروتين التركيبي المتواجد في جميع فيروسات جدري الأغنام والذي بدوره يشفر لمعظم المستضدات السطحية للفيروس (Chand *et al* , 1994 ; Irland and Binepal , 1998 ; Heine *et al* , 1999).

لقد كان ظهور الشكل العقدي للمرض في محافظة نينوى واضحاً من خلال تكوين العقيدات الجلدية المميزة والواصمة ولاجل ذلك يجب التعمق في دراسة هذا الشكل من المرض لشحة الدراسات عنه وهو يتوافق مع ماذكره (Zro *et al* , 2014) ، فضلاً عن إحتمالية كون

العزلة الفيروسية المسببة لهذا الشكل من المرض تختلف في خواصها البايلوجية والجينية ومستضديتها وأمراضيتها عن العترات اللقاحية التقليدية وهو مطابق لما ذكره (Haegeman *et al,* 2015) وذلك عندما ذكر بأن هناك اختلافات في التركيب الوراثي و (phylogenetic analysis) بين العزلة الحقلية والعترة اللقاحية المغربية .

إن النمو المتفاوت لعزلات فيروس جدري الأغنام عند تمريرها بشكل تسلسلي على أجنة بيض الدواجن يعود إلى صفات تلك العزلات الفيروسية وطبيعتها من الناحية البايلوجية وهو ما أشار اليه (العبيدي ، 1978، البارودي 2009) ومطابق لما ذكروه من عدم إمكانية نمو بعض من تلك العزلات على الغشاء اللقانقي المشيمي لأجنة البيض المخصب ، كما أكد (Davies , 1976 ; Agag *et al* ,1997) بعدم نمو فيروس الجدري على أجنة البيض ولستة تمريرات متتالية وأن نسبة قليلة فقط من فيروسات الجدري يمكنها أن تنمو على هذا الغشاء . إن حدوث مايسمى بالتمريرات العمياء (Blind Passages) عند حقن الفيروس على الأوساط الحية بالرغم من كون هذه الأوساط حساسة له يعود إلى الصعوبة في عزل هذا الفيروس (Sadri and Fullahi , 2010) ، فضلا عن نموه البطئ وحاجته لتمريرات متعددة لإتمام عملية العزل ومن ثم التضعيف ، كما أن جمع العينات في غير وقت الجمع الصحيح أو عدم نقلها بصورة جيدة ومبردة للمختبر ربما يؤدي إلى نتيجة سلبية كاذبة في عملية عزل وتشخيص الفيروس (Varshovi *et al* , 2009).

إن نمو هذا النوع من الفيروسات على الأغشية يأتي من كونها أوساطاً مفضلة لنمو هكذا نوع من الفيروسات ومنها الغشاء اللقانقي المشيمي لأجنة البيض وينتج من نموها مايسمى ب Pock lesions وهذا ما ظهر عند تنمية العزلة الفيروسية قيد الدراسة ومطابق لما ذكره (البارودي ، 2009) إذ كان لون هذه الآفات لدى الباحث في أعلاه عند ظهورها رصاصية إلى بيضاء اللون وبحجم 0.3 ml لكن الآفات الناتجة من العزلة الفيروسية قيد الدراسة كانت ذات لون أحمر مميز وبأحجام متفاوتة وربما يعود ذلك إلى طبيعة هذه العزلة ومستضديتها وخواصها البايلوجية كما وقد يعود اللون الأحمر فيها إلى النزف المصاحب لها عند نموها على هذا الغشاء وهذا ما يعزز ايضاً كون العزلة قيد الدراسة جديدة ومختلفة عن العزلات التقليدية من الناحية البايلوجية ، وكانت نتائج اختبار التلازن الدموي مخالفة لما ذكره (Pandey *et al* ,

1969) من قدرة فيروس الجدري على تلزين كريات الدم الحمر للأغنام بمعيار 16:1، في حين لم تظهر العزلة الفيروسية أعلاه أي قدرة على تلزين هذه الكريات وقد يعود ذلك إلى الخواص المستضدية لهذه العزلة او ربما الى التركيز القليل من الجزيئات الفيروسية في السائل المستخدم والواجب توفرها بتركيز عالي لاحداث خاصية التلازن.

إن نتائج اختبار الإنتشار المناعي في هلامة الأكار التي ظهرت بشكل خطوط ترسيبية يعود إلى إنتشار كل من المستضد والأضداد المتخصصة له أحدهما باتجاه الآخر ليكونا هذه الخطوط الترسيبية الواضحة والمتميزة (Kitching *et al* , 1986) ، وكانت نتيجة تكاثر الفيروس على الغشاء اللقانقي المشيمي هو ظهور أجسام إشتمالية واضحة في سايتوبلازم الخلايا المصابة نتيجة لتضاعف الحامض النووي الفيروسي بعد دخوله إلى الخلية وتكوين البروتينات التركيبية المهمة وبالتالي تجميع الجزيئات الفيروسية الكاملة في سايتوبلازم تلك الخلايا (Terrinha *et al* , 1965 ; OIE ; 2000) ، أما في اختبار التعادل المصلي فقد كان معيار الأضداد المعادلة للفيروس مرتفعاً وذلك بسبب الجرع المنشطة والمتتالية التي تم استخدامها في تحضير المصل عالي التمنيع وهو مطابق لما ذكره (Soad *et al* , 1996) عندما استخدم هذا النوع من المصل في اختباري الإنتشار المناعي في هلامة الأكار والتعادل المصلي ، كما أن هذا الاختبار متخصص في تحديد الحيوانات التي تمتلك مستوى منخفض من الأضداد المعادلة للفيروس (Bhanuprakash *et al* , 2006) ، كما أن استخدام هذا الاختبار هو طريقة مطولة وتقليدية في التشخيص وتحتاج لفترة غير قصيرة من الوقت (Varshovi *et al* , 2009).

إن السبب في استخدام العدة التشخيصية في هذه الدراسة لإستخلاص الحامض النووي للمستضد الفيروسي يعود لحاجة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل إلى طريقة يمكن من خلالها الحصول على الحامض النووي للفيروس بنقاوة عالية بالرغم من وجود عدة طرق لإتمام عملية الاستخلاص (Mangana *et al* , 2000) لكن إستخدام العدة التشخيصية يعود لكونها الطريقة المثلى للاستخلاص مقارنة بالطرق القديمة الأخرى كاستخدام المواد الكيمياوية أو الغلي (Nagalakshimi , 2008).

