آلودگی جنین‌های سقط شده گوسفند به *بروسلا ملیتنسیس* در شهرستان گنبد کاووس. ۹۴-۱۳۹۵

نجم الدین محمدی[۱]، محسن نجیمی[۲]*، داریوش سعادتی[۳]، فرهاد تکه[۴]

۱- دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- گروه تغذیه و اصلاح نژاد دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۴- دکترای دامپزشکی، شبکه دامپزشکی گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

***نشانی برای مکاتبه :** تلفن: ۰۰۹۸۵۴۳۱۲۳۲۲۵۴ ، نمابر: ۰۰۹۸۵۴۳۱۲۳۲۲۵۴ ، mohsen.najimi99@gmail.com

دریافت مقاله: اسفند نود و هفت پذیرش برای چاپ: اردیبهشت نود و هشت

چکیده

سابقه و هدف: *بروسلوز از مهمترین بیماری‌های زئونوز است که در میان سویه‌های گوناگون باکتری بروسلا، سویه ملیتنسیس با مخزن گوسفندی، حادترین و شایع‌ترین عامل تب مالت در انسان محسوب می‌شود که با ایجاد سقط و کاهش تولید شیر در گوسفند، سبب مشکلات اقتصادی در دامپروری می‌گردد. پیشگیری بیماری با شناسایی و کنترل مخزن بیماری، مهمترین اولویت سازمان‌های بهداشتی به منظور ریشه کنی کامل بروسلوز است. در این مطالعه به شناسایی بروسلا ملیتنسیس از موارد سقط گوسفندی در شهرستان گنبد کاووس پرداختیم.*

روش‌کار: *از محتویات شیردان ۵۷ جنین سقط شده گوسفند نمونه تهیه گردید سپس استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری استخراج ژن انجام گردید و به منظور شناسایی بروسلا ملی تنسیس، نمونه‌های اخذ شده به وسیله PCR مورد آزمون قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *نتایج PCR نشان داد از ۵۷ نمونه اخذ شده در شهرستان گنبدکاووس، ۱۰ مورد (۱۷٪/۵) آلوده به بروسلا ملیتنسیس بودند.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به شناسایی موارد مثبت بروسلوز در گوسفندان شهرستان گنبد کاووس، به منظور پیشگیری و ریشه کنی بیماری، برگذاری کلاس‌های آموزشی برای دامداران، واکسیناسیون و حذف موارد مثبت در سطح کل دام‌های شهرستان ضروری است.*

واژگان کلیدی: بروسلا ملیتنسیس، جنین‌های سقط شده گوسفند، شهرستان گنبد کاووس

مقدمه

بروسلوز توسط باکتری‌های خانواده *بروسلا* ایجاد می‌شود و بیماری مشترک بین انسان و حیوان است(۱). بیماری گسترش جهانی دارد به طوری که سالیانه حدود ۵۰۰ هزار مورد ابتلا انسانی گزارش می‌شود، که به علت وجود مخزن حیوانی، متاسفانه علی رغم تلاش‌های فروان و صرف هزینه‌های بالا به منظور کنترل بیماری، بروسلوز در منطقه خاورمیانه و کشورمان ایران اندمیک است(۲). بیماری در حیوانات سبب سقط جنین، کاهش تولید شیر و نازایی می‌گردد و باکتری از طریق مصرف محصولات لبنی آلوده، تماس مستقیم پوست، مخاطات، گوشت و خون آلوده حیوان به انسان منتقل می‌شود و علائمی چون خستگی، درد ستون مهره‌ها، کاهش وزن، تورم عقده‌های لنفاوی، تب و تعریق را در پی دارد(۳).سویه *ملیتنسیس* که مخزن آن گوسفند و بز است، شایعترین عامل بروسلوز است که بیماری حاصل از آن در انسان از سایر سویه‌ها شدیدتر و حادتر بروز می‌کند(۴). هر چند بیماری در برخی از کشورها چون آمریکا، کانادا، استرالیا و پرتغال با اتخاذ تصمیماتی چون تست و کشتار و واکسیناسیون دام‌ها ریشه کن شده است اما در ایران به دلیل مرزهای طولانی و عدم نظارت بر ورود دام، عدم اجرای منظم و مداوم سیاست تست و کشتار و پراکندگی جمعیت دامی هنوز موارد بالای بروز بیماری از نقاط مختلف کشورمان گزارش می‌شود(۵ و ۶). متاسفانه به علت برخی مشکلات از سال ۱۳۸۳ تست و کشتار گوسفندهای مبتلا به بروسلوز در کشورمان متوقف شده است که این خود احتمال گسترش

