قسم أمراض الحيوان
كلية الطب البيطرى – جامعة البعث – حماه – سوريا

SEROREVELATION OF ANTIBODIES OF EQUINE HERPESVIRUS (EHV1/EHV4) IN SYRIA

(With One Table and Two Figures)

الكشف عن الأضداد النوعية للقوباء الخيلية النمطين المصليين ١ و ٤ في سورية

حازم الطويل ، عبد الكريم قلب اللوز ، محمد زهير الأحمد*
* قسم الجراحة والولادة – كلية الطب البيطرى – جامعة البعث – حماه – سوريا

(Received at 18/3/2011)

الهدف من هذه الدراسة هو التقصي المصلي عن مرض الإجهاض الوبائي عند الخيل في سورية أو ما يسمى بالتهاب الأنف والرئة الفيروسي الخيلي أو إعتلال الدماغ والنخاع الشوكي الخيلي والمعروف عالمياً بالقـوباء الخيلية النمطين المصليين (EHV1 و EHV4). ينتشر هذا المرض بشكل كبير في كل بلدان العالم التي تعنى بتربية الخيول. يعتبر النمط المصلي EHV1 من الأمراض المجهضة للخيل كما أنه يسبب اضطرابات تنفسية وعصبية في حين أن النمط EHV4 يكون مسؤولاً عن الاضطرابات التنفسية. تم في هذه الدراسة التقصي مصلياً عن إصابة الخيول في سورية بأحد نمطي الفيروس المصليين (١ و ٤) وذلك في عينات دموية جمعت من ٢٠٣ خيول (حصان – فرس – مهر) غير ملقحة ضد المرض موزعة على خمس مناطق رئيسية لتشمل كامل سورية وذلك باستخدام إختبار المقايسة المناعية الأنزيمية غير المباشرة (الإليزا غير المباشرة). تم العثور على الأضداد الخاصة بالنمط EHV1 في المناطق الخمس بواقع ٧(٣,٥%) عينات إيجابية مصلياً كما تم العثور على الأضداد الخاصة بالنمط EHV4 في المناطق الخمس بواقع ١٩٥(٩٦%) عينة إيجابية مصلياً. وهذه أول دراسة للتقصي عن هذا المرض في سوريا.

SUMMARY

The objective of this study is, serological investigation of Epizootic Equine Abortion (EEA) or Equine Rhinopneumonitis (ER) Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy (EHM) that know worldwide Equid herpesvirus (EHV type 1 and 4) in Syria. Equid

herpesvirus 1 and 4 are widespread in the domestic horses population worldwide. EHV1 is a major cause of abortion, respiratory and neurological disorders in horses. EHV4 is responsible of respiratory disease. In this study, Antibodies of EHV1 and 4 were investigated serologically in horses in Syria. A total of 203 *unvaccinated* horses in five regions in Syria were sampled and tested using indirect ELISA. EHV1-specific antibodies were found to be in fifth regions as 7(3.5%). EHV4-specific antibodies were found to be in fifth regions as 195(96%). This is the first serological investigation for EHV1 and EHV4 in Syria.

Key words: *Epizootic equine abortion, equine herpesvirus, serology, Syria.*

INTRODUCTION
المقدمـــــة

إن مرض التهاب الأنف والرئة المعدي أو مرض الإجهاض الوبائي الخيلي (القوباء الخيلية النمطين EHV-1 و EHV-4) هو من الأمراض الحموية الخطيرة التي تصيب الخيول كما يعد هذا المرض العامل الرئيسي لظهور التهابات رشحية للأغشية المخاطية في الرأس مصحوبة بأعراض التنفسية وكذلك إجهاض الإناث الحوامل والاضطرابات العصبية والحمى ويسبب حدوث الالتهاب الرئوي الولادي عند الأمهار ونفوقها وكذلك حدوث الاعتلال الدماغي الشوكي عند الخيول في كل أنحاء العالم. وقد تم إثبات وجود هذا المرض منذ أكثر من ٦٠ عاما كمهدد لتربية الخيول العالمية (O'Callaghan *et al.,* 1983; Allen and Bryans, 1986 ; Bryans and allen, 1988; Allen *et al.,* 1999; Crabb and Studdert, 1995)

حتى عام ١٩٨١ كان يعتقد أن النمطين المصليين للحمة يشكلان نمطا مصليا واحداً والذي كان يعرف بالنمط المصلي ١ ويعرف كمرض باسم (الإجهاض الحموي الوبائي أو التهاب الأنف والرئة المعدي عند الخيول) حيث وجدت قرابة مصلية شديدة جدا بين (EHV-1) و(EHV-4) والطرق المصلية العادية المتبعة في الكشف عن الأضداد لا تستطيع الكشف إلا عن الأضداد المصلية للنمطين معا ولا يتم التفريق بينهما إلا بطرق متقدمة مثل تقنية (تفاعل البلمرة المتسلسل -PCR) فهما يمتلكان تتابــع متشابــه للنكليوتيدات حيث تصــل نسبــة التشابه من ٥٥% إلى ٨٤%

وكـــذلك تتابـــع متشابـــه للأحمـــاض الأمينيـــة يصل من ٥٥% إلى ٩٦%. (Telford *et al.*, 1992 ; 1998). لكن بينت نتيجة الفحوصات لتحديد البنية الداخلية النكليوزيدية للدنا أنهما حمتان مختلفتان مستضدياً وموروثياً وتنتميان إلى جنس الحمات الحماقية (*Varicellovirus*) التي تنتمي لتحت عائلة حمات القوباء ألفا (*Alphaharpesvirina*) (Studdert 1974; Sabine *et al.*, 1981) والتي بدورهـــا تنتمـــي إلـــى عائلـــة حمـــات القوبـــاء (*Herpesviridae*) (Carter and Wise, 2006).

ينتشر المرض في معظم دول العالم ويعد كمشكلة عالمية تهدد تربية الخيول في جميع أنحاء العالم (Matumoto *et al.*, 1965). وتأتي أهمية هذا المرض من الصفـــة التي يمتلكها العامل المسبب من خلال مرحلة الكمـــون التي تقـــوم بها الحمـــة داخل جسم الحيوان المصاب وعودة الأعراض بعد فترة من الشفاء (Edington *et al.*, 1994). يصيب المرض الخيول بالدرجة الأولى، ثم تأتي الحمير والبغال بالدرجة الثانية، بغض النظر عن العمر والجنس. ولكن لوحظ أن معظم الإصابات المبكرة تكون عند الخيول بعد إتمامها الشهر الثاني عشر من عمرها (Edington *et al.*, 1994). وهناك دراسات تدل على انتشـــار إصابات تنفسية كثيرة قبل سن الفطام عند الأمهار (Bryans, 1981)، كما بينت تقاريـــر بحثيـــة للتقصي عن المـــرض في أستراليـــا عن وجـــود أجســـام مضادة للمـــرض عند أمهـــار مـــن أمهـــات غير محصنـــة ضد المرض بعمر شهر واحد فقط (Gilkerson *et al.*, 1997).

