

## الكشف عن مستضدات حمة الإسهال الحموي البقري في بعض قطعان الأبقار في سورية

عبد الحافظ الطباش\*، احمد حمدي مقرش\* وأنور العمر\*\*

\*قسم التشريح المرضي، \*\*قسم الأحياء الدقيقة، كلية الطب البيطري، جامعة البعث، سورية  
E-mail: tabash81@yahoo.com

### الخلاصة

جمعت ٣٠٠ عينة من الخزعات الجلدية المأخوذة من صيوان الأذن من الأبقار المحلية خلال المدة ٢٠٠٨ - ٢٠٠٩ (من شهر حزيران ٢٠٠٨ إلى شهر أيار ٢٠٠٩) بهدف الكشف النسيجي عن مستضدات حمات مرض الإسهال الحموي البقري في العجول دائمة الخمج والأبقار باستخدام اختبار المناعة الكيمونوسيجية (IHC). إذ أظهرت نتائج الاختبار أن نسبة العينات الموجبة له كانت ٢٥,٣٪ (محافظة درعا كانت ٣٨,٦٪ وفي محافظة حمص كانت ٢١,٣٪ وفي محافظة حماة ٢٥,٣٪ وفي محافظة حلب ١٦٪). ظهر الخمج بالنسب ٢٢٪ و ٤١٪ و ١٣٪ في كل من العجول بعمر أقل من ٦ أشهر والعجول بأعمار ما بين ٦ - ١٢ شهر والأبقار على التوالي.

### Detection of bovine viral diarrhea virus in some Syrian cattle herds

A. Tabash\*, A. H. Mukrish\* and A. Al-Omer\*\*

\*Department of Pathology, \*\*Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, AL-Baath University, Syria

#### Abstract

Three hundred skin tissue biopsies from ear pinna of local breed cattle during 2008–2009 (from July 2008 to May 2009) to detect bovine viral diarrhea virus antigens in persistently infected calves and cows, by using indirect immunohistochemistry test (IHC). Out of 300 samples examined 25.3 % were positive for IHC test (Draa province 38.6%, Homs 21.3%, Hama 25.3%, and Aleppo 16%). Infection was observed in 22%, 41%, 13% of calves less than 6 months, calves between 6-12 months and cows, respectively.

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

### المقدمة

ويُشار إلى هذه الحيوانات على أنها عجول حاملة للمرض (دائمة الخمج persistently infected calves) (4)، وإن المشاكل الناجمة عن المرض بشكل رئيس تتمثل بالخسائر التناسلية (reproductive loss) في الأبقار بالرغم من وجود عدد من العلامات السريرية الأخرى (6،7). استخدمت تقنية المناعة الكيمونوسيجية Immuno-histochemistry (IHC) للكشف عن المستضدات الموجودة في الخزعات الجلدية المأخوذة من صيوان الأذن وذلك لتحديد الحيوانات دائمة الخمج (8). إذ تعد هذه الطريقة من أفضل الطرائق لعمل مسوحات وبائية شاملة على الحيوانات وذلك لسهولة أخذ الخزعات الجلدية، ويمكن تطبيق هذه التقنية للكشف عن المستضد الخمجي في العجول الوليدة دائمة الخمج دون التداخل مع الأضداد الأمية (8).

تم التعرف على مرض الإسهال الحموي البقري (BVD) bovine viral diarrhea لأول مرة في ولاية نيويورك من قبل الباحث Olafson عام ١٩٤٦ (1)، ويسبب المرض حمة تنتمي لجنس الحمات الطاعونية Pestivirus والتي تنتمي لعائلة الحمات الصفراء (Flaviviridae) (2). للحمة القابلية على التطفر (mutates) بسهولة منتجة عدداً من العترات، صنفت الحمات كنمط أول وثاني (3)، إذ يترافق النمط الثاني مع مرض شديد (فوق حاد) (4)، كما صنف أيضاً كنمطين ممرض (cytopathic) وغير ممرض (non cytopathic) (5)، إذ تختلف في قدرتها على إحداث المرض (4). ينتقل المرض بشكل رئيس بوساطة العجول المصابة خلال مراحل الحمل المبكرة للأبقار والتي لم تُجهض،

ونظراً لعدم وجود دراسات حول مرض الإسهال الحموي البقري في سورية ارتأينا إجراء هذه الدراسة وذلك للتحري عن وجود المرض، ومعرفة نسبة الإصابة به (proportional morbidity rate) وتشخيصه عن طريق أخذ الخزعات الجلدية وباستخدام اختبار المناعة الكيمونسيجية فضلاً عن دراسة العلاقة بين عمر الحيوان ومعدل الإصابة بالمرض.