بیماری را در جمعیت دامی کشور بالا برده است(۷). تحقیقات نشان داده است ضعف برنامه در مهار بروسلوز که با تکیه بر واکسیناسیون در گوسفند و بز استوار است و با کم توجهی به سیستم مراقبت و آگاهی از آخرین تغییرات شیوع بیماری در حیوانات همراه است، نتواسته در مهار و ریشه کنی بیماری نقش حداکثر خود را ایفا کند(۸).باشناسایی بروسلوز در گله‌های گوسفند، علاوه براینکه کانون‌های خطر بیماری تعیین می‌گرددو با واکسیناسیون به موقع دام‌ها از شیوع بیماری انسانی و دامی پیشگیری می گردد تا ضمن بالابردن بهداشت جامعه، در ارتقا راندمان اقتصادی دامداری‌ها نیز قدمی مؤثر برداشته شود(۹). با توجه به حاصل خیز بودن مراتع استان‌های شمالی، اشتغال بالای مردم به دامداری به خصوص گوسفندداری، مهاجرت عشایر و نیاز ضروری به تحقیقات کافی بر روی موارد بروسلوز منجر به سقط(۱۰)، سبب شده در این مطالعه به جداسازی بروسلوز *ملیتنسیس* از جنین‌های سقط شده گوسفندان، در شهرستان گنبد کاووس بپردازیم.

روش کار

با همکاری شبکه دامپزشکی شهرستان گنبد کاووس طی مرداد سال ۹۴ تا اردیبهشت سال ۹۵ موارد سقط جنین گوسفندی ارجاع شده به شبکه دامپزشکی شامل ۵۷ نمونه جنین جمع آوری و در شرایط استریل محتویات شیردان آنها اخذ گردید و در دمای ۲۰- نگهداری گردید(۱۱).

کنترل مثبت مورد استفاده در مراحل مختلف از نوع سویه S این طرح در مورد جنس *بروسلا*، واکسن۱۹ زنده تخفیف حدت یافته *بروسلا* ابورتوس بود(۱۱).

استخراج DNA، با استفاده از کیت ویژه عرضه شده توسط شرکت سیناژن (High yield DNA purification kit) DNPl صورت گرفت.یک میلی لیتر از شیرابه شیردان در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و سپس مراحل استخراج مطابق دستورالعمل ارائه شده همراه کیت مذکور انجام شد(۱۱).پس از بررسیهای مختلف و ارزیابی حالات گوناگون از نظر میزان و ترکیب مواد و دمای مراحل مختلف قسمتهای دو گانه آزمایشات مولکولی راه اندازی شد. پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ نشان داده شده است. سنتز آغازگرها توسط شرکت پیشگام انجام شد.

Gene	Primers	Product length	Microorganism	Reference
B. melitensis IS711	F:AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA R:TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT	731 bp	*Brucella melitensis*	(Unver et al., 2006)

آزمون PCR با استفاده از PCR buffer 10x به میزان ۰/۷۵میکرولیتر، ۵۰ میلی مول MgCl2 به میزان ۱ میکرولیتر، (*dNtp(Mix*) به میزان ۰/۷۵ میکرولیتر، از هر پرایمر ۱/۵ میکرولیتر، DNA به میزان ۲ میکرولیتر، *DNA polymerase taq* ۵u/ml به میزان ۰/۱۵ میکرولیتر، آب به میزان ۱۵ میکرولیتر، به حجم کلی ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. پس از تهیه حجم فوق و سانترفیوژ کردن لوله‌ها، آنها را در داخل دستگاه ترمو سایکلر قرار داده شد (ساخت شرکت Eppendorf) و برنامه دمایی PCR هم به این صورت بود: مرحله واسرشت اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت و بدنبال آن ۳۰ سیکل دمایی انجام شد. در طی این ۳۰ سیکل واسرشت به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال پرایمر ها (Annealing) به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۷ سانتی گراد ومرحله امتداد (Extension) به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت. و در نهایت بعد از اتمام سیکل ها امتداد نهایی نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت پذیرفت(۱۱).