تعد تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction) من أفضل التقنيات التشخيصية مقارنة بالطرق التشخيصية الأخرى لما تمتاز به هذه التقنية من حساسية وسهولة وسرعة وتخصصية (Mangana *et al* , 2000) ، فضلا عن الوقت المستهلك في استخدام الطرق التقليدية في التشخيص ومنها العزل الفيروسي والاختبارات المصلية (Oguzoglu *et al* , 2006) وحتى الحديثة منها والمتمثلة بتقنية الاليزا المعتمدة على إصطياد المستضد الفيروسي Ag-Trapping ELISA وكذلك وجود تفاعل تصالبي بين فيروس جدري الأغنام والأورف لذا كانت هنالك حاجة لإستخدام هذه التقنية لتأكيد الإصابة بهذا المرض دون غيره (Carn *et al*, 1994) ، ومن نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل والتي أوضحت بأن العينات (2,1) (دم وبلازما) لم تظهر لها نتائج موجبة في هذا الاختبار وذلك نتيجة لحالة الViremia القليلة أو الضعيفة في دم الحيوانات المصابة وعدت عينات الدم غير ملائمة نسبيا في تشخيص فيروس الجدري بهذه التقنية وهذا يتفق مع ما ذكره (Zro *et al* ,2014) ، كما أن العينات (4,3) والتي تمثل التمريرة الأولى والثالثة على التوالي لم تظهر كذلك نتائج موجبة لهذه التقنية وربما يعود السبب في ذلك إلى قلة تركيز الحامض النووي في هذه العينات ، في حين كانت النتائج إيجابية مع العينات (7,6,5) وذلك لوجود تركيز لابأس به من الحامض النووي الفيروسي في العينة .(Hasuksoz *et al* , 2014).

إن معيار العزلة الفيروسية (التمريرة السادسة عشر) كان ($10^{4.49}EID_{50}/0.1ml$) وتم حسابه اعتماداً على الآفات الظاهرة في منطقة الخاصرة والمتكونة تدريجيا اعتماداً على تركيز الفيروس المحقون إذ يعد الجلد المكان الحساس والمفضل لنمو هذا الفيروس (Target organ) ، واستمرت الآفات في تطورها إلى أن أصبحت قشوراً وسقطت فيما بعد تاركة ندباً بعد مايقارب 30 يوماً وهو مطابق لما ذكره (Abbas *et al* , 2007) ، ومن النتائج في أعلاه فإن التغير في الخواص المستضدية والمناعية والأمراضية للعزلة الفيروسية قيد الدراسة يطابق ماذكره الباحث (Davies and Mbugwa , 1985) عندما وجدوا بأن العترة الكينية المسببة لجدري الأغنام فقدت خواصها المرضية واحتفظت بخواصها الاستضدادية عند التمريرات 20-15 واستخدموا التمريرة ال18 بنجاح في عمليات السيطرة على المرض في الظروف الحقلية ، ومن نتائج الباحث (Kitching *et al* ,1986) خلال دراسته للعترة الفيروسية 0240

الخاصة بمرض جدري الأغنام التي لاحظ من خلالها بأن تمرير هذه العترة لمرتين متتاليتين فقط على خلايا الزرع النسيجي في خصى الحملان وحقنها في أدمة الجلد لكل من الأغنام والماعز الإنكليزية الحساسة للمرض تسببت بظهور الآفة فقط في موضع الحقن ولم يصاحبها ارتفاع كبير في حرارة الجسم للحيوانات المحقونة وأن ثلاث تمريرات أخرى متتالية لهذه العترة في نفس خلايا الزرع النسيجي أدت الى حدوث تفاعل بسيط – متوسط وأعطت بعدها حماية للأغنام والماعز من جرعة التحدي بالفيروس الضاري وطورت فيما بعد إلى لقاح ضد مرض جدري الأغنام والماعز (أي 5 تمريرات فقط أدت إلى تضعيف الفيروس) ، أما بالنسبة لتضعيف العترة المصرية فقد حدث عند التمريرة 27 في خلايا الزرع النسيجي المحضرة من خصى الحملان لإنتاج لقاح محلي مضعف ضد المرض (Samir *et al* , 2002) ، في حين إستمر تضعيف إحدى العزلات الفيروسية حتى التمريرة 90 في أجنة بيض الدواجن ومن بعدها تم استخدامها كلقاح ضد المرض (Yuan *et al* , 1957) ، وكانت التمريرة ال 25 كافية لتضعيف عزلة فيروسية أخرى على أجنة بيض الدواجن وتحضير لقاح حي مضعف منها (Borisivich *et al* , 1966). ومن مقارنة نتائج هذه الدراسة مع نتائج الدراسات السابقة حول عدد التمريرات المستخدمة لتضعيف الفيروس يتضح بأن عدد التمريرات المتكررة التي يخضع لها الفيروس يعتمد اعتماداً رئيسياً على العزلة الفيروسية من حيث ضراوتها وأمراضيتها وخواصها المستضدية ونوع الوسط المستخدم في تضعيفها (Tageldin *et al* , 2004 ; Bhanuprakash *et al* , 2006) ، إن سبب فقدان العزلة الفيروسية لفوعتها يعود إلى شطب أو إزاحة لواحد أو عدد من الجينات المسماة ب Klech –Like genes والمسؤولة عن فوعة وأمراضية فيروس الجدري وتكاثره حيث تؤثر بدورها على حجم الآفات المتكونة وشكلها وإرتشاح الخلايا الالتهابية وفوعة الفيروس وكذلك تاثيرها على طبيعة نمو الفيروس على الغشاء اللقانقي المشيمي (Kochenva *et al* , 2005) ، في حين لم تتم دراسة الدور المنفرد لهذه الجينات في فوعة فيروس الجدري بشكل كامل حتى الآن (Balinsky *et al*, 2007) .

إن الحماية المتكونة من حقن العزلة المضعفة في الحيوان المعرض لاختبار التحدي نتيجة لتكون الأضداد المعادلة للفيروس الضاري كانت قادرة على حماية الحيوان من جرعة التحدي وهذا اتفق مع (Carn , 1995) . أما ظهور الآفات المرضية في حيوان السيطرة

الموجبة (غير ملقح + تحدي) لاختبار التحدي فيعود إلى أمراضية الفيروس المتمثل باحتوائه على المستضد الفيروسي P32 الذي يشفر للبروتين التركيبي الحاوي على معظم المحددات المستضدية للفيروس وهو مهم جداً لإمراضية الفيروس (Chand *et al* , 1994) ، وكان الارتفاع في حرارة الجسم لحيوان السيطرة الموجبة تدريجيا وبلغت 40.9 م (Mahmood *et al* , 1989) ويعود ذلك لتكاثر الفيروس في جسم الحيوان وإحداث حالة ال Viremia بغض النظر عن شدتها ، أما الارتفاع السريع والطفيف في حرارة جسم الحيوان الملقح فيعود إلى وجود الأضداد المعادلة للفيروس الخمجي وتمكنها من معادلته بسرعة مع سرعة الوصول إلى حالة التوازن (Equilibirium zone) بين هذه الأضداد والفيروس (Nour *et al* , 2012) ، كما ويشير الباحث (Chaudhary *et al* , 2009) بإن الأغنام الملقحة ضد المرض التي تعطى جرعة التحدي سوف تستقبل فيروس التحدي هذا بمثابة الجرعة المنشطة.