ينتقل المرض عن طريق التماس المباشر بين الحيوانات المصابة والسليمة أو الحيوانات الحاملة للمرض. كما ينتقل عن طريق التماس غير المباشر بين الحيوانات المصابة أو الحاملة أو الناقهة والحيوانات غير المصابة وذلك عن طريق أدوات الحيوان والعلف والماء والتي تكون قد لوثت من قبل الحيوان المصاب. كما يمكن للعدوى أن تنتقل عن طريق أدوات الطبيب البيطري ، ينتقـــل العامـــل المســـبب أيضاً عن طريـــق الإفـــرازات الأنفيـــة والفموية (Doll and Bryans, 1963; Allen and Bryans, 1986). كما تعتبر الأجنة المجهضة والسوائـــل الجنينية الناتجة عـــن إجهـــاض الأفـــراس المصابة بالمرض مصدراً خطيراً للعدوى (Ballagi *et al.* 1990).

وقد لوحظ أن العدوى الكامنة تعود للنشاط بعد تعرض الحيوان الذي يحمل الإصابة للإجهاد. والأفراس المصابة بعدوى كامنة تكون مصدراً لإصابة جنينها بالمرض وعندما يولد هذا المهر يصبح بدوره مصدراً للعدوى (Gilkerson *et al.,* 1997). كما أن الإجهاد والعلاج بالستيروئيدات القشرية يؤدي أيضاً إلى تنشيط الحمة وعودة العدوى من جديد (Welch *et al.,* 1992; Slater 2007).

كذلك تستطيع الذكور المصابة أن تنقل العدوى أيضاً عن طريق الجماع حيث يتم طرح الحمة عن طريق السائل المنوي ولمدة طويلة. ووجد أيضاً أن الحمة تتفاعل مع الكابسول الذي يوجد في البويضة الملقحة وبالتالي بقاء هذه الحمة في الجنين رغم اضمحلال الكابسول بعد ٢٢- ٢٥ يوماً بعد التلقيح (Betteridge *et al.,* 1989; Carvalho *et al.,* 2000).

من أهم الأعراض التي تظهر على الحيوان الحمى حيث تصل درجة الحرارة إلى ٤٠ مْ (Allen and Bryans, 1986) والقهم (فقدان الشهية) (Studdert, 1974) مع أعراض تنفسية بعد فترة حضانة تمتد من ٣- ٦ أيام من التعرض لمصدر العدوى على شكل إفرازات أنفية مخاطية تتحول إلى قيحية نتيجة التهاب الأنف والرئة والتي تتطور نتيجة الإصابة الثانوية بالإضافة للسعال وزيادة الأصوات التنفسية والإفرازات العينية (Bryans and Allen, 1989). تحدث الإصابة التنفسية بشكل أكثر تكراراً ومصادفة لهذا المسبب في التجمعات التي تجرى للخيول بهدف التدريب والسباقات ومنافسات الفروسية الأخرى (OIE Terrestrial Manual 2008) تكون الإصابة التنفسية ناتجة عن الإصابة بالنمط الفيروسي ٤ عند الخيول بعمر فوق (٢-٣) سنة وتكون الأعراض متشابهة مع الإصابة التنفسية بالنمط ١ (Edington *et al.,* 1991). تحدث الإصابة التنفسية بالنمط (EHV-1) في الخيول اليافعة تحت ٢ سنة وفي الإناث الحوامل والإناث الضعيفة والذكور كبيرة العمر والضعيفة (Allen *et al.,* 2004) . إن الخطر التالي للإصابة التنفسية يكون من خلال إجهاض الإناث الحوامل والإصابات العصبية المركزية حيث يحدث الإجهاض بعد فترة حضانة تمتد من ٧ أيام إلى عدة أشهر (Bryans and Allen, 1989). إن حمة القوباء الخيلية النمط ١ هي من أهم العوامل الممرضة واسعة الانتشار من خلال إثارتها لعاصفة من الإجهاضات أو الانتشار الفردي عند الأفراس الحوامل وكذلك إحداث موت المواليد المبكر والإصابات التنفسية في الخيول الفتية وكذلك إحداثه للإعتلال الدماغي الشوكي

.(Van Maanen, 2002; Reed and Toribio 2004; Patel and Heldens, 2005)

تجهض الأفراس الحوامل عادةً في الفترة بين ٦ و ١١ شهراً من الحمل حتى في حالة عـدم وجـود علامـات سريريـة أخـرى للمـرض وتحـدث ٩٥% تقريباً من حالات الإجهـاض نتيجـة للإصابـة بالنمـط ١ في الثلث الأخيـر من الحمـل (Allen and Bryans, 1986). عندما تصاب الحوامل في الفترة الأخيرة من الحمل يلاحظ أنها تلد مواليد ميتة أو أمهار حية ضعيفة مصابة بالمرض تظهر عليها الأعراض فيما بعد وتنفق خلال ثلاثة أيام (Van Maanen *et al.*, 2000).

يتم تشخيص المرض حقلياً عن طريق مشاهدة الأعراض والصفة التشريحية أما التشخيص المخبري فيتم من خلال الفحص النسيجي مع عزل الفيروس من الأعضاء المتضررة (الكبد–الجنين المجهض–العقد البلغمية). يستخدم اختبار الـ PCR (Polymerase Chaine Reaction) لتشخيص الإصابة من خلال إكثار الحمض النووي الفيروسي للنمطين ٤/١ في العينات السريرية النسيجية حتى العينات المحفوظة بالبرافين أو المزروعة في الخلايا المعـدة لتكاثـر الفيـروس (Borchers and Slater, 1993) . أما التشخيص المصلي بطريقة الإليزا ELISA الكلاسيكية (Dutta *et al.*, 1983) واختبار تثبيت المتممة CFT وإختبار التألق المناعي IFT (Thomson *et al.*, 1976). وهذه الطرق الاعتيادية المصلية للكشف عن مرض الإجهاض الوبائي أو إلتهاب الأنف والرئة الخيلي لا تفرق بين الإصابة بالنمط المصلي ١ والنمط المصلي ٤ بسبب التفاعل المستضدي المتصالب للنمطين (Crabb and Studdert, 1993; Crabb and Studdert 1995; Hartley *et al.*, 2005). في أواسط التسعينات تم تطوير نوع خاص من الإليزا لتشخيص الإصابة بين النمطين ١ و ٤ يعتمد على تقنية جديدة تعتمد على اختلاف الجزء الطرفي (سي) البروتيني من البروتين السكري (جي) لكلا النمطين (ELISA based on the C-terminal portion of glycoprotein G of both viruses) تعـد الإليزا المطورة طريقـة يعتمـد عليـها ومفضلـة بسبب الفائدة التطبيقية لهـذا الإختبـار وحساسيتـه بالمقارنـة مع الاختبارات المصلية الأخرى. (Crabb and Studdert, 1993; Crabb and Studdert *et al.*, 1995; .Yasunaga *et al.*, 2000; Hartley *et al.*, 2005)

OBJECTIVES
أهداف البحث

١ – تحديد وجود الحالات الإيجابية مصليا لمرض الإجهاض الوبائي عند الخيول والمعروف عالميا بالقوباء الخيلي (EHV-1 و EHV-4) في سورية.