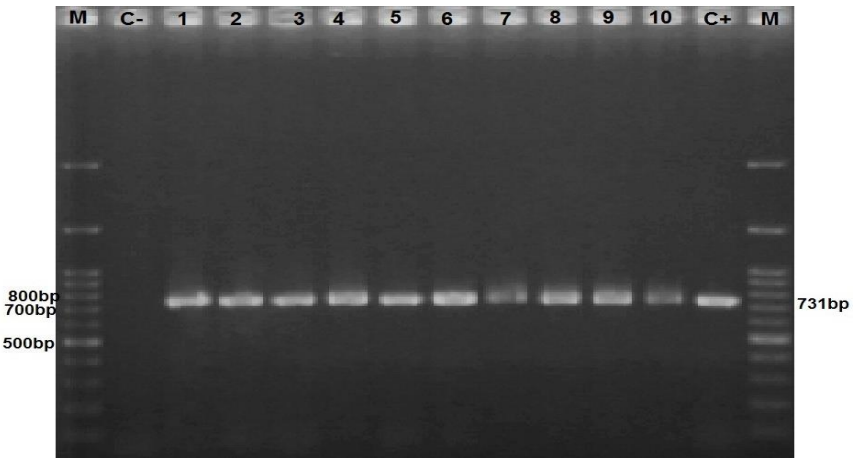
پس از روشن و کالیبره کردن دستگاه، ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر را به عنوان Blank در کووت مخصوص اضافه و میزان جذب صفر گردید. سپس به همان حجم قبلی ولی این بار با محلولی شامل ۵ میکرولیتر از نمونه DNA که به وسیله ۹۹۵ میکرولیتر آب مقطر رقیق شده(رقت ۱:۲۰۰) را در کووت دستگاه ریخته و در ادامه مقدار غلظت و همچنین خلوص DNA استخراج شده بر اساس نسبت جذب نوری در طول موج های nm ۲۶۰ به nm ۲۸۰ خوانده شد.جذب نوری برابر با یک در طول موج nm ۲۶۰ معادل ۵۰ میکروگرم DNA دو رشته ای در یک میلی لیتر آب مقطر است(۱۱).

برای مشاهده کیفیت DNA استخراج شده و محصولات حاصل از واکنش PCR از روش الکتروفورز با ژل ۲٪ استفاده شد. به منظور ساخت ژل الکتروفورز مناسب و دارای ویژگی های لازم برای بارگذاری، پس از حل کامل آگارز در بافر TAE(1X) به کمک حرارت و شفاف شدن محلول (برای مثال ۲ گرم آگارز برای ۱۰۰ میلی لیتر بافرTAE)، لازم است آن را برای مدتی در دمای اتاق گذاشته تا خنک شود. پس از قرار دادن شانه ها درون سینی الکتروفورز، محلول خنک شده به آرامی و تاجایی که قسمتی از ارتفاع شانه ها را بپوشاند به درون سینی ریخته می شود. پس از سرد و سفت شدن محلول و تشکیل ژل، شانه را به آرامی خارج کرده تا از چاهک های بر جای مانده به عنوان محل قرار دادن نمونه ها استفاده شود. سپس سینی حاوی ژل به تانک الکتروفورز منتقل و بافر TAE(1X) به میزانی که ژل و چاهک ها را بپوشاند به درون تانک اضافه گردید. سپس محصولات واکنش PCR به حجم ۵ میکرولیتر، با استفاده از سمپلر درون چاهک ها بارگذاری شد. در این آزمایش از مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد. ولتاژ و جریان دستگاه الکتروفورز به ترتیب ۸۰ ولت و ۲۲۰ میلی آمپر بود و مدت زمان بارگذاری در ژل ۷۵ دقیقه تنظیم گشت. محصولات PCR بارگذاری شده، بر اساس وزنی که داشتند در زمان یکسان مسافت متفاوتی را روی ژل طی کرده و به این ترتیب محصولات بارگذاری شده مشخص شدند. ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید (۱۰mg/ml) رنگ آمیزی شد و با استفاده از دستگاه ژل داک (BIO RAD) زیر نور ماوراء بنفش بررسی و نتایج مشاهده و ثبت گردی (۱۱).