وهدفت الدراسة الحالية إلى تحضير لقاح حي مضعف مطابق Homologous تماما للعزلة المحلية إذ يكون هذا النوع من اللقاحات أكثر فعالية وكفاءة وله خاصية الأمان في الإناث الحوامل وذلك للتأكد من عدم احداثه للاجهاض فيها ، فضلا عن حماية المواليد الحديثة ولثلاثة أشهر بعد الولادة وهو نفس ما ذكر (Scientific opinion on sheep and goat pox , EFSA , 2014) إذ تمت الإشارة إلى أن اللقاحات الأخرى تعطي حماية بنسبة 75% فقط ، كما أن هذا النوع من اللقاحات يكون مفضلا على اللقاح المقتول لأن المناعة الناتجة عنه ليست طويلة الأمد ويمكن استخدامه أحيانا كلقاح لحالات الطوارئ في المناطق غير الموبوءة كبديل للقاح المضعف ، وفيما يخص اختبارات النقاوة والأمان فهي ضرورية جدا للتاكد من خاصية الأمان للفيروس وخلوه من الملوثات الفطرية والجرثومية التي لها تاثيرات سلبية في حال استخدامه في عمليات التلقيح وهذا ما ذكره (Samir *et al* , 2002). وأخيرا ومن نتائج حقن ومعايرة كل من اللقاح العراقي والأردني المضعفين فلم يظهر اللقاح العراقي أية آفات واضحة على الغشاء اللقانقي بل كان هناك نزف وتثخن فقط وهو مطابق لما ذكره (Tawfik *et al* , 2001) وقد يعود هذا ربما إلى تحطم المستضد الفيروسي في اللقاح أو سوء عملية حفظ اللقاح أو قلة تركيز الفيروس في عبوة اللقاح وهذا يؤكد ما ذكره (Hunter and Walace ,

2001) ، في حين أظهر اللقاح الأردني آفات واضحة على الغشاء اللقانقي المشيمي وذلك نتيجة لتكاثر الفيروس عليه وتكوينه لهذه الآفات التي ظهرت بلون أبيض – رمادي.

الإستنتاجات

1- إن فيروس جدري الأغنام المعزول في هذه الدراسة يمكن إستخدامه كلقاح لحماية الأغنام ضد مرض الجدري وذلك بعد أن تم تضعيفه عند التمريرة السادسة عشرة في أجنة بيض الدواجن.

2- تم إثبات كفاءة اللقاح المحضر وأمانه من خلال هذه الدراسة على نطاق مختبري وتجريبي وذلك من خلال الفحوصات المناعية واختبار التحدي.

3- ظهور pock lesions حمراء ناتجة عن نمو الفيروس على الغشاء اللقانقي المشيمي لأجنة بيض الدواجن وهي خاصية نادرة الظهور وربما يعود ذلك لكون العزلة المسببة للشكل العقدي للمرض ذات خواص مستضدية تختلف عن العزلات التقليدية الأخرى.

4- إن استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل يعد ضرورياً جداً في تشخيص فيروس جدري الأغنام.

التوصيات

1- العمل مستقبلا على إنتاج لقاح محضر من فيروس جدري الأغنام بعد إجراء تغيرات وراثية عليه في الKlech-Like genes وهي الجينات المسوؤلة عن فوعة الفيروس بطريقة الهندسة الوراثية (Recombinant vaccine) وهو ماتتجه إليه البحوث الحديثة وإمكانية إستخدامه تجريبياً.

2- إستخدام العزلة اللقاحية المحلية المحضرة خلال هذه الدراسة في تلقيح الأغنام على نطاق حقلي وتجريبي والتأكد من كفاءته وخاصية الأمان له لغرض تعميمه كلقاح ضد مرض جدري الأغنام على مستوى القطر.

3- إستخدام تقنية ال DNA sequencing لغرض معرفة العترة العراقية جينياً مع تحديد الجينات المسوؤلة عن إمراضية الفيروس ودراستها بصورة موسعة للتعرف على دورها في إمراضيته ومقارنتها مع الفيروسات الاخرى محلياً وعالمياً .

4- العمل على إنتاج لقاحات مختلطة لأكثر من مرض واحد ومنها جدري الأغنام مع طاعون المجترات الصغيرة ، فقد أثبتت هذه اللقاحات جدوتها الأقتصادية وأهميتها البايولوجية كونها أمينة وهو ما تسعى إليه الدول المتقدمة لأستخدامها في حيواناتها.

5- إجراء دراسة وراثية للخريطة الجينية للعزلة الفيروسية أعلاه ومقارنتها بالخرائط الوراثية للعترات اللقاحية قيد الإستعمال.

References المصادر

المصادرالعربية:

الباروردي، صفوان يوسف. (2009).عزل وأمراضية فايروس جدري الأغنام في محافظة نينوى. المؤتمر العلمي الخامس ، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل ،مجلد 23 عدد اضافي: 26-21

الجليلي، محمود.(1978). المعجم الطبي الموحد إنكليزي- عربي ، الطبعة الثإنية – مطبعة المجمع العلمي العراقي.

العبيدي ، هيفاء مزهر مهدي .دراسة حول عزل وتوصيف فيروس جدري الأغنام في العراق .(1978). رسالة ماجستير . كلية الطب البيطري . جامعة بغداد.

العطار، مزاحم ياسين خليل .(1986).دراسة تحضيرية لإنتاج لقاح جدري الماعز من العترة المحلية .رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد

المصادر الاجنبية:

Abbas, M.A.; Mukhtar, M.M.;Elhussein, A.M.; Tageldin, A.M.N. and Fadol,M.A.(2007). Immune response of sheep vaccinated with capripox.Medwell J. Vet. Res.,1(1):12-16.

Abdul Aziz, S.; Abu-EL-Saad , Ahmed, S. and Abdel-Moneim.(2005). Modulation of macrophage functions by sheep pox virus provides clues to understand interaction of the virus with host immune system. Virol. J.2: pp 22.

Abdul Sajid.(2010).Isolation , Characterization and pathogenesis of capripox.Thesis of doctorate in pathology . University of Veterinary and Animal Science . Lahore . Pakistan.

Achour, H.A. and Bouguedour, R.(1999). Epidemiology of sheep pox in Algeria. Revue Scientifique et technique-offi. Int. des. Epiz.18(3):606–17.

Achour, H.A.; Bouguedour, R.; Bouhbal, A.; Guechtouli, A. and Aouissat, M.(2000). Comparative study of the immunizing ability of some attenuated strains of sheep pox virus and of a sensitizing vaccine. Rev. Sci. Tech.,19(3):773–83.

Agag, B.I.; Dawlat, m.; Amin, H.M.;Mosa, S.A. and Nariman , M.R. (1997).Sheep pox infection among finish landrace lambs.4 th Sci. Cong.,Egyptian Society of cattle diseases,7-9 Dec. Assiut , Egypt.

Al-Shabebi , A.; El-Sabagh, I.; Abu-Elzein, E.; Zaghwa, A.; AL-Naeem,A. and Housawi, F.(2014).Molecular detection and phylogenetic analysis of sheep pox virus in Al-Hasa of eastern province of Saudia Arabia.Advance in ani. and Vet. Sci., 2(25):31-34.