٢– تحديد نسبة هذه الحالات الإيجابية لتحديد انتشار المرض مصليا في المناطق المدروسة.

MATERIALS and METHODS
مـــواد وطرائق العمل

شمل البحث دراسة ناديين من أندية الخيول وعدد من المزارع الخاصة التي تعنى بتربية الخيل وقد بلغ مجموعها ٢٢ مزرعة وقد تم الحصول أيضا على عينات من مزارع خاصة لمربين هواة تحوي رأس أو رأسين من الخيل، وقد بلغ المجموع الكلي لعدد الحيوانات في هذه الأندية والمزارع ٣٩٨ رأس خيل، حيث أخذت عينات دم باستخدام أنابيب مفرغة من الهواء، وخالية من أي مانع تخثر، وذلك من ٢٠٣ رأس من الخيول (مهر – حصان – فرس حامل – غير حامل) وقد كانت الخيول التي أخذت منها العينات في هذا البحث غير محصنة ضد مرض الإجهاض الوبائي عند الخيل (القوباء الخيلية النمطين EHV4/EHV1) وتتراوح أعمارها بين ١ شهر حتى ٢٣ سنة، معظم الخيول لم تبد أي أعراض مميزة للمرض عند جمع عينات الدم وأكدت القصة المرضية (تاريخ الحالة) لمعظم هذه الخيول وجود أعراض تنفسية شائعة عند كل خيول الدراسة وأعراض فردية إجهاضية سابقة عند عدد من الأفراس المدروسة وسجلت حالة عصبية وحيدة فقط. بعد جمع العينات، نقلت إلى المخابر المعنية حيث ثفلت وجني مصل الدم وأخضع لاختبار الأليزا الغير مباشرة.

عينات المنطقة الجنوبية									
رقم العينة	اسم الخيل	الجنس	العمر	ملاحظات	مكان جمع العينات	EHV1	النتيجة ١	EHV 4	النتيجة ٤
1	مخفى	أنثى	2.5		دمشق	0.002	-	0.987	+
2	مخفى	أنثى	6		دمشق	0.136	-/+	0.804	+
3	مخفى	أنثى	3	حامل	دمشق	0.033	-	0.501	+
4	مخفى	أنثى	5		دمشق	0.089	-	0.861	+
5	مخفى	أنثى	11 شهر		دمشق	0.001	-	0.368	+
6	مخفى	أنثى	12	حامل	دمشق	0.015	-	0.829	+
7	مخفى	أنثى	4	حامل	دمشق	0.039	-	2.271	+
8	مخفى	ذكر	8		دمشق	0.022	-	0.86	+
9	مخفى	أنثى	23	اجهاض 4 أشهر	دمشق	0.002	-	0.46	+
10	مخفى	أنثى	4	والدة	دمشق	0.039	-	0.759	+
11	مخفى	أنثى	3		دمشق	0.005	-	1.455	+
12	مخفى	ذكر	2		دمشق	0.037	-	1.157	+
13	مخفى	أنثى	3.5		دمشق	0.196	-/+	1.78	+
14	مخفى	أنثى	3		دمشق	0.239	+	1.532	+
15	مخفى	أنثى	4		دمشق	-0.019	-	1.245	+
16	مخفى	انثى(ابنة17)	2		دمشق	0.004	-	0.03	-
17	مخفى	أنثى	5		دمشق	0.054	-	1.272	+
18	مخفى	أنثى	10	حامل ع الولادة	دمشق	0.022	-	1.299	+
19	مخفى	أنثى	2.5	التهاب صفائح	دمشق	-0.011	-	0.649	+
20	مخفى	أنثى	3.5	هولندى	دمشق	-0.017	-	1.37	+
21	مخفى	ذكر	4	بونى	دمشق	0.019	-	1.929	+
22	مخفى	أنثى	18	التهاب رحمية	دمشق	-0.004	-	1.392	+
23	مخفى	أنثى	7	حامل ٩ أشهر	دمشق	0.067	-	1.127	+
24	مخفى	ذكر	16		دمشق	0.015	-	1.471	+
25	مخفى	أنثى	4	حامل	دمشق	0.017	-	0.432	+
26	مخفى	أنثى	4	حامل	دمشق	0.111	-/+	1.287	+
27	مخفى	أنثى	7	حامل	دمشق	0.055	-	1.633	+
28	مخفى	ذكر	6		دمشق	0.041	-	1.508	+

صورة لقاعدة البيانات التى جمعت أثناء جمع العينات من المزارع المختلفة تبين نوع جنس ورقم العينة والملاحظات قبل عملية أخذ عينة الدم.

اختبار المقايسة المناعية المرتبط بالإنزيم ELISA للكشف عن الإجهاض الوبائي الخيلي:

استخدم كيت SVANOVIR®* وهو عبارة عن اختبار مقايسة مناعية مرتبطة بالإنزيم (ELISA)، من أجل الكشف عن الأضداد النوعية لحمة القوباء الخيلية النمطين EHV4/EHV1 وذلك لتحديد وجود الإصابة أو عدمها وكذلك التفريق بين الإصابة بالنمط EHV1 والنمط EHV4 . يتم الكشف عن هذه الأضداد النوعية في المصل والبلازما عند الخيول.

مبدأ الاختبار:

يتكون الكيت من أطباق خاصة باختبار الإليزا يحتوي كل منها على ٩٦ حفرة، مطلية من الداخل بالمستضدات الخاملة لحمة الإجهاض الوبائي – النمطين EHV1 و EHV4 حيث تتوزع الحفر في كل طبق على الشكل التالي:

- حفر الخطوط (١-٤-٧-١٠) تحتوي مستضدات خاصة بالنمط EHV1
- حفر الخطوط (٢-٥-٨-١١) تحتوي مستضدات خاصة بالنمط EHV4
- حفر الخطوط (٣-٦-٩-١٢) تكون حفر شاهدة.

