عزل وتشخيص فيروس جدري الاغنام باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل

فنار ابلحد اسحق مزاحم ياسين العطار
كلية الطب البيطري / جامعة الموصل
email: fanar1976@yahoo.com
(الاستلام 28 حزيران 2015 ، القبول 10 اب 2015)

الخلاصة

كان الهدف من الدراسة الحالية هو عزل وتشخيص العزلة الفيروسية لمرض جدري الاغنام باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل. تم جمع 26 عينة (بثور جلدية) من حيوانات مصابة سريريا بالمرض وتم تمرير 9 منها بطريقة الحقن في اجنة بيض الدواجن بهدف تنمية الفيروس ومشاهدة الآفات الناتجة عنه ، بعدها تم استخدام اختبار الترسيب المناعي للكشف عن تفاعل هذه العزلة مع المصل عالي التمنيع المضاد لها. كما تم تحضير شرائح نسجية من الغشاء اللقانقي المشيمي المصاب بالفيروس لاغراض الفحص النسجي . بينما استخدم اختبار التعادل المصلي للكشف عن الاضداد المعادلة للفيروس في المصل. وتم فحص 7 عينات مختارة بواسطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن تواجد الحامض النووي الفيروسي المستخلص في هذه العينات.واوضحت نتائج هذه الدراسة اول تسجيل للشكل العقدي لمرض جدري الاغنام في محافظة نينوى ، كما اظهرت عملية التمرير التسلسلي في اجنة البيض لبعض العينات تكوين مايسمى ب Pock Lesions حمراء اللون على الغشاء اللقانقي المشيمي ، في حين اظهرت نتائج اختبار الترسيب في هلامة الاكار تكوين خطوط ترسيبية واضحة بين العزلة الفيروسية والمصل العالي التمنيع ، وبينت ايضا المقاطع النسجية للغشاء اللقانقي المشيمي وجود اجسام اشتمالية داخل سايتوبلازم الخلايا المصابة بالفيروس. وفي اختبار التعادل المصلي لوحظ وجود للأجسام المضادة المعادلة لفيروس جدري الاغنام في امصال الحيوانات المستخدمة وبلغ هذا المعيار 64:1. اما في تفاعل البلمرة المتسلسل فبينت نتائجه ظهور حزم ترسيبيه مع بعض العينات المفحوصة في حين لم تظهر اي حزم ترسيبيه مع عينات اخرى . ونستنتج من ذلك الى امكانية عزل وتنمية فيروس جدري الاغنام على اجنة البيض وتشخيصه باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل .

الكلمات المفتاحية: جدري الاغنام ، فيروس الجدري ، التشخيص ، تفاعل البلمرة المتسلسل ، عزل الفيروس.

Isolation and diagnosis of sheep pox virus by polymerase chain reaction technique

Fanar A. Isihak Mozahim Y. Al-Attar
Coll. of Vet. Med. / Univ. of Mosul

Abstract

This study aimed for isolation and diagnosis of sheep pox virus by polymerase chain reaction. 26 samples were collected from clinically infected animals,9 samples were selected for inoculation in chicken embryos. Agar gel precipitation test was used for detect the reaction between the viral isolate and specific hyper immune serum, slides were prepared from chorioallantoic membrane for histopatholgical examination. Serum neutralization test used for detecting neutralizing antibodies for isolate. Selected 7 samples were examined by polymerase chain reaction for detection extracted nucleic acid. The result showed firstly reported of nodular form in Nineveh province, red pock lesions appear on chorioallantoic membrane during serial passages, a precipitation lines appears between the isolate and hyper immune serum by immunodiffusion test and intra-cytoplasmic inclusion bodies appear within infected cells, and the neutralizing antibodies showed by serum neutralization test with titer 1:64. Finally some samples showed positive result for polymerase chain reaction while another samples gave negative result. Thus the isolation and propagation of sheep pox virus can be done on chicken embryos and diagnose by polymerase chain reaction.