Amitha, R.G.; Raveendra, H.; Byregowda , S.M.; Vijayashra, V.; Yeshwant, S.L.; Giridhar,P. and Renukaprasad, C.(2010).Evaluation of humoral immune response to sheep pox vaccine.Tamilnadu J. Vet. and ani. sci.,6(5):236-238.

Anandan, R.; Sundara Rajan, S. and Ramani, K.(1976). Further studies on adaptation of sheep poxvirus in sheep thyroid and sheep kidney monolayers. Ind. Vet. J.,53:577–81.

Arik, F. and Kurtul, Y.(1973). Sheep poxvirus production by Borrel's method in various breeds of sheep and its titration. Pendik Vet. Kontr. Arastirma Enst Dergi ., 6:79–90.

Aruni, A.W.; Jayapal, G. and Kathirchelvan, M. (2001). Report on combined out break of blue tongue and sheep pox in Sivagangai distinct." Ind. Vet. J., 78 (1): 1-3.

Asagba, M.O. and Nawathe, D.R.(1981). Evidence of sheep pox in Nigeria. Trop. Ani. H. Prod., 13:1:61.

Babiuk, S.; Bowden, T.R.; Boyle, D.B.; Wallance, D.B. and Kitching, R.P. (2008). Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. Transbound. Emerg. Dis. 55:263-272.

Babiuk, S.; Wallace,D.B.; Smith,S.J.; Bowden,T.R.; Dalman,B.; Parkyn,G.; Copps,J. and Boyle,D.B. (2009). Detection of antibodies against Capri poxviruses using an inactivated sheep pox virus ELISA. Transbound. Emerg. Dis., 56: 132-141.

Balinsky, C.A.; Delhon, G.; Smoliga, G.; Prarat, M.; French, R.A.; Geary, S.J.; Rock , D.L. and Rodriguez, L.L. (2008). Rapid preclinical detection of sheep pox virus by a real-time PCR assay. J. Clin. Microbiol., 46: 438–442.

Balinsky, C. A.; Gustavo, A.; Delhon , L. ; Afonso, G. R.; Risatti, M. V.; Borca, R. A.; French,E. R. ;Tulman, S. J. ; Geary, D. L. and Rock (2007). Sheeppox Virus Kelch-Like Gene SPPV-019 Affects Virus Virulence. J. of Virol., : Pp. 11392–11401.

Berhe, G.; Minet, C.; Le goff,C.; Barrett, T.; Ngangnou, A.; Grillet, C.; Libeau, G.; Fliming, M.; Black, D.N. and Diallo, A. (2003). Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petitsruminants virus and capripoxvirus infections. *J. Virol.*, **77**: 1571–1577.

Bhanuprakash,V.(2001). Epidemiology of sheep pox infection in Karnataka, the analysis of viral protein profiles of field and vaccine strains and evaluation of live attenuated vaccines. PhD Thesis. Uni. Agri. Sci, Bangalore, Karnataka, India.

Bhanuprakash, V.; Indrani , B.K.; Hosamani, M. and Singh,R.K. (2006). The current status of sheep pox disease. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.,29:27–60.

Bhanuprakash, V.; Indrani ,B.K.; Moorthy, A.R.S. and Krishnappa, G.(2003). Isolation, purification and comparison of protein profiles of sheep poxviruses. Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.,24(1):15–20.

Bhanuprakash, V.; Indrani, B.K.; Hegde, R.; Kumar, M.M. and Moorthy A.R.S.(2004). A classical live attenuated vaccine for sheep pox. Trop. Ani. Health Prod.,36(4):307–20.

Bhanuprakash, V.; Moorthy, A.R.S.; Krishnappa,G.; Srinivasagowda, R.N. and Indrani,B.K.(2005). An epidemiological study of sheep pox in Karnataka state, Révue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties)., 24: 909–920.

Bhanuprakash, V.; Hosamani, M.; Venkatesan, G.; Balamurugan, V.; Yogisharadhya, R. and Singh, R.K. (2012). Animal poxvirus vaccines: A comprehensive review, 11 (11): 1355-74.

Bhatnagar, A.and Gupta B.M.(1974). Affinity of sheep poxvirus (SP8 strain for heterologus system). Curr. Sci.,43:254–5.

Borisovich, Yu.F.; Koval, G.L.; Bagmet, L.G. and Pal'gov, A.A.(1966). Chick embryo sheep pox vaccine. Trudy Nauchno Kontrol Inst. Vet. Preparatov.; 13:29–30.

Bowden, T.R.; Babiuk, S.L.; Parkyn, G.R.; Copps, J.S. and Boyle, D.B. (2007). Capri pox virus tissue tropism and shedding: A quantitative study in Experimentally infected sheep and goats. Virol., Nov 5, 11: 512-516.

Bowden, T. R.; Babiuk, S. L.; Parkyn, G. R.; Copps, J. S. and Boyle, D. B. (2008). Capripoxvirus tissue tropism and shedding: a quantitative study in experimentally infected sheep and goats. Virol. 37, 1: 380– 393.

Buller, R. M.; Arif, B. M.; Black, D. N.; Dumbell, K. R.; Esposito, J. J.; Lefkowitz, E. J.; McFadden, G.; Moss, B.; Mercer, A. A. and other authors .(2005). Family Poxviridae. In Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 117–133. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. San Diego: Elsevier Academic Press .

Carn,V. M. (1993). Control of capripox virus infections. Vacc.,11:1275-1279.

Carn, V.M.(1995). An antigenic trapping ELISA for the detection of capripox virus in tissue culture supernatant and biopsy samples. J. Virol. Meth.; 51:95–102.

Carn, V.M.; Kitching, R.P.; Hammond, J.M. and Chand, P.(1994).Use of a recombinant antigen in an indirect ELISA for detecting bovine antibody to capripox virus. J. Virol. Meth.,49:285–94.

Celliker, A. and Arik, F.(1962). Aluminium hydroxide-adsorbed sheep pox virus vaccine. Br. Vet. J.,118:159–61.

Chand, P.; Kitching, R.P. and Black, D.N.(1994). Evaluation of the Western blot analysis of virus-specific antibody responses to capripox and contagious pustular dermatitis infections in sheep. Epidemiol. Infect. [Cited by Carn, V.M., 1994].

Chanie, M. (2011). Clinical and histopathological study of sheep pox in Ethiopia. Inter. J. of Nat. Sci., 1: 89–92.

Chaudhary, S.S.; Pandey, K.D.; Singh, R.P.; Verma, P.C. and Gupta, P.K. (2009). A Vero cell derived combined vaccine against sheep pox and Peste des petits ruminants for sheep Vaccine., 27:2548-2553

Chu, Y.; Yan, X.; Gao, P.; Zhao, P.; He, Y.; Liu,J. and Lu,Z. (2011). Molecular detection of a mixed infection of goatpox virus, orf virus, and Mycoplasma capricolum subsp. Capripneumoniae in goats.J. of Vet. Diag. Inves.,23:786– 789.

Contingency plan for dealing with outbreaks of Sheep and goat pox in the Netherland .(2015).in accordance with Article 20 of directive 92/119/EEC. The criteria posted in Annex IV were used as guidance. Animal Supply Chain and Animal Welfare Department Ministry of Economic Affairs The Hague, the Netherlands .(19 March 2015).