## المواد وطرائق البحث

جمعت ٣٠٠ عينة من جلد صيوان الأذن من مزارع القطاع العام والخاص والمسالخ بطريقة العينة غير الاحتمالية المهدفة (purposive non-probability sampling) من عدة محافظات في سورية (درعا، حمص، حماة، حلب)، إذ بلغ مجموع العينات من كل محافظة (٧٥) عينة مع الأخذ بعين الاعتبار أن تكون مئة عينة مأخوذة من عجول أقل من ٦ أشهر وأخرى من عجول بأعمار ٦ - ١٢ شهر و مئة عينة أخرى من الأبقار البالغة. أخذت العينات من عجول وأبقار أظهرت علامات سريره مختلفة كالإسهال، والتهابات رئوية، وضعف النمو، واجهاضات، والتهابات الضرع، واحتباس المشيمة، وتكرار الشبق، وانخفاض إنتاج الحليب.

## العينات

جمعت العينات عن طريق أخذ الخزعات الجلدية من جلد صيوان الأذن باستخدام جهاز أخذ الخزعة (Punch Biopsy) بقطر ٥ ملم (9)، وبعدها تم تثبيت الخزعات الجلدية بوضعها في أنابيب بلاستيكية محكمة الإغلاق تحوي على فورمالين متعادل بتركيز ١٠ % لمدة (٢٤-٤٨) ساعة وبعد ذلك غسلت بالماء لمدة ٢٤ ساعة، ثم وضعت بجهاز التمرير الذي يتكون من أحواض تحوي على كحول بنسب مختلفة وزايلول وشمع ثم بعد ذلك صبت العينات بقوالب شمعية للتقطيع، حيث قطعت العينات بسمك ٤ ميكرون، وحُملت المقاطع على شرائح خاصة ذات طراز ألماني (STAR FROST)، ثم وضعت الشرائح في فرن ساخن بدرجة ٥٦ م° لمدة ساعة (10)، وبعد ذلك تم إجراء اختبار المناعة الكيمونسيجية بطريقة الأمينوبيروكسيداز Immunoperoxidase وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة (Envision Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit /Mouse, Dako RealTM) حيث تم التخلص من الشمع باستخدام الزايلول لمدة ٢٠ دقيقة والكحول بتركيز ١٠٠ % و ٩٥ % و ٩٠ % و ٨٠ % و ٧٠ % لمدة ٥ دقائق لكل حوض وماء مقطر لمدة ٥ دقائق، ثم بعد ذلك تم تثبيت النشاط البيروكسيدي الداخلي في الشرائح النسيجية بالماء الأوكسجيني H2O2 تركيز ٣ % لمدة 15 دقيقة ثم غسلت الشرائح بالماء لمدة ٥ دقائق ثم بمحلول تريس Tris buffer (الباهاء = 7,6) من إنتاج شركة Merck الألمانية لمدة ٥ دقائق، عُرضت الشرائح النسيجية للحرارة بالميكروويف وذلك بوضعها في محلول Target Retrieval Solution citrate إنتاج شركة