يتم توزيع كل عينة من عينات الدم المأخوذة من الخيول على الخطوط الثلاثة السابقة الذكر الخاصة بالنمط ١ و ٤ والشاهد. بعد ذلك يتم الكشف عن هذه الأضداد النوعية المرتبطة بالحفر بواسطة أضداد ثانوية HRP conjugated rabbit–Anti-(IgG-horse) موسومة بالبيروكسيداز وجاهزة للاستعمال والتي تقوم بأكسدة الدارئة TMB (Substrate solution-TetraMethyl-Benzidine - TMB)، مما يؤدي إلى تشكل لون أزرق ثم أصفر عند إضافة محلول توقيف التفاعل (Stop Solution) الذي يحتوي على حمض السلفوريك. إن شدة اللون تتناسب طرداً مع كمية الأضداد النوعية للعينة الموجودة في الحفر، حيث يتم التشخيص عبر مقارنة الكثافة الضوئية الناتجة DO التي يتم الحصول عليها للعينات مع الشواهد.

طريقة العمل

توضع جميع مكونات التفاعل مع العينات في درجة حرارة الغرفة قبل البـــدء بالإختبار، مع رج العبوات جيداً قبل الاستخدام، ويتم الاختبار وفق الخطوات التالية:

١- يتم تمديد عينات المصل باستخدام المحل الخاص بالعينات بنسبة ١/١٠٠.

- SVANOVIR®- Equine Herpes Virus Type 1 and 4 Discriminating test (EHV1/EHV4-Ab)- SVANO

٢- نقوم بعد ذلك بتوزيع ١٠٠ ميكروليتر من كل عينة على ٣ حفر من حفر الطبق: حفرة للكشف عن الأضداد النوعية للنمط ١ وحفرة للكشف عن أضداد النمط ٤ وحفرة شاهد مستضدي (Control antigen)

٣- نقوم بإضافة ١٠٠ ميكروليتر من محلول الشاهد الإيجابي والسلبي في الحفر الخاصة بهما في كل طبق، كما نقوم بإضافة الشاهد الإيجابي للنمط ٤ في الحفر الخاصة على الطبق أيضاً. وهنا لابد من الإشارة أنه يمكن اختيار حفر الشاهد الإيجابي والسلبي ولكن من الأفضل التقيد بالتوصيات الخاصة بالشركة المصنعة.

٤- يغطى الطبق بشريط لاصق ويحضن مع الرج المستمر بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين وذلك باستخدام رجاج بطيء السرعة.

٥- تغسل كل حفرة ٤ مرات بواسطة ٣٠٠ ميكروليتر من محلول الغسيل PBS Tween buffer الممدد بالماء المقطر بنسبة ١/٢٠. ثم نقوم بتفريغه في حوض المغسلة وإجراء عدة ضربات للطبق على ورق نشاف مع مراعاة عدم تشكيل فقاعات داخل الحفر وإخراج محلول الغسيل بشكل كامل من الحفر.

٦- يضاف ١٠٠ ميكروليتر من محلول الأضداد النوعية الثانوية (HRP conjugated rabbit–Anti-IgG-horse) الموسومة بالبيروكسيداز.

٧- يحضن الطبق بدرجة حرارة الغرفة مع الرج المستمر لمدة ساعة واحدة.

٨- تكرر المرحلة رقم /٥/ من أجل الغسيل.

٩- يضاف ١٠٠ ميكروليتر من محلول الدارئة (Substrate solution-TetraMethyl-Benzidine, TMB) في كل حفرة ثم يحضن الطبق لمدة ١٠ دقائق بدرجة حرارة الغرفة. نبدأ بالتوقيت من لحظة ملئ أول حفرة من حفر الطبق. نلاحظ خلال التحضين ظهور اللون الأزرق الغامق في الحفر الحاوية على الأضداد النوعية لنوع المستضد الملتصق بالحفرة وكذلك ظهور اللون الأزرق في حفر الشاهد الإيجابي للنمطين (A1,A2) وحفرة الشاهد الإيجابي للنمط ٤ (C2).

١٠- يتم إيقاف التفاعل بإضافة ٥٠ ميكروليتر من المحلول الموقف للتفاعل بنفس الترتيب عند إضافة الدارئة للحفر كلها. نلاحظ عند ذلك تحول اللون الأزرق إلى اللون الأصفر مباشرةً.

١١- تقرأ النتيجة باستخدام مقياس الطيف الضوئي على موجة طولها ٤٥٠ نانومتر.

قراءة النتائج:

بعد قراءة الجهاز للطبق نقوم بتصحيح أرقام القراءة للطبق باستخدام معادلة التصحيح الخاصة بالشركة الصانعة وفق التالي:

الكثافة البصرية المصححة = الكثافة البصرية للحفرة الحاوية على المستضد **– الكثافة البصرية** للحفرة الحاوية على الشاهد المستضدي

OD Corr = OD Antigen - OD Control antigen

الكثافة البصرية المصححة للحفرة الحاوية على محلول الشاهد الإيجابي يجب أن تكون أعلى من ٠,٦ والحفر الحاوية على الشاهد السلبي يجب أن تكون كثافتها البصرية المصححة أقل من ٠,١.

تفسير النتيجة:

الكثافة البصرية > ٠,٢ : العينة المصلية إيجابية للحفرة.

الكثافة البصرية < ٠,١ : العينة المصلية سلبية للحفرة.

الكثافة البصرية ٠,١ – ٠,٢ : العينة المصلية مشتبهة.

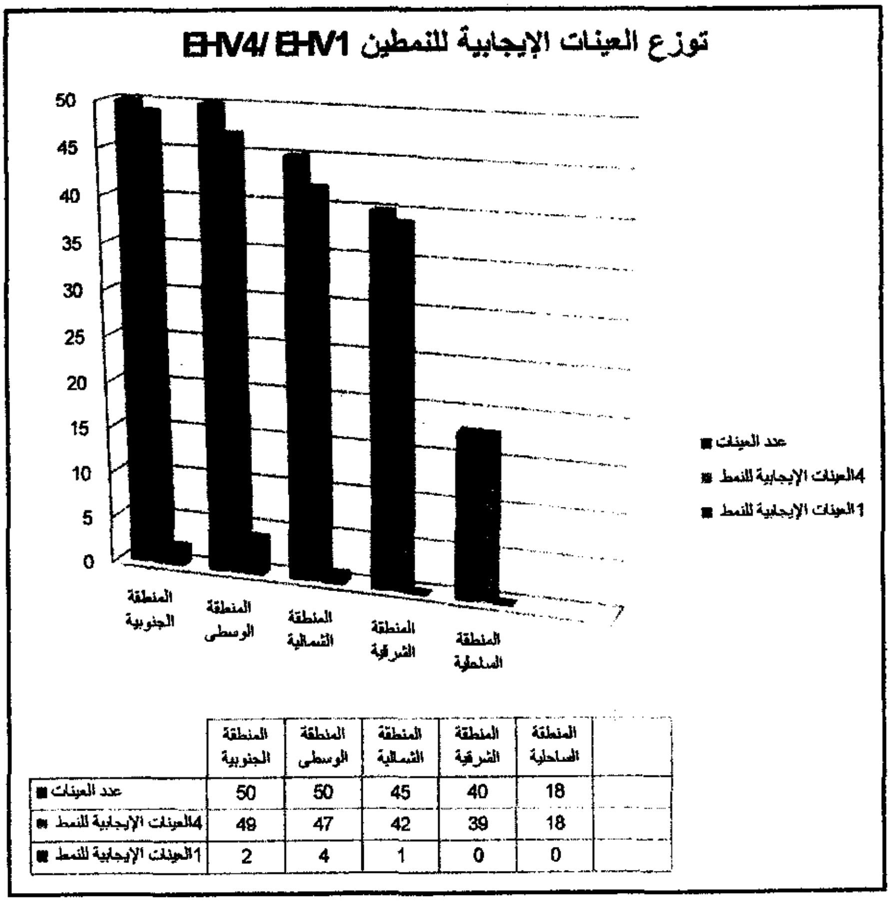
أما فيما يتعلق بالحساسية والنوعية لهذا الاختبار فقد درست من قبل كارفالو ورفاقه فكانت الحساسية ١٠٠% أما النوعية فكانت ٩٤,٧% (Carvalho *et al.*, 2000).