Daoud, J.A.H.(1997). Sheep pox among Australian sheep in Jordan. Trop. Ani. Health Prod.,29(4):251–2.

Dar, L.M.;Darzi, M.M.; Mir , M.S.; Kamil, S.A.; Rashid, A.;Abdullah, S.;Hussain, S.A. and Bhat, A.A.(2012).Sheep pox virus induced interstitial pneumonia in sheep.Int.J.of livestock Res.2(2):159-164.

Davies, F.G. and Mbugwa G. (1985). The alterations in pathogenicity and immunogenicity of a Kenya sheep and goat pox virus on serial passage in bovine foetal muscle cell cultures. J. Comp. Pathol., 95: 565–576.

Davies, F. G.(1976).Characteristics of a virus causing a pox disease of sheep and goats in Kenya, with observations on the epidemiology and control. J. of Hyg., 76:163–171

Davies, F.G.(1981).Sheep and Goat pox. In Virus diseases of Food Animals. Vol 2., E.P.J. Gibbs ed., London:Academic Press, pp. 733-748.

Davies, F.G. and Otema,C.(1981). Relationship of capripox viruses found in Kenya with two Middle Eastern strains and some orthopox viruses. Res. of Vet. Sci., 31:2:253–255.

De Clercq, K. and Goris,N. (2004). Extending the foot-and-mouth disease module to the control of other diseases. Dev. Biol. (Basel). 119: 333–340.

Debnath, J.C.; Mallick, B.B. and Das, S.K.(1992) .Enhanced production of antibody with sheep poxvirus specific antigen.Indian J. Exp. Biol., 30(2):73–6.

Diallo, A. and Viljoen, G.J.(2007). Genus Capripoxvirus, p. 167–181. In A. A.Mercer, A. Schmidt, and O. Weber (ed.) Poxviruses. Birkhauser, Basel,Switzerland.

Domenech, J.; Lubroth, j.; Eddi ,C.; Martin,V. and Roger, F.(2006). Regional and international approaches on prevention and control of animal transboundary and emerging diseases. Ann. NY Acad. Sci. 1081: 90–107.

Elshafie, I.E and Ali A.S.(2008).Participatory epizootiological approaches and sero-prevalence of sheep pox in selected localities in kassala state,Sudan.a saudan J.Vet.Res.23:47-57.

El-Zein, A.; Nehme, S. and Singh, K.V. (1983). Preparation and testing of a goat pox vaccine from a pathogenic field isolate attenuated in cell culture. Zentralblatt fur Veterinarmedizin., 30: 341-348.

Garner, M.G.; Sawarkar,S.D.; Brett,E.K.; Edwards,J.R. ; Kulkarni,V.B.; Boyle and,D.B. and Singh,S.N.(2000). The extent and impact of sheep pox and goat pox in the state of Maharashtra, India. Trop. Ani. H. Prod., 32:4:205–223.

Gulbahar, M. Y.; Davis,W.C.; Yuksel,H. and Cabalar,M. (2006). Immunohistochemical Evaluation of Inflammatory Infiltrate in the Skin and Lung of Lambs Naturally Infected with Sheeppox Virus. Vet. Pathol. 43:67-75.

Gurel, A.(1979). Studies on the pathogenesis of experimental sheep pox by fluorescent antibody technique and histopathology. Pendik. Vet. Mikrobil. Enst. Derg., 11(2):54–69.

Haegeman, A.; Zro, k.; Sammin, D.;Vandenbussche, F.;Ennaji, M.M. and De Clerq,K. (2015).Investigation of a possible link between vaccination and 2010 sheep pox epizootic in Morocco.Black well verlag GmBH.{Cited by /doi/10.1111./tbed.12342/citedby).

Hasuksoz, M.; Gulyaz, V. and Sarac,F.(2014).Molecular characterization of sheep pox virus strain. J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ..,40(1):95-102.

Heine, H.G.; Stevens, M.P.; Foord, A.J. and Boyle, D.B.(1999). A capripox virus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32 the homolog of the vaccinia virus H3L gene. J. Immunol. Meth.; 227:187–96.

Hosamani, M.; Mondal, B.; Tembhurne, A.P.; Bandyopadhyay, K.S.; Singh, K.R. and Rasool, J.T. (2004). Differentiation of sheep pox and goat poxviruses by sequence analysis and PCR –RFLP of P32 gene. Virus Genes., 29:73-80.

Hunter, P. and Wallace, D.(2001). Lumpy skin disease in southern Africa: a review of the disease and aspects of control. J. South Afr. Vet. Assoc., 72: 68–71.

Hussein, M.; El-Sadi, H.I; Zangana, I.K. ; El-Attar, M.Y. and Al-Bana,A.S.(1989). Clinical, pathological and virological studies on goat pox in Mosul, Iraq. Vet. Med. J. Giza., 37: 65–76.

ICTV, 2006. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/

ICTV.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/58140001 .htm,2002.

Ireland, D.C. and Binepal, Y.C.(1998). Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. J. Virol. Meth., 74:1–7.

Kalpana, G.(1993). Evaluation of immunity conferred by Kenyan strain of capripox virus against goatpox infection and the antigenic relationship between the two viruses. MVSc Thesis. Uni. Agric. Sci., Bangalore, Karnataka, India.

King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J.(2012). Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses. In: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Press. Oxford, UK., pp. 291-297.

Kitching ,R.P.; McGrans, J.J. and Taylor, W.P.(1986). Capripox in the yemen arab republic and the sultanate of oman. Trop. Anim. Health Prod .,18(2):115–22.

Kitching R.P.(2003) .Vaccines for lumpyskin disease, sheep pox and goat pox. Dev. Biol.,114:161–7.

Kitching, R. P. and Carn, V. M. (2004). Sheep pox and goat pox. In Office International des Epizooties Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees) pp. 211–220. OIE, Paris. l. (Basel).

Kitching, R.P. and Taylor, W.P.(1985). Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goat pox viruses. Trop. Ani. Health and Prod., 17: 64-74.

Kitching, R.P.(2004). Sheep pox and goatpox. In:Coetzer, J.A.W.,Tustin,R.C. (Eds.), Infectious Diseases of Livestock. Oxford University Press, pp. 1277–1281.

Kitching, R.P.; Bhat, P.P. and Black, D.N.(1989). Molecular characterization of African strains of Capri poxvirus.Epidemiol. Infect.,102(2):335–43.

Kochneva, G.; Kolosova,I.; Maksyutova, T.; Ryabchikova and I. Shchelkunov,S. (2005). Effects of deletions of kelch-like genes on cowpox virus biological properties. Arch. Virol. 150:1857–1870.

Koylu ,A. and Nanda, S.M. (1970).The cultivation of sheep poxvirus on sheep embryo skin cells. Pandik Vet Kont Arastirma Enstit Derg ., 3:88–99.

Lennett, E. H. and Schmidt, N. J.(1979). Diagnostic Procedures for: Viral , Rickettsial and Chlamydial Infections, 5th Edn. American Public Health Association, Inc.USA Pp. 65-114.