Dako الدنمركية (الباهاء = 6) لمدة ٢٠ دقيقة بدرجة الغليان (لأن استخدام المثبتات مثل الفورمالين ١٠ % يغلف محددات الأضداد (البروتينات) ولإظهار مكانها نقوم بعملية غلي بالميكروويف)، وبعد ذلك تركت الشرائح لتبرد ضمن محلول الغلي بهواء الغرفة، ثم غسلت الشرائح بمحلول تريس Tris buffer (الباهاء = 7,6) عُرضت الشرائح لمصل ماعز لمدة ٣٠ دقيقة لمنع ظهور أي نتائج إيجابية خاطئة (Blocking solution)، غسلت الشرائح بمحلول تريس Tris buffer لمدة ٥ دقائق، عُرضت الشرائح للأجسام المضادة الأولية (Anti-Bovine Virus Diarrhoea Virus Monoclonal Antibody) من شركة (synbiotics) الفرنسية بدرجة حرارة ٣٧ لمدة ساعة في حجرة رطبة بينما حضن الشاهد السلبي بالمحلول الداري، وبعدها غسلت الشرائح بمحلول Tris buffer لمدة ٥ دقائق، ثم نفعت هذه الشرائح بمحلول Tris buffer لمدة ٥ دقائق، بعد ذلك عُرضت الشرائح للأجسام المضادة الثانوية من شركة Dako والذي يتكون من ثلاث محاليل (A,B,C)، يحتوي المحلول A على الأجسام المضادة الثانوية، أما المحلول B فيحتوي على ركيزة البيروكسيداز المقترنة التي ترتبط بالجسم المضاد الثانوي الذي يرتبط بالجسم المضاد الأولي، أما المحلول C فيحتوي على صبغة DAB (Diaminbenzidine) حيث عرضت الشرائح للمحلول A بدرجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٣٠ دقيقة ثم غسلت الشرائح بمحلول Tris buffer لمدة ٥ دقائق، ثم عرضت الشرائح للمحلولين B و C بعد خلطهما معاً بنسبة (٢٠ ميكرون من C مع ١٠٠٠ ميكرون من B) لمدة ١٠ دقائق ثم أزيل المحلول ووضع مرة أخرى لمدة ١٠ دقائق من دون غسل الشرائح، وبعد ذلك أزيل المحلول بغسله بالماء المقطر، ثم صبغت أرضية الشرائح بهيماتوكسولين ماير (Hematoxylin Mayer) لمدة ٣٠ ثانية ثم غسلت بالماء الدافئ لمدة ١٠ - ٢٠ دقيقة ثم نزع الماء بتمرير الشرائح في أحواض تحوي كحول بتركيز مختلفة ٧٠ % و ٨٠ % و ٩٠ % و ١٠٠ % على التوالي لمدة ٥ دقائق في كل حوض، ثم الزايلول لمدة ١٠ دقائق بعدها عولجت الشرائح بمادة لاصقة (Enthelan) من شركة Merck وغطت الشرائح باستخدام غطاء الشريحة لتكون جاهزة للفحص المجهرى وقرءة النتائج.

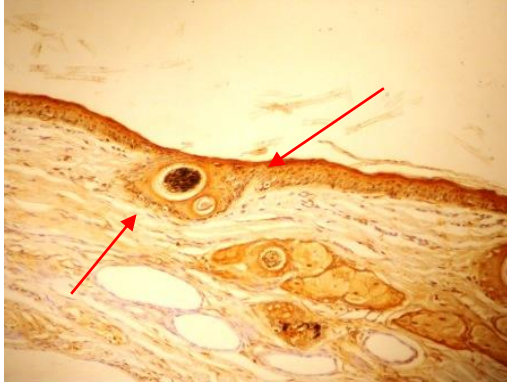
## التحليل الإحصائي

تم حساب حد الثقة لحيوانات الدراسة عند حد ثقة ٩٥ %، وبالتالي فإن حد الثقة ٩٥ % بالنسبة للحيوانات الخمجة بالإسهال الحموي البقري يقدر بالقانون التالي (10):

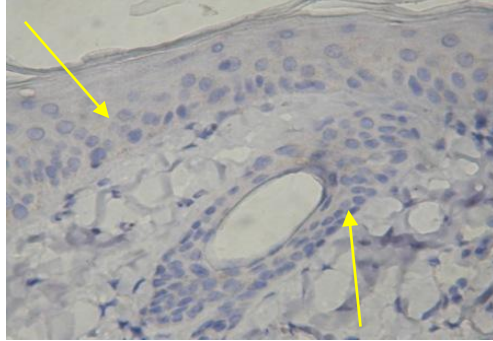
$$CI95\% = P\% \pm 1.96SE(P\%)$$

وهكذا فإن حد الثقة عند ٩٥ % للنسبة الحقيقية للحيوانات الخمجة بالإسهال الحموي البقري تراوح ما بين ٢٠,٤١ % و ٣٠,٢٤ %، كما وتم حساب معدل الإصابة بالمرض بالقانون التالي:

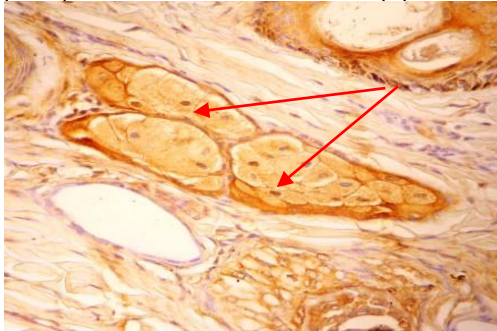
بسهولة بلون بني لامع والتي تختلف عن حبيبات الميلانين المنتظمة بشكل كروي خشن ذات اللون البني الباهت (الصور ١ و ٣ و ٥)، وفي بعض الخزعات الايجابية تصبغت الغدد الدهنية والعرقية الموجودة في الأدمة بصبغة معتدلة إلى المتوسطة (الصورة ٣)، وتعد الصبغة الايجابية صبغة غير نوعية في الأدمة والأوعية الشعرية، ونادراً ما تلاحظ صبغة المناعة الكيمونسيجية في الخلايا العضلية الملساء للشريانات والخلايا بين الخلوية في الأدمة مثل الأرومات الليفية.



الصورة (١): النتيجة الموجبة لاختبار IHC (X 20).



الصورة (٢): النتيجة السلبية لاختبار IHC (X 40).



معدل الإصابة % = عدد الحيوانات المصابة بالمرض \* ١٠٠  
العدد الكلي للحيوانات المفحوصة

### النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الدراسة وجود مستضدات الحمى في جلد الأذن المأخوذ من الحيوانات المشتبه بها بنسب متفاوتة في العينات الموجبة من كل محافظة خلال مدة الدراسة الجدول (١).

الجدول (١) النسب المئوية لتواجد مستضدات مرض الإسهال الحموي البقري في بعض قطعان الأبقار في سورية.

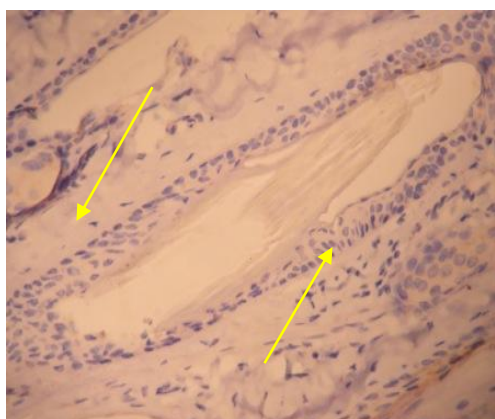
اسم المحافظة	العدد الكلي للعينات المفحوصة	العينات الموجبة	العينات السلبية	النسبة المئوية
درعا	٧٥	٢٩	٤٦	٣٨,٦
حمص	٧٥	١٦	٥٩	٢١,٣
حماة	٧٥	١٩	٥٦	٢٥,٣
حلب	٧٥	١٢	٦٣	١٦
المجموع	٣٠٠	٧٦	٢٢٤	٢٥,٣

أظهرت النتائج تواجد الإصابة بنسب مختلفة في المحافظات التي شملتها الدراسة حيث بلغت (٦,٣٨ - ٣,٢١ - ٣,٢٥ - ١٦) % في كل من درعا وحمص وحماة وحلب على التوالي، حيث كان أعلى معدل للإصابة بالمرض في محافظة درعا (٦,٣٨) % مقارنة بالمحافظات الأخرى بينما كان أقل معدل للإصابة في محافظة حلب (١٦) % الجدول (١).

وأن هذا الاختلاف في النسب المئوية لمعدل الإصابة بين المحافظات المدروسة يعود إلى عدة عوامل متنوعة مختلفة مثل الاختلاف في تركيب القطعان والتي تتضمن نسبة العجول والمراحل المختلفة من الحمل للابكار والأبقار ونسبة الحيوانات المستعدة للخمج والظروف البيئية وطرائق الرعاية الصحية وأساليب الإدارة وإجراءات الأمن الحيوي والتي تلعب دوراً في تفاوت معدلات الإصابة (١١، ١٢).