RESULTS
النتائج

أظهرت نتائج اختبار الإليزا غير المباشرة (المقايسة المناعية الأنزيمية) المستخدمة بهذه الدراسة إكتشاف الأضداد النوعية لحمة الإجهاض الوبائي النمط EHV1 في سبع حالات من مجموع الخيول التي أخذت منها العينات والبالغ عددها ٢٠٣ خيلاً (٧ / ٢٠٣) بنسبة إصابة تشكل ٣,٥%. وقد لوحظ من النتائج عدم تسجيل أي حالة إيجابية للنمط EHV1 في كل من المنطقة الساحلية والشرقية بينما كانت نسب الإصابة في كل من المنطقة الشمالية (٢,٢%) والوسطى (٨%) والجنوبية (٤%). أما بالنسبة للنمط EHV4 فقد سجلت النتائج إصابة ١٩٥ خيلاً من أصل ٢٠٣ وبنسبة إصابة وصلت إلى ٩٦%. كما لوحظ أن عدد الخيول التي أكتشفت فيها الأضداد النوعية للنمطين هي (٧) حالات فقط من مجموع الحالات المدروسة في هذا البحث (الجدول رقم ١).

الجدول رقم ١ : يبين توزع العينات الإيجابية مصلياً والنسب المئوية للإصابة لكلا نمطي المرض (EHV4/EHV1) في المناطق المختلفة من سورية.

اسم المنطقة	عدد العينات	النمط EHV1		النمط EHV4	
		العينات الإيجابية	نسبة الإصابة%	العينات الإيجابية	نسبة الإصابة%
المنطقة الجنوبية	٥٠	٢	٤	٤٩	٩٨
المنطقة الوسطى	٥٠	٤	٨	٤٧	٩٠
المنطقة الشمالية	٤٥	١	٢،٢	٤٢	٩٣،٣
المنطقة الشرقية	٤٠	٠	٠	٣٩	٩٧،٥
المنطقة الساحلية	١٨	٠	٠	١٨	١٠٠
المجموع الكلي	٢٠٣	٧	٣،٥	١٩٥	٩٦



التحليل الإحصائي للنتائج :

استخدمنا في التحليل الإحصائي لهذا المسح توزيع المعاينة للنسبة The Sampling Distribution of the Proportion:

إن مفهوم توزيع المعاينة للنسبة هو نفس ذلك التوزيع المتعلق بمعدلات العينات المدروسة فهو توزيع افتراضي لخصائص مشاهدات تكون فيها الفوائد مقدرة عندما نريد أن نحصل على استنتاج إحصائي للنسب المئوية لقطيع من القطعان أو مزرعة من المزارع أو مجموعات من حيوانات نريد دراستها.

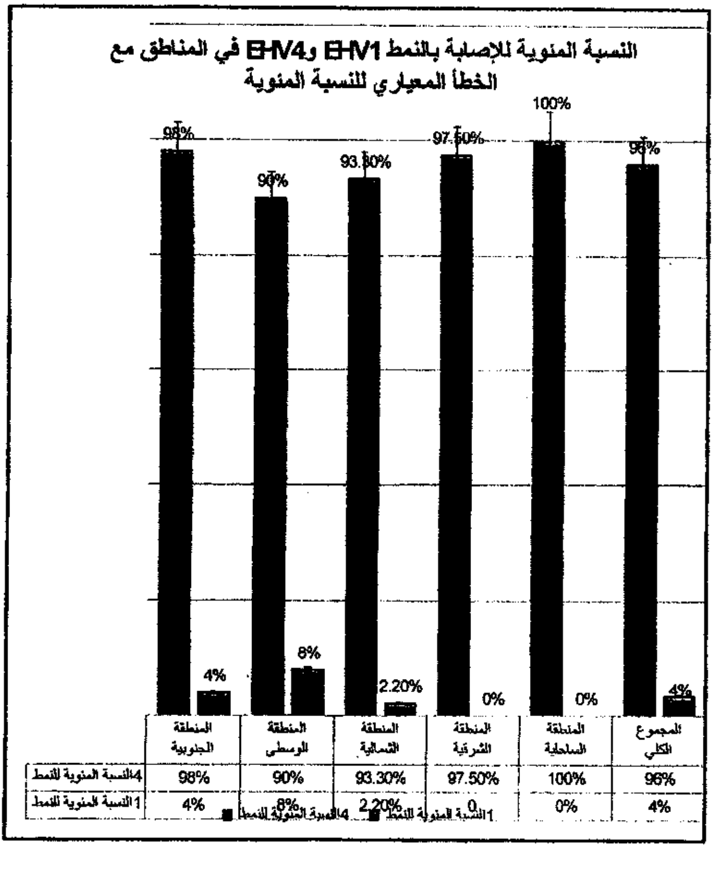
وبالتالي فإن النتائج تكون كالتالي :

$$(SE_{p1}=0.14)\ (0.013\text{-}0.07,\ CI\ 95\%)$$

ثقتنا (٩٥%) للنسبة الحقيقية للخيول التي تحمل أضداد إيجابية لمرض الإجهاض الوبائي عند الخيل (القوباء الخيلية النمط EHV1) مابين (٠,٠١٣ – ٠,٠٧)

$$(SE_{P4}=0.014)\ (0.93\text{-}0.98\ ,\ CI\ 95\%)$$

ثقتنا (٩٥%) للنسبة الحقيقية للخيول التي تحمل أضداد إيجابية لمرض الإجهاض الوبائي عند الخيل (القوباء الخيلية النمط EHV4) مابين (٠,٩٣ – ٠,٩٨)



DISCUSSION
المناقشـــة

إن الغاية من هذه الدراسة هي الكشف عن الأضداد الخاصة بالحمة المسببة لمرض الإجهاض الوبائي عند الخيول (النمطين EHV1 و EHV4) وحساب نسبة الإصابة الحقلية والكشف عن خطورة انتقال وتكاثر الحمة المسبب للمرض بين المناطق المدروسة.