Luna, L.G. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed forces, Institute of Pathology, 3rd edition NEWYORK, Mc Graw Hill Book Company

Mahmood, M. A.; A. Sajid, M.; Ahmad, Z.; Hassni, M.S. and Khan. (1989). Preparation of live goat pox tissue culture vaccine. Pakistan. J.Vet.Res.,2:31-37.

Mangana-Vougiouka, O.; Markoulatos, P.; Kaptopoulos, G.; Nonikou, K.; Bakandritososos, N. and Papadopulos, P. (2000). Sheep pox virus identification from clinical specimens by PCR, cell culture, immuno fluorescence and agar gel immuno precipitation assay." Mol. Cell. Probes 2000 Oct., 14 (5): 305-310.

Mangana-Vougiouka, O.; Markoulatos, P.; Koptopoulos, G.; Nomikou, K.; Bakandritsos,N. and Papadopoulos, O. (1999). Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures. J. of Virol. Meth., 77: 75-79.

Mariner, J. C.; House, J.A.; Wilson,T.M.; van den Ende, M. and Diallo, I. (1991).Isolation of sheep pox virus from a lamb in Niger. Trop. Ani. Health Prod., 23: 27–28.

Mathews , R.E.(1982).Classification and nomenclature of viruses. Inter.virol., 17: 1–99.

Mellor, P.S.; Kitching, and R.P.Wilkinson,P.G. (1987). Mechanical transmission of capripox virus and African swine fever virus by Stomoxys calcitrans. Res. in Vet. Sci., 43:1:109–112.

Mohammed Ali, S.; Hamad,M.E.; Ali, B.H. and Ali, A.S. (2004). Alterations in some epide-miological patterns and virus heterogene-ity recently observed in sheeppox outbreaks in the Sudan. Veterinarski. Arhiv., 74: 341–350.

Moss, B. (2006). Poxvirus entry and membrane fusion. Virol. 344:48–54.

Moss, B.(1996). Poxviridae: the viruses and their replication. In: Fundamental Virology, ed. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, and Roizman B, 3rd ed., pp. 1163– 1197. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996.

Nagalakshimi, B. (2008). Moleculer detection of sheep pox virus by polymerase chain reaction.project report for award the degree of Bachelor Technology . SRM University , Kattankulathur,India.

Nairn, R.C.(1969).Fluorescent protein tracing .E&S.living stone Ltd.Edinburgh and London.

Nakano, J.H. (1979). Pox viruses. In E.H. Lennette, N.J. Schindt (Eds.), Diagnostic Procedures for viral, Rickettesial and Chlamydial infections. American public health association,Washington, DC, PP,257-308.

Nour, T.A.M.; Fadol , M.A.; Ahmad, A.M.; Yougob, I.A. and Elhussein, A.M.(2012).Studies on humoral immune response of sheep to sheep thermostable vaccine. Sudan J.Vet. Res., 26 (1):7-12.

Oguzoglu, T.C.; Alkan, F.; Ozkul, A.; Atalay- Vural, S.; Gungor, A.B. and Burgu, I. (2006). A sheeppox virus outbreak in Central Turkey in 2003: Isolation and Identification of Capripoxovis. Vet. Res. Comm., 30: 965-971.

OIE, (2000). Manual of standards for diagnostic tests and vaccines.http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/ancien_manuel/A_0003. htm.

OIE. Terrestrial Manual (2004). Sheep pox and goat pox.Chapter 2.7.14.

OIE. (2008) . Manual of Recommended Diagnostic Techniques and Requirements for Biological Products, vol. 2, 6th Ed. OIE, Paris.

OIE. (2009) . World organization for Animal Health Chapter 2.7.14. Sheep pox and Goat pox. In Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th Ed. OIE, Paris : 1058-1068.

OIE . (2010) .World Organization for Animal Health. Sheep pox and goat pox. In: Manual of di-agnostic tests and vaccines for terrestrial animals.OIE,Paris,France.http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_stan-dards/ tahm/2.07.14_S_POX_G_POX.pdf. 1-12 (May 2010, date last accessed).

Pandey, A.K.; Malik, B.S. and Bansal, M.P.(1969). Studies on sheep pox virus. I. Adaptation and propagation of the virus in cell culture. Indian Vet. J.,46:925–9.

Pandey, R. and Singh, I.P. (1972) .Soluble antigens of sheep pox and goat viruses as determined by immunodiffusion in agar gel. Acta Virol., 16:41-46.

Parimal, R., Purushothaman , V.; Sreekumar ,C.;Tamizharasan, S. and Andrew Chandramohan. (2008). Sheep pox disease outbreaks in Madras Red and Mechery breeds of indigenous sheep in Tamilnadu, India. Res. in Vet. Sci., 85:617–621.

Pawaiya, R.V.S; Bhagwan, P.S.K. and Dubey, S.C. (2008). Histopathological study of goat pox in a natural outbreak The Indian J. of Small Ruminants ., Year. Pp : 117-121.

Plowright, W.and Ferris, R.D.(1958). The growth and cytopathogenicity of sheep pox virus in tissue culture. J. Exp. Pathol., 38:424–35.

Precausta, P.; Kota, F. and Vellut, G.(1979). A new freeze-dried living virus vaccine against sheep pox. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.,1(4):305–19.

Rafyi, A. and Ramyar, H.(1959). Goat pox in Iran. Serial passages in goats and the developing egg and relationship with sheep pox. J. Comp. Pathol .,69:141–7.

Rai, A.; Goel, A.C.; Pandey, K.D.; Mishra, S.C. and Gupta, B.K.(1986). Immunogenicity of a virion polypeptide of sheep poxvirus in sheep. Indian J. Virol., 2(1):11–15.

Rai, A.; Singh, U.S.; Goel, A.C.; Pandey, K.D.; Mishra, S.C. and Gupta B.K.(1985). Characterization of an immunogenic viral protein of sheep poxvirus. Indian J. Virol., 1(2):120–6.

Ramesh, K.G.(1980). Immunological studies on the Ranipet strain of sheep poxvirus propagated in lamb testes cell culture. MVSc Thesis. Uni. Agric. Sci. Bangalore, Karnataka, India .

Ramisse, J.; Asso, J.; Hassan, A.; Anane, O. and Jemli, J.(1978). Cell culture of sheep pox virus: application to vaccine production and testing of immunity. Revue d'Elevage-et-de-Med Vet des pays-Trop.,31:11–19.

Ramyar, H. and Hessami, M.(1967).Development of an attenuated live virus vaccine against sheep pox .Zentralblatt fur. Vet. Med. 14B:516–9.

Rao T.V.; Negi,B.S. and Bansal, M.P. (1996) . Isolation and characterization of soluble antigens of sheep poxvirus. Indian J. of exp. biol., 35: 597-602

Rao, B.T.; Das, H.J.; Sharma, R.D. and Singh, S.S. (1994).Some observations on an outbreak of sheep pox in sheep in East Godavari District, Andhra Pradesh. Livest. Advisor.XIX(X):3–6.