در تحقیق حاضر سابقه تجویز آنتی بیوتیک، شکم زایش میش و سن جنین به عنوان متغیرهای مستقل درنظر گرفته شدند، ارتباط بین متغیرهای مستقل با متغیر وابسته (آلودگی جنین سقط شده به *بروسلا ملیتنسیس*) توسط آزمون دقیق فیشر بررسی شد. حدود اطمینان ۹۵٪ برای شیوع آلودگی با استفاده از توزیع دو جمله‌ای محاسبه شد. تجزیه و تحلیل ها به کمک نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ انجام گرفت. سطح معنی داری P <۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از مجموع ۵۷ نمونه جنین سقط شده گوسفند اخذ شده طی ۷ ماه (مرداد سال ۹۴ تا اردیبهشت سال ۹۵) در شهرستان گنبد کاووس، پس از تست قطعی PCR، تعداد ۱۰ نمونه (۱۷/۵ درصد، با حدود اطمینان ۹۵٪: ۸/۷ درصد تا ۲۹/۹ درصد) از نظر وجود *بروسلا ملیتنسیس* مثبت بودند (شکل ۱- PCR جنس *بروسلا ملیتنسیس*). در این مطالعه هیچ یک از میش های سقط کرده بر علیه بروسلوز واکسینه نشده بودند. ارتباط بین شیوع بروسلوز و متغیرهای مستقل در جدول ۲ نشان داده شده است. اطلاعات مربوط به شکم زایش تنها در مورد ۲۱ میش در دسترس بود. ارتباط بین متغیرهای مستقل (سابقه مصرف آنتی بیوتیک، شکم زایش و سن جنین سقط شده) با آلودگی به *بروسلا* از نظر آماری معنی دار نبود



شکل ۱) PCR جنس *بروسلا ملیتن*

جدول ۲) شیوع آلودگی با *بروسلا ملیتنسیس* در جنین های سقط شده مورد بررسی بر حسب متغیرهای مستقل

متغیر مستقل	سطوح متغیر	تعداد حیوانات مورد بررسی	حیوانات آلوده به بروسلوز		P Value
			تعداد حیوانات آلوده	شیوع آلودگی(درصد)	
سابقه مصرف آنتی بیوتیک	مصرف آنتی بیوتیک	۸	۱	۱۲/۵	۰/۵۷۱
	عدم مصرف آنتی بیوتیک	۴۹	۹	۱۸/۴	
شکم زایش میش سقط کرده	یک شکم زایش	۱۴	۱	۷/۱	۰/۶۶۷
	چند شکم زایش	۷	۰	۰	
سن جنین سقط شده	نیمه اول جنینی	۳	۰	۰	۰/۵۵۴
	نیمه دوم جنینی	۵۴	۱۰	۱۸/۵	