Key words: Sheep pox, pox virus, diagnosis, PCR, virus isolation

المقدمة

يعتبر مرض جدري الاغنام من الامراض الحادة والمعدية التي تصيب الاغنام ويمتاز هذا المرض بظهور آفات واضحة ومميزة له في مناطق متعددة من الجلد فضلا عن آفات حشوية (1) ، وتودي الاصابة بالمرض الى خسائر اقتصادية كبيرة في قطعان الاغنام وهلاكات عالية في الحملان حديثة الولادة فضلا عن حالات الاجهاض في الاناث الحوامل مع تقييد في حركة التجارة داخليا وخارجيا حيث تصل نسبة الهلاكات الى 50% في القطعان الحساسة للمرض بينما قد تصل الى 100% في الحيوانات الفتية (2). تعتبر تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) احدى اكثر واهم الطرق حساسية في الكشف عن الفيروسات وذلك بسبب دقتها العالية وخصوصيتها وحساسيتها واهميتها في تشخيص الفيروسات ، حيث يتم خلالها تشخيص الجين P32 الذي يشفر لانتاج المحددات المستضدية الخاصة بفيروس جدري الاغنام والمهمة في امراضيته (3). ولأجل ذلك تم تصميم هذا البحث لعزل فيروس جدري الاغنام من الحيوانات المصابة طبيعيا بالمرض وتشخيصه بالطرق المصلية والجزيئية .

المواد وطرائق العمل

1- العينات: تضمنت الدراسة جمع 26 عينة (بثور جلدية) من اغنام مصابة سريريا بمرض الجدري (نعاج وحملان) ، توزعت هذه الحيوانات في مناطق وقرى عديدة من محافظة نينوى وهذه المناطق هي : كوكجلي ، ترجلة ، ابو جربوعة ، دراويش ، بازكرتان ، ربيعة (قرية تل سمير) ، منارة شبك ، شاقولي ، تل اسود ، حيث تم جمع هذه العينات باستخدام مقص وملقط معقم وبعد ازالتها من الجلد وضعت حاويات زجاجية معقمة تحتوي على مادة الكلسرين بتركيز 10% ، بعدها نقلت الى مختبر الفيروسات / كلية الطب البيطري / جامعة الموصل وتم حفضها بدرجة -20 م لحين الاستخدام (4) ، بعدها تم اختيار 9 عينات منتخبة لتمثل كل عينة منها احدى المناطق المذكورة اعلاه حيث تم تقطيع1-2 غم من العينة الواحدة في هاون خزفي باستخدام مقص وملقط معقم واضيف اليها الرمل المعقم والمضادات الحياتية (Penicillin 2000 IU , Streptomycin 2000 mg/ml , Nystatin 200 IU) ومن ثم تم سحنها (5) ، بعدها نبذت العينات باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بدرجة 4 م وبسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 30 دقيقة ومن ثم اهمل الراسب بينما تم وضع الراشح بدرجة - 20 م لحين الاستخدام (6).

2- تحضير المصل عالي التمنيع: تم تحضير هذا المصل وذلك حسب بروتوكول منظمة ال OIE (7) وكذلك مصل السيطرة السالبة والموجبة.

3- التمرير التسلسلي للفيروس الحقلي في اجنة بيض الدواجن: تم تمرير 9 عينات مختارة وممثلة لتسع مناطق مختلفة من محافظة نينوى ولثلاث تمريرات اولية متتالية وذلك بالحقن على الغشاء اللقانقي المشيمي لأجنة بيض الدواجن (8) وتسجيل نتائج التمريرات الثلاثة مع وجود مجموعة اخرى حقنت بمحلول الملح الفسيولوجي كمجموعة سيطرة سالبة مع كل تمريرة. كما استمرت بعدها عمليات التمرير في اجنة البيض لعدة تمريرات متتالية وصولا الى التمريرة 16 بهدف متابعة ومشاهدة الافات الناتجة من تكاثر الفيروس على الغشاء اللقانقي المشيمي.

4- اختبار الترسيب المناعي في هلامة الاكار: اجري هذا الاختبار حسب طريقة (9) حيث تم صب الاكار المحضر بتركيز (1%) في اطباق بتري صغيرة وترك ليتصلب بعدها تم عمل حفرة مركزية ووضع فيها العزلة الفيروسية و 4 حفر محيطية ووضع فيها الامصال عالية التمنيع (عدد 2) (الحفرة2,1) ، مصل السيطرة الموجبة (الحفرة3) ومصل السيطرة السالبة (الحفرة4)على التوالي (10) ومن ثم وضع الطبق في الحاضنة بدرجة 22-25 م مع وجود مصدر للرطوبة داخل الحاضنة وتم الاستمرار باضافة كل من العزلة والامصال الى الحفر المخصصة لكل منها ، وبعد مرور 48 ساعة تم قراءة نتائج التجربة لهذا الاختبار.