Rao, T.V.S.; Negi, B.S. and Bansal, M.P.(1997a): Isolation and characterization of soluble antigens of sheep poxvirus. Indian J. Exp. Biol. 35:597-602.

Rao, T.V.S.; Negi,B.S. and Bansal , M.P. (1997b). Use of purified soluble antigens of sheep poxvirus in serodiagnosis. Indian J. of Ani. Sci., 67:8:642–645.

Rao, V.D.P. and Chandra, R.(1986). Standardization of single radial hemolysis test for the detection of sheep pox antibodies. Indian J.Vet. Med ., 6(2):138.

Red'Ko, A.S.(1945). Convalescent serum for control of sheep pox in lambs. Vet. Moscow.,1:21.

Reed, L. J. and Muench, H. (1938). Simple method of estimating 50% end points. Amer. J. Hyg., 27: 493-497.

Romanenko, V.F.(1961). Propagation and cytopathic action of sheep poxvirus in tissue culture. Trudy Vseso Inst. Eksp. noi Vet., 27:51–6.

Roth, J.A. and Spickler, A.R. (2003). A survey of vaccines produced for OIE list A diseases in OIE member countries. Dev. Biol. (Basel) 114: 5–25.

Ravozzo, G.C. and Burke, C.N. (1973). Manual of basic virological technique. New Jersey: Prentice-Hall Inc, Engleewood Cliffs., p 139.

Rweyemamu, M.; Paskin,R.; Benkirane,A.; Martin,V.; Roeder, P. and Wojciechowski,P. (2000). Emerging diseases of Africa and the Middle East. Ann. NY Acad. Sci., 916: 61–70.

Sadri, R. and Fullahi, R.(2010).A new approach to develop a vaccine against capripox infection in sheep and goats using a new strain of sheep pox virus in Iran. Int.J.Vet.Res., 4(4):221-224.

Sadri, R.; Masoudi, S.; Kagar, R.; Khedmati, K.; Varshovi, H. and Haghigi, S.(2002).Asingle radial haemolysis technique for rapid diagnosis of goat pox disease. Arch. Razi.ins.,54:93-99.

Samir, S.S.; Olfat, E.N; Award M.; Micheal, A. and Daoud , A.M. (2002).Production of attenuated sheep pox vaccine from Egyptian strain.6th Vet. Med. Zag. conference (7-9 Sept.).Hurghada.

Sapre, M.V. and Kalia, O.P.(1980) .Incidence of sheep pox outbreak in Rajasthan. Auto-vaccination on large scale. Wool Woolens India. 17., (3):38–40.

Sarkar, P.; Singh. S.P.; Pandey, A.K.; Kathuria, B.K. and Kumar, S.(1980) . Application of fluorescent antibody terchnique in the diagnosis of sheep pox and study of sheep poxvirus multiplication in cell culture. Indian J. Ani. Sci., 50(5):428–33.

Scientific opinion on sheep and goat pox . (2014). Europian Food Safety Authority (EFSA) Journal.,12 (11):3885.

Senthilkumar, V.; Thirunavukkarasu, M. and Kathiravan, G. (2006). Survival time in sheep affected by sheep pox and enterotoxaemia. J. of Ani. and Vet. Adv., 5: 647–650.

Sharma S.N. and Dhanda, M.R.(1972).Studies on sheep and goat poxviruses: pathogenicity. Indian J. Ani. Health .,11:39–46.

Sharma, A. and Sharma, K.N.(1990). Application of SRID and microELISA for the detection of sheep pox vaccination response in crossbred lambs. Indian J. Virol., 6(1–2):80–2.

Sheikh–Ali, M. A.; Hamad, M. E.; Ali, B. H. and Saeed, A. W. (2004). Vet. Arhiv ., 74 (5) :341–350 .

Singari, N.A.; Moorthy, A.S. and Rama Rao, P. (1990).Sheep pox. Livest. Adviser.,15(3):40–2.

Singh, A.K. (1983). Agglutination methods. In Talwar GP (Ed.): A Handbook of Practical Immunology. Vikas Publishing House Pvt Ltd, New Delhi, pp. 139 - 149.

Singh, I.P.; Pandey, R. and Srivastava, R.N.(1979). Sheep pox: a review. Vet. Bull., 49(3):145–54.

Soad, M.W.S.; Wafaa, A.Z.; Michael. A.; Fayed, A.A. and Taha, M.M.(1996). Studies on sheep and goat poxviruses from naturally infected animals. Assiut Vet. Med. J.; 35(70):29–38.

Soman, J.P. and Singh, I.P.(1980). Cytopathic and immunogenic studies of sheep poxvirus serially cultivated in cell culture. J. Comp. Pathol.,90:99–106.

Stanford, M.M.; McFadden, G.; Karupiah, G. and Chaudhri, G. (2007). Immunopathogenesis of poxvirus infections: forecasting the impending storm. Immunol. Cell Biol. 85: 93–102.

Subba Rao, M.V.; Malik, B.S. and Sharma ,S.N. (1984). Antigenic relationship among sheep pox, goat pox and contagious pustular dermatitis viruses. Acta. virol., 28 (5): 380-387.18(3):606–17.

Tageldien, A.M.N.; Nour, m.; Ibrahim, M.E. and Elhussein, A.M.(2004).Evidance for viral population heterogeneity in the sheep and goat pox vaccine strain 0240 .J. Ani. and Vet. Advan., 3(6):366-370.

Tawfik, A.; Ali, A.A.; Ibrahim, E.M.; Mervit, M.; Mohamed. and Shahin, M.A.(2001).Studies on sheep pox in Kafr-Elsheikh Governorate . J. Egypt. Vet. Med. Ass., 6(A):195-206.

Terrinha, A.M.; Vigario, I.D.; Nunes Petisca, J.L.; Moura Nunes, J. and Bastos ,A.L.(1965). Autoradiographic study on sheep poxvirus infection. J. Bacteriol.; 90:1703–9.

Tian, H.; Chen, Y.; Wu, J.; Shang, Y. and Liu, X. (2010). Serodiagnosis of sheeppox and goatpox using an indirect ELISA based on synthetic peptide targeting for the major antigen P32. Virol. J. ,7:245-249.

Timothy, R.; Bowden , S.; Babiuk,L.; Geoff, R.; Parkyn, John, S.; Copps, David, and Boyle, B.(2007). Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats .Virol., 371: 380–393.

Tulman, E.R.; Afonso, C.L.; Lu, Z.; Zsak, L.; Sur, J.H.; Sandybaev, N.T.; Kerembekova, U.Z.; Zaitsev, V.L.; Kutish, G.F. and Rock, D.L.(2002). The genomes of sheep pox and goatpox viruses. J. Virol. 76(12):6054-6061

Uppal, P.K. and Nilakantan, P.R. (1967).Serological reactions in sheep pox- II. Agar gel diffusion test. Indian Vet. J., 44:374–382.

Uppal PK and Nilakantan PR(1974). Haemagglutination by fowl pox, sheep pox and vaccinia viruses. Indian Vet. J.;51:451–6.