فقد أكد الباحثون على أهميــة هذا المرض من حيث كمون الإصابة وعودتها في أي لحظة وسرعة انتشار هذا المرض وصعوبة الوقاية منــه وعلاجــه فهـــو مرض حموي يصيب الخيـــل يتصف بالحمى والتهاب رشحي للأغشيـــة المخاطيـــة للرأس والمجاري التنفسيـــة العليا وإجهاض الإناث الحوامل وظهـــور الأعــراض العصبيـــة وبالتالي الخسائر الفادحة التي تصيب هذا القطاع عند انتشار هذا المــرض (O'Callaghan *et al.,* 1983 ; Allen and Bryans, 1986 ; Bryans and Allen, 1988 ; Matsumura *et al.,* 1992 ; Crabb and Studdert, 1995 ; Allen *et al.,* 1999)

فقد أثبت وجود المرض في مناطق عديدة من العالم والتي تهتم بتربية الخيول وهي تعاني من المرض ولم تجد له حلولا مجدية حتى الآن رغم التطور الذي رافق تربيـــة هذه الحيوانات في الآونـــة الأخيـــرة والمبالغ الطائلـــة التي تصرف على هذه التربية فقـــد أثبت وجود المرض في بريطانيا (Powell *et al.,* 1976) وأمريـــكا (Doll and Bryans, 1963; Mumford *et al.,*1998) وكنـــدا (Carman *et al.,* 1997) وأستراليا (Bagust and Pascoe, 1968 ; Duxbury and Oxer, 1968 ; Studdert *et al.,* 1974 ; Crabb and Studdert, 1995; Gilkerson *et al.,* 1997 ; Gilkerson *et al.,* 1999) ونيوزيلندا (Jolly *et al.,* 1986) واليابان (Kawakami *et al.,* 1962) وتركيا (Gür,s and Yapici., 2008; Ataseven *et al.,* 2009) والإمارات (OIE,2010) وجنوب إفريقيا (Mason *et al.,* 1989).

إن المسوحات السابقة للكشف عن المرض والتي استعانت بالاختبارات المصلية مثل إختبار تثبيت المتممة واختبار التعادل المصلي لم تفلح في تحديد نمط الإصابة الحموية ولم تفرق بين الأضداد النوعية لكل نمط بسبب التفاعل التصالبي المستضدي للحمتين. وفي أواسط التسعينات تم تطوير نوع خاص من الإليزا

لتشخيص الإصابة بين النمطين EHV1 و EHV4 يعتمد على تقنية جديدة تعتمد على اختلاف الجزء الطرفي (C) البروتيني من البروتين السكري (G) (C-terminal portion of glycoprotein G) لكلا النمطين الحمويين. وتعد الإليزا المطورة طريقة مفضلة يعتمد عليها بسبب الفائــدة التطبيقيــة لهذا الإختبار وحساسيته بالمقارنــة مع الاختبارات المصلية الأخرى ; Crabb and Studdert 1993) .Crabb *et al.*,1997 ; Yasunaga *et al.*, 2000 ; Hartley *et al.*, 2005)

كما أكد (Van Maanen *et al.*, 2000) أن الإليزا أكثر حساسية من اختبار التعادل المصلي حيث وجد تقارب شديد بين الاختبارين، غير أن الإليزا أكثر حساسية فإن المعايير القليلة كانت تظهر نتيجة إيجابية في اختبار التحدي لجرعة ضعيفة من المرض في الحيوانات الخالية من المرض كما أن الإليزا تحسست لارتفاع الأضداد النسبي عند التطعيم الثانوي في اختبار التحدي نفسه كما أن الإليزا أسهل وأسرع من اختبار التعادل وهو يعتبر أداة ثمينة في تشخيص المرض بالطرق المصلية.

وقد قام (Yasunaga *et al.*, 1998) بإجراء مسح للتقصي عن المرض في اليابان بإستخدام طريقة الإليزا غير المباشرة المطورة التي تعتمد على الغليكوبروتين (glycoprotein Gs (gGs)) للنمط الحموي ١ والنمط ٤ وباستخدام هذه الطريقة تم التفريق بين الإصابتين وهذه التقنية هي نفس التقنية التي استخدمت في هذا البحث وهي نفسها التي تم اعتمادها في الكشف عن المرض في تركيا ;Gür, 2008) .Ataseven *et al.*, 2009)

في دراستنا هذه تم أخذ العينات من مزارع خيول متخصصة بتربية أفراس التكاثر ونوادي الخيل المتخصصة بتربية خيول القفز والرياضة المختلفة وخيول فردية في مزارع خاصة منتشرة على كافة منطقة الدراسة حيث بلغ عدد العينات ٢٠٣ عينة. أظهرت الإختبارات المصلية نسب إصابة متقاربة بالنمط٤ بين المناطق المدروسة، وقد سجلت أعلى نسبة للحالات الإيجابية مصليا للنمط ١ في المنطقة الوسطى حيث بلغت ٨% وسجلت أقل نسبة من الحالات الإيجابية مصليا في المنطقة الشمالية حيث بلغت ٢،٢% وبالمقابل سجلت أعلى نسبة حالات إيجابية للنمط ٤ في المنطقة الساحلية حيث بلغت ١٠٠%.

لقد كانت نتائج الإختبار مماثلة لتلك التي سجلت في الأبحاث التي جرت مسبقاً في دول مجاورة كتلك التي سجلت في مناطق قريبة من منطقتنا كتركيا فقد سيطرت الإصابة بالنمط ٤ على معظم النتائج الإيجابية مصلياً حيث بلغت نسبة الإصابة الكلية في هذا البلد بهذا النمــط ٥٧% من مجموع خيــول التجربة البالغ ١٨٨ عينة أما نسبة الإصابة بالنمط ١ فقد بلغت ٣،٧% من مجموع ١٨٨ عينة .(Gür, 2008)

وفي دراسة أخرى قام بها (Ataseven, 2009) وجد أن نسبة الإصابة بالنمط ٤ وصلت إلى ٨١% عام ٢٠٠٩ في تركيا. أما في اليابان فقد بينت الدراسات أن النتائج الإيجابية مصلياً كانت كالتالي: ٨٠/٣٠ عينة إيجابية مصلياً بالنمط ١ و ٨٠/٩ عينة إيجابيـــة مصليـــا للنمـــط ٤ وذلك عام ١٩٩٥- ١٩٩٦ وذلك حـــســب (Yasunaga, 1988)

وحسب تقارير مكتب الأوبئة الدولي للعينات الواردة إلى المخابر كانت النتائج في الإمارات العربية المتحدة تم الاشتباه بثلاث حالات إصابة بمرض الإجهاض الوبائي تبين وجود حالة إيجابية واحدة بعد عمليات عزل الفيرس (OIE, 2010) أما في جنوب إفريقيا فقد وصلت نسبة الإصابة بالمرض ٦,٧٧% من مجموع عينات مشتبه قدرها ٣٢٥ عينة مشتبه بالمرض (OIE, 2009) كما بنت تقارير مكتب الأوبئة الدولي نشر في موقع إلسيفر وجود حالات إيجابية في فلسطين المحتلة فقد تم إثبات أربع حالات إيجابية بالمرض من بين عشرين حالة مشتبه جمعت من عدة مناطق (intl.elsevierhealth.com/journals/trst) كما أكد كراب ورفاقه (Crabb *et al.*, 1997) أنه في إحدى الدراسات للتقصي باستخدام الإليزا المطورة عن القوباء الخيلية النمطين المصليين ٤/١ كانت كل العينات إيجابية للنمط المصلي ٤ وهذا ما يتوافق مع النتائج التي حصلنا عليها في هذه الدراسة.