5- الفحص النسجي: تم استخدام عينات من الغشاء اللقانقي المشيمي والذي ظهرت عليه ال Pock Lesions لغرض الفحص النسجي وذلك بوضعها في محلول الفورمالين المتعادل 10% ، وتم اتباع طريقة (11) في تحضير المقاطع النسجية وتصبيغها بالطريقة التقليدية بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين (H&E) ، ومن ثم فحصت الشرائح المحضرة بالعدسة الشيئية 100X.

6- اختبار التعادل المصلي: تم معاملة المصل عالي التمنيع المستخدم في هذا الاختبار والمحضر مسبقا بدرجة 56°م ولمدة 30 دقيقة وذلك للتخلص من العوامل غير المتخصصة فيه (12) ، ومن ثم تم عمل تخافيف ثنائية من المصل 1:2 الى 1:256 بعدها اضيف الى هذه التخافيف كميات وتراكيز ثابتة من العزلة الفيروسية ، ثم حضنت الانابيب بدرجة 37 لمدة ساعة واحدة ومن بعدها تم حقن 4 بيضات مخصبة من كل تخفيف بكمية 0.1 ml لكل بيضة ، وتضمن الاختبار ايضا وجود مجموعة سيطرة موجبة محقونة بالعزلة الفيروسية فقط وسيطرة سالبة تم حقنها بالمصل عالي التمنيع فقط ومجموعة اخرى غير محقونة ، بعد ذلك تم فحص البيض المحقون يوميا ولمدة 6 ايام ومن ثم تم حساب معيار الاضداد المعادلة للعزلة الفيروسية والمعبر عنه بمقلوب اعلى تخفيف من المصل والذي يحمي 50% من الاجنة المحقونة من ظهور التأثيرات المرضية للفيروس (7) .

7- التشخيص الجزيئي: تم سحن عينات الغشاء اللقانقي المشيمي والتي ظهرت عليها ال Pock Lesions باستخدام الهاون والرمل المعقم بعدها نبذت العينات واهمل الراسب اما الراشح فتم استخدامه كمصدر لاستخلاص الحامض النووي الفيروسي منه ، كما تم استخدام كل من الدم والبلازما لحيوانات مصابة بالمرض للتحري عن تواجد الفيروس في هذه العينات باستخدام تقنية التشخيص الجزيئي.

7-1-استخلاص الحامض النووي الفيروسي: تم اتباع الطريقة المذكورة في بروتوكول الشركة المنتجة (Bioingentich. Ltd. Chile) لعدة الاستخلاص (جدول1).

جدول (1): كميات وتفاصيل المواد المستخدمة في استخلاص الحامض النووي الفيروسي.

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

7-2- حساب تركيز الحامض النووي المستخلص: تم قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي الذي تم استخلاصه بواسطة جهاز (Biodrop).

7-3- تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل لتشخيص فيروس جدري الاغنام: تم تحضير مزيج التفاعل لكل من العينات (1،2،3،4،5،6،7) (جدول2) ، السيطرة الموجبة ، السيطرة السالبة ، وذلك من خلال مزج المواد والكواشف المطلوبة مع كمياتها كما هو موضح في الجدول (3) . ومن ثم وضعت المواد والكواشف بعد تحضيرها في جهاز ال (Master cycler gradient) Thermocycler (Eppendorf)) وتم تحديد برنامج عمل الجهاز كما في جدول (4).

جدول (2): 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

جدول (3): الكميات المطلوبة من المواد والكواشف لمزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

الاضافات / المكونات	العينات الفيروسية	السيطرة الموجبة	السيطرة السالبة
Premixture	5.5µl	5.5 µl	5.5 µl
السيطرة الداخلية			
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

جدول (4): خطوات وبرنامج عمل جهاز ال Thermocycler

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

7-4- الكشف عن نواتج عملية تضخيم الحامض النووي:
تم تحضير 1.5% من هلام الاكاروز وتم صبه في قالب حاوي على حفر خاصة ثم ترك ليتصلب تم وضع هلام الاكاروز في وعاء حاوي على محلول Ethidium Bromide ومن بعدها تم وضع 7 مايكروليتر من نواتج التضخيم (العينات) في الحفر 2,3,4,5,6,7,8 وكذلك 7 مايكروليتر من السيطرة الموجبة والسيطرة السالبة في الحفرتين 10,9 على التوالي ، اما المؤشر marker فقد تم وضع 2 مايكروليتر منه في الحفرة1.