بحث

در ایران در موارد سقط باکتریایی گوسفندان، بروسلوز ملی تنسیس در کنار کمپیلوباکتر فتوس و کلامیدوفیلا آبورتوس بیشترین شیوع و اهمیت را دارند و در موارد انسانی هم خراسان شمالی و قسمت‌های شرقی استان گلستان به عنوان کانون‌های شیوع بروسلوز مطرح می‌باشند و در این مطالعه نیز میزان موارد مثبت در موارد سقط گوسفندی ۱۷/۵٪ تعیین شد(۱۲). با توقف برنامه شناسایی و حذف موارد مثبت بروسلوز در گله‌های گوسفندی از سال ۱۳۸۳ توسط سازمان دامپزشکی کشور و مطالعات در کشورهای پیشرفته چون آمریکا و آلمان که نشان می‌دهد گسترش بیماری از فرم شغلی به فرم غذایی تغییر یافته و کشندگی بیماری برای انسان از ۰/۴ درصد به ۶/۵ درصد افزایش پیدا کرده است، نیاز به مطالعاتی چون تحقیق ما به منظور تعیین نقاط خطر از نظر شیوع بروسلوز هم از نظر بهداشت عمومی اهمیت داشته و هم از نظر حذف و ارتقا اقتصادی دامداری کشور مهم بوده است(۱۳ و ۱۴). Garin-Bastuji و همکارانش معتقد هستند تکنیک PCR، روش جدیدی برای تشخیص باکتری سخت رشد *بروسلا* و همچنین شناسایی سویه‌های این باکتری بسیار مؤثر است که می‌تواند در شناسایی *بروسلا ملیتنسیس* در موارد سقط گوسفند و بز استفاده شود(۱۵).

مطالعات کشوری نشان می‌دهد استان گلستان از نظر شیوع بروسلوز در گوسفندان با موارد مثبت متوسط، بین استان‌های بسیار آلوده مانند مرکزی و استان‌هایی با آلودگی پایین چون کرمان و فارس قرار دارد که با تعداد موارد مثبت شناسایی شده در بین گوسفندان شهرستان گنبدکاووس در این مطالعه هم خوانی دارد(۸). صادقی و همکاران طی سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۹ شیوع بروسلوز در گوسفندان استان مازندران ۹/۴۴ درصد اعلام کردند که بیشترین آلودگی در شهرستان ساری با میزان ۱۵/۳۵ درصد گزارش گردید که میزان آلودگی شهرستان گنبد کاووس کمی بالاتر از شهرستان‌های استان مجاور می‌باشد و محققین عواملی چون افزایش زنده مانی *بروسلا* تا ۲/۵ سال در شرایط آب و هوایی استان، قاچاق دام و آگاهی ناکافی دامداران از بیماری را در شیوع بیماری مؤثر داستند(۱۰). قره خانی و همکاران نشان دادند از ۶۱ نمونه جنین سقط شده در گله‌های همدان، در ۱۲ مورد، *بروسلا ملیتنسیس* تشخیص داده شد(۲). بررسی بروسلوز در گوسفندان قبل از کشتار طی سال ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۴ در استان آذربایجان غربی نشان داد ۵۳/۴ درصد گوسفندان مثبت تشخیص داده شدند(۱۶). Aras و Ates در سال ۲۰۱۱ در ترکیه نشان دادند از ۸۶ نمونه جنین سقط شده گوسفندی میزان ۲۴ نمونه معادل ۲۸ درصد به *بروسلا* ملیتنس آلوده بودند(۱۷). Abdelbaset و همکارانش با مطالعه آلودگی بروسلوز در گوسفندان طی سال ۲۰۱۷ در دو استان اسیوط و المینا مصر در حاشیه رود نیل نشان دادند میزان آلودگی گوسفند ۱۵/۸۷٪ (۳۰ نمونه از مجموع ۱۸۹ نمونه) بود(۱۸). گزارشات حاکی است طی ۶۰ سال اخیر با اجرای برنامه واکسیناسیون کلی دام‌ها در روسیه که سالیانه بیش از ۸ میلیون گوسفند را شامل شده است میزان بروسلوز در گوسفندان از ۷۲۵ هزار مورد به ۴ هزار مورد کاهش یافته است(۱۹).

نتیجه‌گیری

با شناسایی موارد *بروسلا* ملی تنسیس در گوسفندان شهرستان گنبد، ضروری است واکسیناسیون کلی دام‌ها شهرستان و آموزش دامداران در برنامه‌های آتی اداره دامپزشکی و شبکه‌های بهداشت شهرستان قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از تلاش‌ها و همکاری ریاست اداره دامپزشکی استان گلستان تقدیر و تشکر می‌نمایند.