وحســـب دراســـات أخرى قام بها ; Crabb and Studdert, 1993) Gilkerson *et al.*, 1994 ; Van Maanen *et al.*, 2000)، فإن النمط ١ يسبب إصابات مرضية أكثر خطورة من الإصابات التي يسببها النمط ٤ .

يستنتج من هذه الدراسة إن مرض الإجهاض الوبائي هو تطور للإصابة بحمة القوباء الخيلية النمط ١ الذي يترافق بإصابة تنفسية بداية ثم يتطور للإجهاض وقد يتطور للإصابة العصبية. وأن انتشار مرض الإجهاض الوبائي في سورية لا يزال محدوداً ولم تتعد نسبة الإصابة الكلية في جميع مناطق الدراسة الـــ ٣,٥%. إن انتشار الشكل التنفسي غير الخطير كان مرتفعاً فقد وصلت نسبة الإصابة في بعض المناطق حتى ١٠٠%. وإن انتشار الشكل التنفسي للمرض كان نتيجة الصفات الخاصة التي يتمتع بها فيروس القوباء من حيث الإصابة الكامنة وسرعة الإنتشار. وقد توفرت بعض العوامل التي ساعدت على انتشار الشكل التنفسي ألا وهي انعدام إجراءات الأمن الحيوي في أغلب الإسطبلات التي تمت زيارتها والإفراط من قبل مربي الخيول في الاعتماد على الكلافين في إعطاء الأدوية بصورة عشوائية دون الاستعانة بالطبيب البيطري. وقد لوحظ عدم جدوى استخدام اللقاح ضد مرض الإجهاض الوبائي حتى تاريخ كتابة هذا البحث.

REFERENCES

Allwn, G.P.; Kydd, J.H.; Slater, J.D. and Smith, K.C. (1999): Recent advances in understanding the pathogenesis, epidemiology, and immunological control of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion. Equine Infect. Dis., 8: 129–146.

Allen, G.P.; Kydd, J.H. and Slater, J.D. (2004): Equid herpesvirus 1 and equid herpesvirus 4 infections. In: Coetzer JAW, Tustin RC, eds. Infectious Diseases of Livestock, 1st ed. Newmarket: Oxford University Press., 829–859.

Allen, G.P. and Bryans, J.T. (1986): Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infection. in Veterinary Microbiology and Immunology, 2: 78–144.

Ataseven, V.S.; Dagalp, S.B.; Güzelm, Basaran, Z.; Tan, M.T. and Geraghty, B. (2009): Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. Res. Vet. Sci., 86(2): 339-44.

Bagust, T.J. and Pascoe, R.R. (1968): Isolation of equine rhinopneumonitis virus from acute respiratory disease in a horse in Queensland.Aust. Vet. J., 44: 296.

Ballagi, A.; Klingeborn, B.; Flensburg, J. and Belak, S. (1990): Equine herpesvirus type 1: detection of viral DNA sequences in aborted fetuses with the polymerase chain reaction. Vet. Microbiol., 22: 373–381.

Betteridge, K.J. (1989): The structure and function of equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. Equine Vet. J., 8: 92–100.

Borchers, K. and Slater, J. (1993): A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. J. Virol. Methods, 45: 331–336.

Bryans, J.T. and Allen, G.P. (1988): Herpesviral diseases of the horse. In: Herpesvirus Diseases of Animals,Wittman G., ed. Kluwer, Boston, USA, 176–229.

Bryans, J.T. and Allen, G.P. (1989): Herpesviral diseases of the horse. In: Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs, Ed: G. Wittmann, Kluwer, Boston, pp. 176-229.

Bryans, J.T. (1981): Application of management procedures and prophylactic immunization to the control of equine rhinopneumonitis. In: Proc. Am. Ass. Equine Practnrs, Anaheim, pp. 259-272.

Carman, S.; Rosendal, S.; Huber, L.; Gyles, C.; Mckee, S.; Willoughby, R.A.; Dubovi, E.; Thorsen, J. and Lein, D. (1997): Infectious agents in acute respiratory disease in horses in Ontario. J. Vet. Diagn. Invest., 9: 17–23.

Carter, G.R. and Wise, D.J. (2006): A Concise Review of Veterinary Virology, International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 9-May-2006; A3411.0506.

Carvalho, R.; Passos, LMF.; Gouvea, A.M.G.; Resende, M.; Martins, A.S. and Franco, G.C. (2000): Use of an ELISA system for detection of equine herpesvirus 1 (EHV-1) antibodies in non-symptomatic pregnant mares and neonatal foals. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 52, 3.

Carvalho, R.; Passos, LMF.; Oliveira, AM.; Henry, M. and Martins, A.S. (2000): Detection of equine herpesvirus 1 DNA in a single embryo and in horse semen by polymerase chain reaction. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 4–52.

Crabb, B.S. and Studdert, M.J. (1995): Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). Adv. Virus Res., 45: 153–190.

Crabb, B.S. and Studdert, M.J. (1993): Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the c-termini elicit type-specific antibody responses in the natural host. J. Virol., 67: 6332-6338.

Crabb, B.S. and Studdert, M.J. (1994): Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). Adv. Virus Res., 45: 153-190.

Crabb, B.S.; Macpherson, C.M.; Reubel, G.H.; Browning, G.F.; Studdert, M.J. and Drummer, H.E. (1997): Archives of Virology, 140(2): 245-258.

Doll, E.R. and Bryans, J.T. (1963): A planned infection program for immunizing mares against viral rhinopneumonitis. Cornell. Vet., 53: 249-262.

Dutta, S.K.; Talbot, N.C. and Myrup, A.C. (1983): Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res., 44: 1930 -1934.

Duxbury, AE. and Oxer, D.T. (1968): Isolation of equine rhinopneumonitis virus from an epidemic of acute respiratory disease in horses. Aust. Vet. J., 44: 58–63.

Edington, N.; Smith, B. and Griffiths, L. (1991): The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and fetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortions. J. Comp. Pathol., 104: 379-387.