تم تسليط فرق جهد كهربائي على محلول Ethidium Bromide الحاوي على وسط الاكاروز وبمقدار 100 فولت لمدة 30-40 دقيقة.

واخيرا تم استخدام جهاز خاص بالأشعة فوق البنفسجية للكشف عن نواتج التضخيم بعد ترحيلها كهربائيا (13).

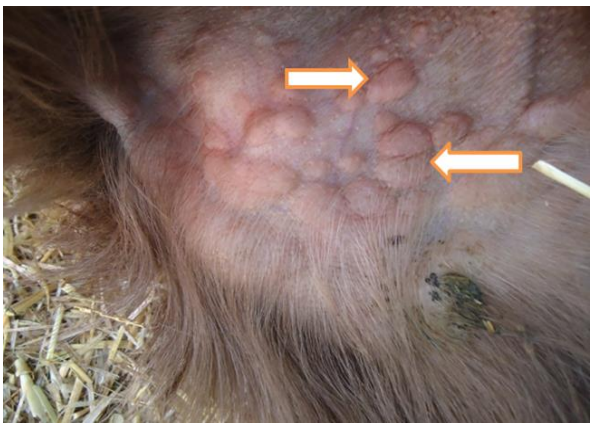
النتائج

1- الآفات العيانية: تمثلت الافات العيانية في الحيوانات المصابة بوجود عقيدات مميزة لهذا المرض متوزعة على مناطق مختلفة من الجسم تراوح حجمها من 5-25 ملم وهي تمثل الشكل العقدي للمرض وهذا هو اول تسجيل لظهور هذا الشكل من المرض في محافظة نينوى (الصورة1).

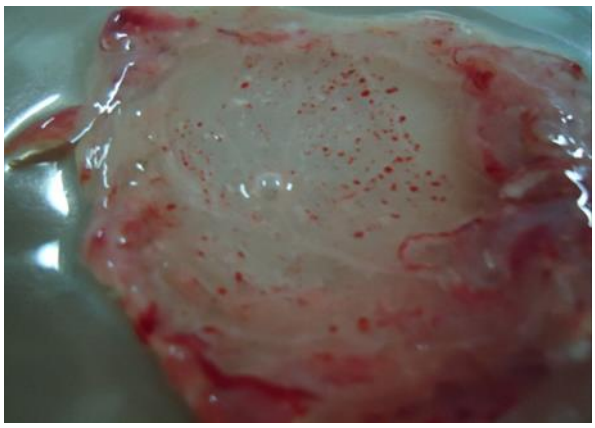
2- نتائج التمرير التسلسلي للفيروس الحقلي في اجنة بيض الدواجن: اظهرت نتائج التمرير الاولي للعينات الحقلية وبواقع ثلاث تمريرات متتالية نموا متفاوتا للفيروس على اجنة بيض الدواجن ، حيث اظهرت بعض هذه العينات نتائج موجبة تمثلت بتكوين ما يسمى ب Pock Lesions حمراء اللون ومميزة على الغشاء اللقائقي المشيمي وهي نادرة الحدوث جدا وبكثافة وشدة متفاوتة (الصورة 2) ، حيث تفاوتت احجام وشدة الآفات المتكونة بعد الحقن مع العزلات التي اظهرت نتائج موجبة للحقن لكن اكثرها وضوحا واشدها كثافة كان مع العزلة الفيروسية المأخوذة من قرية ابو جربوعة (عينة 3). جدول (5).

جدول (5): نتائج التمريرات الثلاثة الاولى للعينات المختارة في اجنة بيض الدواجن.