REFERENCES

1. Al-Griw HH, Elfurgani SK, Milad EF, Lorraine LP, Whatmore AM. Evidence of ongoing brucellosis in livestock animals in North West Libya. Journal of Epidemiology and Global Health. 2017; 7(4): 285-288

2. Shahbazi Y, Safavi A, Shavisi N. The epidemiological survey of animal brucellosis in Kermanshah province. Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences. 2016; 10(1): 73-97. [persian]

3. Khamassi Khbou M, Htira S, Harabech K, Benzarti M. First case-control study of zoonotic brucellosis in Gafsa district, Southwest Tunisia. One Health. 2018; 5: 21-26.

4. Feng Y, Peng X, Jiang H, Peng Y, Zhu L, Ding J, Rough *Brucella* strain RM57 is attenuated and confers protection against *Brucella melitensis*. Microbial Pathogenesis. 2017; 107: 270-275

5. Blasco J. Control and eradication strategies for *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. Prilozi. 2010; 31: 145–165.

6. Sofian M, Aghakhani A, Velayati A, Banifazl M, Eslamifar A, Ramezani A. Risk factors for human brucellosis in Iran: a casecontrol study. International Journal of Infectious Diseases. 2008; 12: 157-61.

7. Makarem E, Karjoo R, Omidi A. Frequency of *Brucella melitensis* in southern Iran. Journal of tropical pediatrics. 1982; 28: 97.

8. Mostafavi E, Asmand M. Brucellosis disease in Iran during the years 1991-2008. Iranian Journal of Epidemiology. 2015; 8(1): 94-101.

9. HashemifarI, Yadegar A, MasjedianJaziF, Amirmozafari N. Molecular prevalence of putative virulence-associated genes in *Brucella melitensis* and *Brucella* abortus isolates from human and livestock specimens in Iran. Microbial Pathogenesis. 2017; 105: 334-339

10. sadeghi AR, Rezaeipour V. Detection of bluetongue virus in aborted lamb fetuses in Chaharmahal va Bakhtiari and Isfahan provinces, by RT-PCR method. Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 2014; 105:17-24

11. Shakerian A. Study of contamination rate in craw milk and its traditional products with *Brucella* abortus, and *Brucella* mellitensis in Isfahan and Chaharmahal and Bakhtiari Provinces, 2012. Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(1): 16-23.

12. Pakzad R, Pakzad I, Safiri S, Shirzadi MR, Mohammadpour M, Behroozi A, et al. Spatiotemporal analysis of brucellosis incidence in Iran from 2011 to 2014 using GIS. International Journal of Infectious Diseases. 2018; 67: 129-136

13. Eldeib A, Shallik N, Elrashidy A, Elsheikh H, Zaki M, Abdou S, et al. Brucellosis Trend and Effect of Domestic Livestock Vaccination on Disease Incidence in Human. Tanta Med Sc J. 2008; 3: 7-18.

14. Al Dahouk S, Neubauer H, Hensel A, Schöneberg I, Nöckler K,Alpers K, et al. Changing epidemiology of human brucellosis, Germany, 1962–2005. Emerging infectious diseases .2007; 13: 1895.

15. Garin-Bastuji B, Blasco JM, Marin C, Albert D. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. Small Ruminant Research. 2006; 62: 63-70.

16. Javadi A, Akrami Nojadeh G, Javadi MR, Ahmad Khanli M. A serological survey of ovine and caprine brucellosis in slaughterhouses of East Azerbaijan province during 2004-2005. J. Spe. Vet. Sci. Islam. Azad. Uni. Tabriz. 2007; 1(1): 15-19.

17. Aras Z, Ates M. The first report of isolation and molecular characterisation of *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine strain from an aborted sheep fetus in Turkey. Small Ruminant Research. 2011; 95(2–30): 150-159

18. Abdelbaset AE, Abushahba MFN, Hamed MI, Rawy MS. Sero-diagnosis of brucellosis in sheep and humans in Assiut and El-Minya governorates, Egypt. International Journal of Veterinary Science and Medicine. 2018; doi:10.1016/j.ijvsm.2018.01.007

19. Sklyarov O, ShumilovK, KlimanovA, Denisov A. Targeted prevention of brucellosis in cattle, sheep, and goats in the Russian Federation. Vaccine. 2010; 28: 54-58