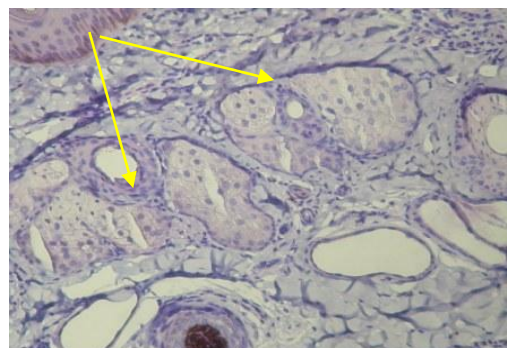
كان التفاعل اللوني للمناعة الكيميائية النسيجية واضحاً ومميزاً في الطبقات السطحية والعميقة من البشرة وخصوصاً في الخلايا الكيراتينية (الصورة ١)، وكذلك في ظهارة جريبات وبصلة الشعر وملحقاتها، إذ كانت ظهارة الجريبات المكان الأكثر شيوعاً لتركز حمى الإسهال الحموي البقري BVDV (الصورتين ١ و ٥). حيث توافقت هذه النتائج مع نتائج كل من (٩، ١٣)، وأن قوة ووضوح وانتشار الصبغة دلالة على أن الحمولة الفيروسية مرتفعة بالنسبة والعكس صحيح (١٣).

أظهرت الخلايا الايجابية صبغة بنية لامعة واضحة ضمن هيولى الخلايا بسبب ترسب صبغة DAB والتي كانت مميزة



الصورة (٦): النتيجة السلبية لاختبار IHC (X 40). غياب الصبغة في جريبات الشعر.

الصورة (٣): النتيجة الموجبة لاختبار IHC (X 40). تواجد الصبغة في خلايا الغدد.



الصورة (٤): النتيجة السلبية لاختبار IHC (X 40). غياب الصبغة في خلايا الغدد.

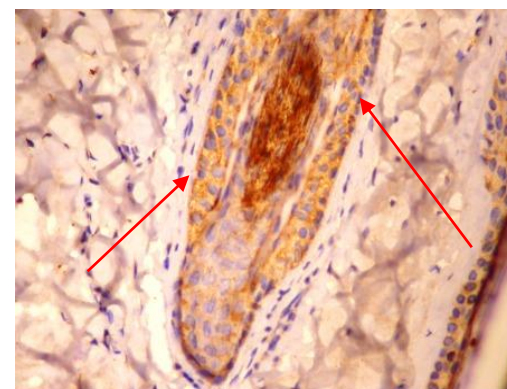
الجدول (٢) يبين العلاقة بين معدل الإصابة بالمرض وعمر الحيوان.

اسم المحافظة	العينات	عجول دون ٦ أشهر	عجول بين ٦ - ١٢ شهر	أبقار
درعا	٧٥	٩	١٣	٧
حمص	٧٥	٤	١١	١
حملة	٧٥	٦	٨	٥
حلب	٧٥	٣	٩	-
المجموع	٣٠٠	٢٢	٤١	١٣
% لمعدل الإصابة بالمرض	% ٢٢	% ٤١	% ١٣	

ويعتمد انخفاض معيار الأضداد بشكل عام على المعيار الأولي عند عمر (١ - ٣ أيام) (١٥). أما من حيث انخفاض معدل الإصابة في الأبقار فهذا يعود إلى أن حوالي نصف العجول دائمة الخمج تموت قبل عمر سنة ومعظمها يموت قبل عمر سنتين، إذ تكون هذه العجول صغيرة وبطيئة النمو وحساسة جداً إلى العديد من المشاكل مثل الموت المفاجئ والإسهال وذات الرئة (١٦).

وعند حساب حد الثقة للنسب الحقيقية للحيوانات المخموجة بالإسهال الحموي البقري عند ٩٥٪ يلاحظ أنها تراوحت ما بين ٢٠،٤١٪ و ٣٠،٢٤٪، فكلما كان حد الثقة صغيراً أو ضيق المدى يكون التقدير دقيق بالنسبة لمعدل الحيوانات المدروسة والعكس صحيح (١٠).