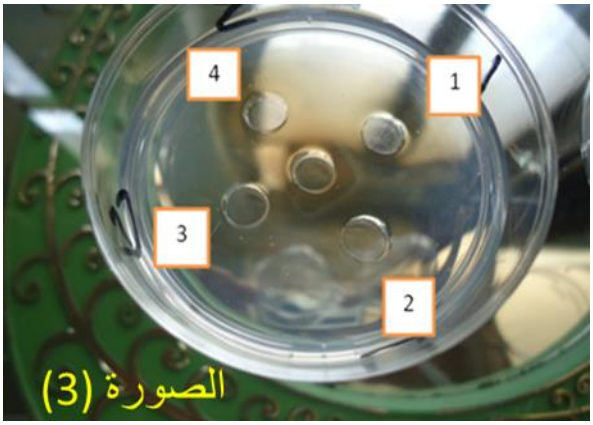
	كوكجلي	ترجلة	ابوجربوعة	دراويش	بازكرتان	ربيعة	منارة شبك	شاقولي	تل اسود
التمريرة 1	-	-	+	+	-	-	-	-	-
التمريرة 2	-	-	++		-	+	-	-	-
التمريرة 3	-	-	+++++	++	-	+	-	-	-

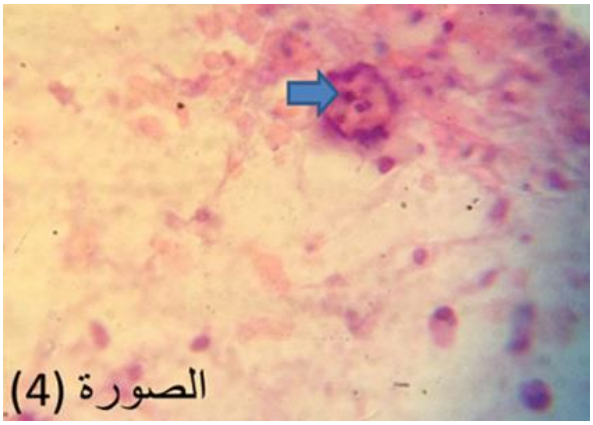


الصورة (1): الافات العقدية لمرض الجدري في منطقة الفخذ.



الصورة (2): انتشار ل pock lesions على الغشاء اللقانقي المشيمي وبحجم كبير (التمريرة6).





الصورة (3): ظهور الخطوط الترسيبية بين العزلة الفيروسية (الحفرة المركزية) والحفرة (2,1) الحاوية على المصل عالي التمنيع والحفرة (3) الحاوية على المصل الموجب ، وعدم وجود اي خط ترسيبي مع الحفرة الطرفية (4).
الصورة (4): وجود اجسام اشتمالية داخل سايتوبلازم الخلايا الغشاء اللقانقي المشيمي المصابة بالفيروس.

3- الترسيب المناعي في هلامه الاكار: اظهرت نتائج هذا الاختبار تكوين خطوط ترسيبية واضحة بين العزلة الفيروسية (الحفرة المركزية) وعينات المصل العالي التمنيع (الحفرة 2,1) ومصل السيطرة الموجبة (الحفرة3) ، في حين لم يظهر اي خط ترسيبي مع السيطرة السالبة (الحفرة4) (الصورة 3).

4-الفحص النسجي: بينت المقاطع النسجية للغشاء اللقانقي المشيمي الذي ظهرت عليه Pock lesions وجود اجسام اشتمالية داخل سايتوبلازم الخلايا المصابة بالفيروس (الصورة 4)

5-اختبار التعادل المصلي: اوضحت نتائج هذا الاختبار وجود للاجسام المضادة المعادلة لفيروس جدري الاغنام في مصل الحيوانين المستخدمين في تجربة تحضير المصل عالي التمنيع حيث كان معيار الاضداد في المصل لكلا الحيوانين 64:1 ، في حين ظهرت الافات على الاجنة المحقونة في مجموعة السيطرة الموجبة بينما لم يلاحظ اية افات على اجنة السيطرة السالبة.

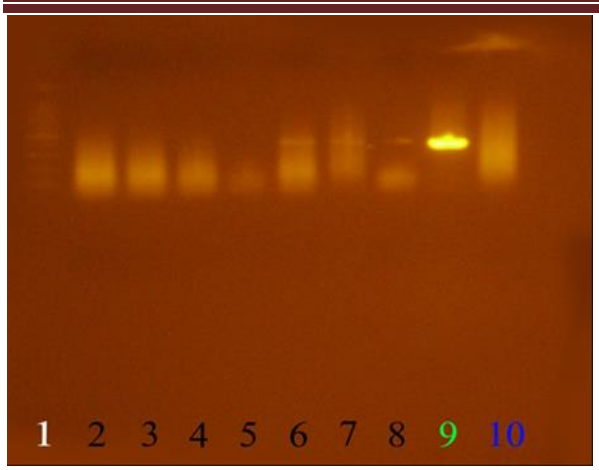
6-لتشخيص الجزيئي:

6-1-تركيز الحامض النووي (DNA): تم قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي المستخلص من العينات المختارة وكانت النتائج كما في جدول (6).