USDA.(2002). Agricultural bioterrorism act of 2002. Fedl. Regist., 67(155):52383–9.

Van Rooyen, P. J.; Munz, E.K. and Weiss, K.E.(1969). The optimal conditions for the multiplication of Neethling-type LSDV in embryonated eggs. Onderstepoort. J. Vet. Res., 36: 165–174.

Varshovi, H. R.; Keyvanfar,H.; Aghaiypour,K.; Pourbakhsh,S.A.; Shooshtari, A.H. and Aghaebrahimian , M.(2009). Capripoxvirus identification by PCR based on P32 gene. Arch. of Razi Inst., 64: 19–25.

Vigario, J.D. and Ferraz, F.P.(1967). Study of sheep poxvirus synthesis by fluorescent antibody technique. Am. J. Vet. Res., 28:809–13.

Webster, A.J.F.(1981). Weather and infectious disease in cattle. Vet. Record., 28:183–187.

Yashpal-Malik and Malik, Y.(1998).Clinicopathological studies in lambs inoculated with a field isolate of sheep poxvirus. Int. J. Ani. Sci., 13(2):173–5.

Yeruham I.; Yadin H.; Van Ham M.; Bumbarov V.; Soham A. and Perl S. (2007).Economic and epidemiological aspects of an outbreak of sheeppox in a dairy sheep flock. Vet. Rec. ,160:236-7.

Yeruham, I.; Perl, S.; Nyska, A.; Abraham,A.; Davidson, M.; Haymovitch,M.; Zamir,O. and Grinstein,H. (1994). Adverse reactions in cattle to a capripox vaccine. Vet. Rec. 135:330–332.

Yuan, C.T.; Lee, P.C. and Cheng, Y.S.(1957). Research on the low virulent virus vaccine of sheep pox. I. Cultivation of sheep poxvirus on the developing chick embryo. Acta. Vet. Zootech.; 2:15–24.

Zangana, I.K. and Abdullah, M.A.(2013). Epidemiological , Clinical and Histopathological studies of lamb and kid pox in Duhok , Iraq. Bulgarian J. of Vet. Med.16 (2):133-138.

Zewdie, S.(2009). Sheep and goat pox: Causes, prevention and treatment. Technical bulletin No. 29. Ethiopia Sheep and Goat Productivity Improvement Programme . http://www.esgpip.org/PDF/ Technical%20 bulletin %20 No.29.pdf (17.04.2013 date last accessed).

Zhou, T.; Jia, H.; Chen, G.; He, X.; Fang, Y.; Wang, X.; Guan, Q.; Zeng, S.; Cui Q. and Jing,Q.Z. (2012). Phylogenetic analysis of Chinese sheeppox and goatpox virus isolates. Virol. J., 9: 25–32

Zro ,K.;Zakham ,F.; Melloul, M.; ElFahime, E.; and Ennaji, M.M.(2014).Asheep pox outbreak in Morocco:Isolation and identification of virus responsible for the new clinical form of disease.BMC Vet. Res., 10:31.

Abstract

This study aimed for isolation and diagnosis of sheep pox virus by polymerase chain reaction with preparation of live attenuated vaccine of sheep pox from the local isolate . 26 samples (scabs) were collected from clinically infected animals , 9 samples were selected for inoculation on chorioallantoic membrane (CAM) of chicken embryos for propagation of the isolates and detect lesions that produce by it , and after 3 serial passages in chicken embryos : one positive sample was selected for continuous passages until it reached to attenuation of the isolate. The titration of the isolate (passage 6) was done in chicken embryos for calculation of infective dose , agglutination test was done to detect ability of isolate to agglutinate sheep red blood cells . Agar gel precipitation test was used to detect the reaction between the viral isolates and the specific hyper immune serum that prepared in (2) sheep from Jordan live attenuated sheep pox vaccine , slides were prepared from infected chorioallantoic membrane by the viral isolate for histopatholgical examination. Serum neutralization test was used for detecting of serum neutralizing antibodies for viral isolate. Selected 7 samples were examined by polymerase chain reaction for detection of extracted nucleic acid in this samples by adding the materials which supplied with specific kit , followed by thermocycling and electrophoresis of the samples on agarose gel . evaluation of prepared live attenuated vaccine at passage16) was done by Titration of viral isolate in chicken embryos and skin of flank region of sheep . 2 Animals were used to determine the protection ratio of this isolate (passage 16) against challenge virus (viral isolate passage 6) when it injected at (0.1 ml of passage 16) ($10^{4.49}$ EID_{50}/0.1 ml) subcutaneously and then exposed to 1.5 ml of challenge virus ($10^{3.5}$ EID_{50}/0.1 ml) (passage 6) intradermally after 28 days of vaccination , also the isolate was tested for safety and purity tests. The results of serial passages for the samples in chicken embryos showed growing of samples 3,5,6 by formation of red and distinguished pock lesions appeared on chorioallantoic membrane (CAM) that differs in their density homogeneity , the sample number 3 (Abu-jarbuaa) gave high density of growth with serial passages and caused death of the inoculated embryos at the sixth passage within 48 hours after inoculation , while the death of inoculated embryos in ninth passages of isolate occurred at 72-96 hours after inoculation , no death

occurred in inoculated embryos at sixteen passage of isolate and considered as attenuated isolate . the titer of infective dose of the isolate (sixth passage) after it diluted with sterile normal saline was ($10^{3.5}$ EID_{50}/0.1 ml) which represent the volume of virus in 0.1 ml that cause pathogenic effect in 50% of inoculated embryos, no agglutination occured between the isolate (sixth passage) and sheep red blood cells . The precipitation lines appeared between the isolate (passage six) and hyper immune serum by agar gel immuno-diffusion test (AGID) , while no precipitation line appeared between this isolate and negative serum .The tissue sections of chorioallantoic membrane of inoculated embryos that contain pock lesions showed intra-cytoplasmic inclusion bodies appeared within infected cells that stained with hematoxylin and eosin , and the double dilution (1:2-1:256) of hyper immune serum with sterile normal saline in serum neutralization test showed presence of neutralizing antibodies in serum that neutralized sheep pox virus with titer 1:64, which protect 50% of inculated embryos from pathogenic effect of sheep pox virus , in polymerase chain reaction that include the amplification 7 samples of extracted viral DNA ,the samples 5,6,7 showed positive results (precipitating bands) for polymerase chain reaction while another samples (1,2,3,4) gave negative results in comparison with positive and negative control. the attenuation of this islolate occured at passage 16 with titer ($10^{4.49}EID_{50}$/0.1 ml) after it diluted with sterile normal saline (10^{-1}-10^{-6}) in both skin of sheep and chicken embryos. the protection ratio was 100% in challenge test . The viral isolate was safe and gave positive results for the safety tests in pregnant ewes and did not cause abortion in this ewes after vaccination , also the vaccine was safe for high dose in animals and pure from bacterial and fungal contamination. Thus the isolation and propagation of sheep pox virus can be done on chicken embryos and diagnose by polymerase chain reaction and the isolate can be used for immunization of sheep against sheep pox disease.