Edington, N.; Welch, H.M. and Griffiths, L. (1994): The prevalence of latent equid herpesviruses in the tissues of abattoir horses. Equine Vet. J., 26: 140-142.

Gilkerson, J.R.; Jorm, L.R.; Love, D.N.; Lawrence, G.L. and Whalley, J.M. (1994): Epidemiologic investigation of equid herpesvirus 4 (EHV 4) excretion assessed by nasal swabs taken from Thoroughbred foals. Vet. Microbiol., 39: 275-283.

Gilkerson, J.R.; Love, D.N. and Whalley, J.M. (1997): Serological evidence of equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in Thoroughbred foals 30–120 days of age. Aust. Equine Vet., 15: 128–134.

Gilkerson, J.R.; Teague, N.; Whalley, J.M. and Love, D.N (1999): Aprospective cohort study of upper respiratory tract disease in one and two-year old racehorses. Serological evaluation of the roleof equine herpesviruses 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) in respiratory disease. Aust. Equine Vet. J. 17: 76–81.

GÜr, S. and Yapici, O. (2008): Equine herpesvirus type 1 and 4 in individually reared horses in central and western Turkey. Acta Vet. Brno., 77: 609-613.

Hartley, C.A.; Wilks, C.R.; Studdert, M.J. and Gilkersony, J.R. (2005). Comparison of antibody detection assays for the

diagnosis of equine herpesvirus 1 and 4 infections in horses. Am. J. Vet. Res., 66: 921-928.

Jolly, P.D.; FU, Z.F. and Rorbinson, A.J. (1986): Viruses associated with respiratory disease of horses in New Zealand: an update. N. Z.Vet. J., 34: 46–50.

Kawakami, Y.; Kaji, T.; Ishizaki, R.; Shimizu, T. and Matumoto, M. (1962): Etiologic study on an outbreak of acute respiratory disease among colts due to equine rhinopneumonitis virus. Jpn. J. Exp.Med., 32: 211–229

Mason, D.K.; Watkins, K.L. and Luk, C.M. (1989): Haematological changes in two Thoroughbred horses in training with confirmedequine herpesvirus 1 infections. Vet. Rec., 124: 503–504.

Matsumura, T.; Sugiura, T.; Imagawa, H.; Fujanaga, Y. and Kamada, M. (1992): Epizootiological aspects of type 1 and type 4 equine herpesvirus infections among horse populations. J. Vet. Med. Sci., 54(2): 207-211.

Matumoto, M.; Ishizaki, R. and Shimizu, T. (1965): Serological survey of equine rhinopneumonitis virus infection among horses in various countries. Arch. Ges. Virusforsch., 50: 609–623.

Mumford, J.A.; Traub Dargatz, J.L.; Salman, M.D.; Collins, J.K.; Getzy, D.M. and Carman, J. (1998): Monitoring and detection of acute viral respiratory tract disease in horses. J. Am. Vet. Med. Assoc., 213: 385–390.

O'callaghan, D.J.; Gentry, G.A. and Randall, C.C. (1983): The equine herpesviruses. In: Roizman B, editor. The Herpesviruses. New York: Plenum Press., p. 215–318.

OIE Terrestrial Manual, (2008): Chapter 2.5.9. - Equine rhinopneumonitis 849, 903.

OIE, WWW.oie.int, Information received on (2009): from Mr Bothle Michael Modisane, Chief Director Food and Veterinary Services, Department of Agriculture, Food Safety and Biosecurity: Department of Agriculture, PRETORIA, South Africa.

OIE, WWW.oie.int, Information received on (2010): from Eng Sumaia Al Rais, Head of Animal and Plant Health, Animal

and Plant Health Department, Ministry of Environment and Water, Dubai, United Arab Emirates.

Patel, J.R. and Heldens, J. (2005): Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. The Veterinary Journal, 170: 14–23.

Powell, D.G.; Burrows, R.; Spooner, P.R.; Goodridge, D.; Thomson, G.R. and Mumford, J. (1976): A study of infectious respiratory disease among horses in Great Britain, 1971 to 1976. In: Bryans, J., Gerber, H. (Eds.), Proceedings of the Fourth International Conference on Equine Infectious Diseases, Veterinary Publications, New Jersey, pp. 451–459.

Reed, S.M. and Toribio, R.T. (2004): Equine herpesvirus 1 and 4. Veterinary Clinics of North America Equine Practice, 20: 631–642.

Sabine, M.; Robertson, G.R. and Whalley, J.M. (1981): Differentiation of sub-types of equine herpesvirus 1 by restriction endonuclease analysis. Aust. Vet. J., 57: 148-149.

Slater, J. (2007): Equine herpesviruses. In: Sellon, D., Long, M. (Eds.), Equine Infectious Diseases. Saunders Elsevier, St. Louis, USA, pp. 134–153.

Studdert, M.J. (1974): Comparative aspects of equine herpesviruses. Cornell. Vet., 64: 94-122.

Telford, E.A.R.; Watson, M.S.; Mcbride, K. and Davison, A.J. (1992): The DNA sequence of equine herpesvirus-1. Virology, 189: 304–316.

Telford, E.A.R.; Watson, M.S.; Perry, J.; Cullinane, A.A. and Davison, A.J. (1998): The DNA sequence of equine herpesvirus 4. J. Gen. Virol., 79: 1197–1203.

Thomson, G.R.; Mumford, J.A.; Campbell, J.; Griffiths, L. and Clapham, P. (1976): Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. Equine Vet. J., 8: 58–65.

Van Maanen, C. (2002): Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update.Veterinary Quarterly, 24: 58–78.

Van Maanen, C.; Vreeswijk, J.; Moonen, P.; Brinkhof, J.; De Boer-Luijtze, E. and Terpstra, C. (2000): Differentiation and genomic and antigenic variation among fetal, respiratory and neurological isolates from EHV 1 and EHV 4 infections in the Netherlands. Vet. Q., 22: 88-93.

Welch, H.M.; Bridges, C.G.; Lyon, A.M.; Griffiths, L. and Edington, N. (1992): Latent equid herpesviruses 1and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. J. Gen. Virol., 73: 261-268.

Yasunaga, S.; Maeda, K.; Matsumara, T.; Kondo, T. and Kai, K. (2000): Application of a type spesific enzymelinked immunosorbent assay for equine herpesvirus types 1 and 4 (EHV-1 and -4) to horse populations inoculated with inactivated EHV-1 vaccine. J. Vet. Med. Sci., 62: 687-691.

Yasunaga, S.; Maeda, K.; Matsumara, T.; Kai, K.; Iwata, H. and Inoue, T. (1998): Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Japan. Diagnosis and sero-epizootiology of equine herpesvirus type 1 and type 4 infections in Japan using a type-specific ELISA. J. Vet. Med. Sci., 60(10): 1133-1137.