6-2-تفاعل البلمرة المتسلسل: بينت نتائج هذا الاختبار ظهور حزم ترسيبية مع العينات (7,6,5) والتي تمثل كل من التمريرات (16,9,6) على التوالي بينما لم تظهر اي حزم ترسيبية مع العينات (4,3,2,1) (الصورة 5).

جدول (6): تركيز ونقاوة الحامض النووي في العينات المستخدمة في الاستخلاص

العينة	التركيز (نانوغرام/مل)	النقاوة (نانومول)
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



الصورة (5): الممر (1) (Marker) ، الممرات (8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) تمثل العينات (1 ,2 ,3 ,4 ,5 ,6 ,7) ، الممر (9) يمثل السيطرة الموجبة ، الممر (10) يمثل السيطرة السالبة.

المناقشة

لقد شهدت السنوات الاخيرة تطورا في تقنيات التشخيص الجزيئي وذلك في تشخيص الامراض المعدية ومن ضمنها تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل والتي استخدمت بنجاح في تشخيص هذا المرض وذلك لاعتماد هذه التقنية الى تضخيم الجين المشفر لانتاج المستضد الفيروسي P32 والذي يمثل البروتين التركيبي المتواجد في جميع فيروسات جدري الاغنام (14). لقد كان ظهور الشكل العقدي للمرض في محافظة نينوى واضحا وان تسجيله لأول مرة مهم جدا في الدراسات اللاحقة وذلك للتعمق في دراسة هذا الشكل من المرض كونه نادر الحدوث. ان النمو المتفاوت لفيروس جدري الاغنام عند تمريره بشكل تسلسلي على اجنة بيض الدواجن يعود الى صفات وطبيعة تلك العزلات الفيروسية من الناحية البايلوجية وهو ما اشار اليه (15) ومطابق لما ذكره من عدم امكانية نمو قسم من العزلات على الغشاء اللقانقي المشيمي لاجنة البيض المخصب ، كما اكد (16) بعدم نمو فيروس الجدري على اجنة البيض ولستة تمريرات متتالية وان نسبة قليلة فقط يمكن ان تنمو على هذا الغشاء . ان حدوث مايسمى بالتمريرات العمياء (Blind Passages) عند حقن الفيروس على الاوساط الحية بالرغم من كون هذه الاوساط حساسة له يعود الى الصعوبة في عزل هذا الفيروس ، نموه البطئ وحاجته لتمريرات متعددة لاتمام عملية العزل والتضعيف (17) .ان نمو هذا النوع من الفيروسات على الاغشية ياتي من كونها اوساط مفضلة لنمو هكذا نوع من الفيروسات ومنها الغشاء اللقانقي المشيمي لاجنة البيض وينتج عن نموها مايسمى ب Pock lesions وهذا ما ظهر عند تنمية العزلة الفيروسية قيد الدراسة ومطابق لما ذكره (15) حيث كانت هذه الافات لدى الباحث اعلاه عند ظهورها رصاصية الى بيضاء اللون وبحجم 0.3 ml لكن الافات الناتجة من العزلة الفيروسية قيد الدراسة كانت ذات لون احمر ومميزة وربما يعود ذلك الى طبيعة العزلة واستضداديتها وخواصها البايلوجية والتي قد يعود اللون الاحمر فيها الى النزف المصاحب لها عند نموها على هذا الغشاء ان نتائج اختبار الانتشار المناعي في هلامة الاكار والتي ظهرت بشكل خطوط ترسيبية يعود الى انتشار كل من المستضد والاضداد المتخصصة له احدهما باتجاه الاخر ليكونا هذه الخطوط الترسيبية (18) ، وكانت نتيجة تكاثر الفيروس على الغشاء اللقانقي المشيمي ظهور اجسام اشتمالية في سايوبلازم الخلايا المصابة نتيجة لتضاعف الحامض النووي الفيروسي بعد دخوله الى الخلية وتكوين البروتينات التركيبية المهمة وبالتالي تجميع الجزيئات الفيروسية الكاملة في السايتوبلازم (19) ، وفي اختبار التعادل المصلي فقد كان معيار الاضداد المعادلة للفيروس مرتفعا وذلك للجرع المنشطة والمتتالية التي تم استخدامها في تحضير هذا المصل وهو مطابق لما ذكره (20) عندما استخدم هذا النوع من المصل في اختباري الانتشار المناعي في هلامة الاكار والتعادل المصلي ، كما ان هذا الاختبار متخصص ولكن حساسيته قليلة في تحديد الحيوانات التي تمتلك مستوى منخفض من الاضداد المعادلة (21) ، كما ان استخدام هذا الاختبار هو طريقة مطولة في التشخيص وتحتاج لفترة غير قصيرة من الوقت (6) ، ومن نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل اتضح بان العينات (1 ,2) (دم وبلازما) لم تظهر لها نتائج موجبة في هذا الاختبار وذلك نتيجة لحالة ال Viremia القليلة في دم الحيوانات المصابة واعتبار عينات الدم غير ملائمة في تشخيص فيروس الجدري بهذه التقنية (22) ، كما العينات (4,3) والتي تمثل التمريرة الاولى والثالثة على التوالي لم تظهر كذلك نتائج موجبة لهذه التقنية وربما يعود السبب في ذلك الى قلة تركيز الحامض النووي في العينات وكذلك وجود المضادات الحياتية مع العينات والذي تثبط تضاعف الحامض النووي في حالة وجودها مع العينات (23) ، في حين كانت النتائج ايجابية مع العينات (7,6,5) وذلك لوجود تركيز لاباس به من الحامض النووي في العينة فضلا عن عدم احتواءها للمضادات الحياتية والتي لها دور كبير في تثبيط التفاعل.