تظهر نتائج هذه الدراسة أن صبغة المناعة الكيميائية النسيجية لمستضدات الحمة في الجلد المثبت بالفورمالين والمدمج



الصورة (٥): النتيجة الموجبة لاختبار IHC (X 40). تواجد الصبغة في جريبات الشعر.

كما تم دراسة العلاقة بين عمر الحيوان ومعدل الإصابة بالمرض حيث أظهرت النتائج أن أعلى معدل للإصابة بالمرض كانت في العجول بعمر ٦ - ١٢ شهر ثم تلتها العجول بعمر أقل من ٦ أشهر ثم في الأبقار أي بنسبة ٤١٪، ٢٢٪، ١٣٪، على التوالي (الجدول ٢). حيث نلاحظ تركيز الإصابة بشكل كبير في العجول بعمر ٦ - ١٢ شهر وكانت أقل في العجول أقل من ٦ أشهر كونها محمية بالأضداد الأمية التي تتناولها العجول الصغيرة من حليب اللبأ في الأسابيع الأولى من الولادة حيث تقيها من خطر التعرض للمرض والتي تدوم ستة أشهر تقريباً (١٠، ١٤).

8. Brock K V, D L Grooms, J Ridpath, and S E Bolin. Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. J Vet Diagn Investig. 1998;10:22-26.
9. Camilla Luzzago<sup>1</sup>, Michela Frigerio<sup>1</sup>, Francesco Tolari<sup>2</sup>, Maurizio Mazzei<sup>2</sup>, Claudia Salvadori<sup>2</sup>, Fabio Del Piero<sup>3</sup>, Mario Arispici<sup>2</sup>. Indirect immunohistochemistry on skin biopsy for the detection of persistently infected cattle with bovine viral diarrhoea virus in Italian dairy herds. New Micro. 2006; 29:127-131.
10. Daniel L, Grooms and Eric D Keilen. Screening of Neonatal Calves for Persistent Infection with Bovine Viral Diarrhea Virus by Immunohistochemistry on Skin Biopsy Samples. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 ;9:898-900.
11. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. Vet Micro.1999;64: 89-107.
12. Wolf G. "BVD/MD als Herdenproblem." ITB-Schriftenreihe München: Verlag Hieronymus, 1997.
13. Brad L, Njaa Edward G, Clark Eugene Janzen John A, Ellis Deborah M, Haines. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. J Vet Diagn Invest. 2000;12:393-399.
14. Palfi V H, Houe, and J Philipsen. Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves. Acta Vet Scand 1993; 34:105-107.
15. Brodersen B W. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2004;20: 85-93.
16. Larry Kerr, Fred Hopkins, Matt Welborn. Bovine Virus Diarrhea Virus Infection in Cattle. Anim Sci Info Series: AS-B 324.

بالبرافين أظهرت تواجد مستضدات حمة الإسهال الحموي البقري في الأبقار السورية.

## المصادر

1. Olafson P, MacCallum A D, Fox A. "An apparently new transmissible disease of cattle." Cornell Vet. 1946;36: 205-213. Quoted by: Goens, D. "The evolution of bovine viral diarrhea: a review." Can Vet J. 2002; 43(12):946-54.
2. Murphy F A, Gibbs E P, Horzinek M C, and Studdert M J. Veterinary Virology, London Academic Press, San Diego, USA. 1999 .
3. Vilcek S, Paton D J, Durkovic B, Strojny L, Ibata G, Moussa A, Loitsch A, Rossmanith S, Vega S, Scicluna M T, and Palfi V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. Arch Virol. 2001;46: 99-115.
4. Valle PS. Bovine virus diarrhoea virus epidemiological studies of the infection and the cost-benefit of control in Norway. In Thesis: The Norwegian School of Veterinary Science, Oslo, Norway. 2000.
5. Deregt D, and Loewen K G. Bovine viral diarrhoea virus - Biotypes and diseases. Can Vet J.1995;36:371-8.
6. Alves D, Tremley R, Godkin A. Update on bovine virus diarrhoea in Ontario. Can Vet J. 1996 ;37-177.
7. Stoffregen B, Bolin S R, Ridpath J F, and Pohlenz J. Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. Vet Micro. 2000;77: 157-162.