المصادر

1-Bhanuprakash V, Moorthy ARS, Krishnappa G, Srinivasagowda RN, Indrani BK(2005) An epidemiological study of sheep pox in Karnataka state, Révue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties)., 24: 909–920.

2-Oguzoglu TC, Alkan F, Ozkul A, Atalay- Vural S, Gungor AB, Burgu I (2006) A sheep pox virus outbreak in central Turkey in 2003: Isolation and Identification of Capripoxovis. Veterinary Research Communications 30, 965-971

3-Hosamani M , Mondal B, Tembhurne AP, Bandyopadhyay KS, Singh KR, Rasool JT (2004) Differentiation of sheep pox and goat poxviruses by sequence analysis and PCR –RFLP of P32 gene. Virus Genes., 29:73-80.

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

5-Sheikh–Ali MA, Hamad ME, Ali BH, Saeed AW (2004) Vet. Arhiv ., 74 (5): 341–350.

6-Varshovi HR, Keyvanfar H, Aghaiypour K, Pourbakhsh SA, Shooshtari AH, Aghaebrahimian M (2009) Capripoxvirus identification by PCR based on P32 gene. Archives of Razi Institute, 64: 19–25.

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

8-Abdel Aziz S, Abu-EL-Saad Ahmed S, 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.

9-Rao TVS, Negi BS, Bansal MP (1997) Isolation and characterization of soluble antigens of sheep poxvirus. Indian J. Exp. Biol. 35: 597-602.

10-Nour TAM, Fadol MA, Ahmad AM, Yougob IA, Elhussein AM (2012) Studies on humoral immune response of sheep to sheep thermostable vaccine. Sudan J. Vet. Research.26 (1):7-12.

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

12-Amitha RG, Raveendra H, Byregowda SM, Vijayashra V, Yeshwant SL, Giridhar P, Renukaprasad C (2010) Evaluation of humoral immune response to sheep pox vaccine. Tamilnadu J. Vet. and animal science.,6(5):236-238.

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

14-Ireland DC, Binepal YC (1998) Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. J Virol Methods., 74:1–7.

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

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

17-Sadri R, 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.

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

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

20-Soad MWS, Wafaa AZ, Michael A, Fayed AA, Taha MM (1996) Studies on sheep and goat poxviruses from naturally infected animals. Assiut Vet. Med. J.; 35(70):29–38.

21-Bhanuprakash V, Indrani BK, Hosamani M, Singh RK (2006) The current status of sheep pox disease. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.,29:27–60.

22-Zro K, Zakham F, Melloul M, ElFahime E, Ennaji MM (2014) A sheep pox outbreak in Morocco: Isolation and identification of virus responsible for the new clinical form of disease. BMC Veterinary research .10:31.

23-Rossen LP, Norskov K, Holmstrom Rasmussen OF (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solution. Int. J. Food Microbiol. 17:37-45.