مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (2) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (2) 2013

العزل والوصف الجزيئي لجراثيم البروسيلة المالطية المسببة للإجهاض عند الماعز في المنطقة الوسطى من سوريا والتفريق بين الذراري الحقلية والذراري اللقاحية المعزولة في الدراسة

الدكتور عزام كردي*
الدكتور سامر ابراهيم**
بشار صادق نومي الحديثي***

(تاريخ الإيداع 19 / 4 / 2012. قبل للنشر في 10 / 2 / 2013)

□ ملخّص □

هدفت هذه الدراسة إلى عزل جراثيم البروسيلة واستخدام تقنية تفاعل البُوليميِراز المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) للوصف الجزيئي للبروسيلة المالطية المسببة للإجهاض عند الماعز، وتحديد نسبة الإجهاض الناجم عن البروسيلة المالطية من بين الحالات الكلية للإجهاض عند الماعز في المنطقة الوسطى من سوريا. ولهذا الغرض تم جمع 58 عينة إجهاض (36 جنين مجهض و22 مسحة مهبلية). أظهرت نتائج العزل الجرثومي واستخدام التقانات الجزيئية (تفاعل البُوليميِراز المتسلسل) أن نسبة الإجهاض الناجم عن البروسيلة المالطية يشكل 53.4% من بين الحالات الكلية للإجهاض عند الماعز في المنطقة الوسطى من سوريا. كما أظهرت الدراسة أن استخدام محتويات المنفحة (معدة الجنين) للعزل الجرثومي من الأجنة المجهضة أفضل من استخدام الأحشاء. وعند إجراء الاختبارات التفريقية لمعرفة أكانت هذه العزلات هي ذراري حقلية أم هي ذراري لقاحية، فقد كشفت نتائج هذه الاختبارات وجود عزلتين (6.4%) تعودان للذرية اللقاحية Rev1 من أصل 31 عزلة من البروسيلة المالطية تم عزلها في هذه الدراسة

الكلمات المفتاحية: البروسيلة المالطية، إجهاض الماعز، تفاعل البوليميراز المتسلسل، الاختبارات التفريقية للبروسيلة المالطية الذرية،Rev1

* أستاذ – قسم الأحياء الدقيقة – كلية الطب البيطري – جامعة البعث – حمص – سورية.
** أستاذ مساعد – قسم الأحياء الدقيقة – كلية الطب البيطري – جامعة البعث – حمص – سورية.
*** طالب دراسات عليا (دكتوراه) – قسم الأحياء الدقيقة – كلية الطب البيطري – جامعة البعث – حمص – سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (2) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (2) 2013

Bacterial Isolation and Molecular Characterization of *Brucella Melitensis* that Causes Caprine Abortion in the Middle Region of Syria and Differentiation between Field and Vaccinal Strains Isolated in this Study

Dr. AzamKurdi*
Dr. SamerK.Ibrahim**
Bashar S.N. Al-Hadethi***

(Received 19 / 4 / 2012. Accepted 10 / 2 /2013)

□ ABSTRACT □

The aim of this study is isolating brucella and using polymerase chain reaction technique for the molecular characterization of *Brucellamelitensis*,which causes caprine abortion. It also aimsto determine the rate of caprine abortion that is caused by *Brucellamelitensis*in the Middle region of Syria. For this purpose 58 abortion samples were collected (36 aborted fetuses, 22 vaginal swabs). The results of bacterial isolation and polymerase chain reaction reveal that the prevalence of caprine abortion caused by *Brucella melitensis* was 53.4%. The study also reveals that using stomach contents from caprine aborted fetus can be the best site for brucella isolation. Running differentiation tests to distinguish field strains from vaccinal strains refer to the presence of 2 isolates(6.4%) belonging to vaccinal strains(Rev1) from 31 isolates of *Brucella melitensis*.

Keyword: *Brucellamelitensis*, caprine abortion, polymerase chain reaction, distinguish test for*Brucella melitensis*Rev1 strain

***Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Albaath University, Homs, Syria.**
****Associate Professor, Department of Microbiology,Faculty of Veterinary Medicine, Albaath University, Homs, Syria.**
*****Postgraduate student, faculty of veterinary medicine, Albaath University , Homs, Syria.**

مقدمة :

يحدث داء البروسيلات في الماعز نتيجة الإصابة بجراثيم البروسيلة المالطية *Brucella melitensis* التي تعد الأكثر فوعة بين الأنواع الأخرى لجنس البروسيلة، كما أن هذا النوع من البروسيلة هو الأكثر انتشاراً في دول الشرق الأوسط (Jacques *et al.*, 1998).

يصيب المرض الحيوانات المنتجة وأهم العلامات السريرية هي الإجهاض في الحيوانات الحوامل واحتباس المشيمة وبدرجة اقل التهاب الضرع في الحيوانات الحلوبة(Blood *et al.*, 1989; FAO, 2003).

يشخص المرض بنوعين من الاختبارات هما الاختبارات التي تكشف عن الجرثوم (التشخيص المباشر) والاختبارات التي تكشف عن الاستجابة المناعية (التشخيص غير المباشر) (Radostis*et al.*,2007).

يعدّ العزل الجرثومي من الطرائق الأكثر تأكيداً لتشخيص المرض (Garrido*et al.*, 2001). وهي الطريقة المعيارية الوحيدة لتشخيص المرض في المجترات الصغيرة (Alton *et al.*, 1988). كما أنها الطريقة التي يتم فيها التشخيص المبكر للمرض أي قبل تكوين الأضداد والاستجابة المتوسطة بالخلايا، كما تتميز عن الاختبارات المصلية بعدم وجود نتائج إيجابية كاذبة تنتج عن التحصين أو الإصابة القديمة، أو التفاعلات التصالبية الناجمة عن الإصابة بجراثيم أخرى (OIE,2004).

أشارت العديد من الدراسات إلى الدقة العالية التي يتميز بها اختبار تفاعل البُوليميراز المتسلسل (PCR) في الكشف عن جراثيم البروسيلة المالطية، ويعطي هذا الاختبار الأداء الأمثل عند تطبيقه على ذراري البروسيلة المعزولة على المنابت الزرعية ومن ثم استخدامها في استخراج قالب الدنا (Keskin*et al.,* 2009; Ilhan*et al.*, 2008; Hamdy& Amin., 2002; Fekete*et al.*, 1992).

إن أهم الطرق المستخدمة للسيطرة على داء البروسيلات عند الأغنام والماعز في سوريا هو تحصينها بلقاح البروسيلة المالطية الذرية Rev1 . وقد أشارت دراسة (Blasco, 1997). إلى أن لهذا اللقاح مساوئ من أهمها إمكانية اطراح جراثيم البروسيلة (المستخدمة في التحصين) في الحليب والمسحات المهبلية والأجنة المجهضة. كما أن هذا اللقاح يحفز إنتاج أضداد خاصة بالسلسلة الجانبية –O– لعديد السكريد الشحمي التي تتماثل مع الأضداد المتكونة في حالة العدوى الطبيعية وهذا يؤدي إلى التداخل مع نتائج الاختبارات المصلية (Banai,2002).

أشار Blasco (1997) إلى أن لقاح البروسيلة المالطية الذرية Rev1 يمكن أن يسبب الإجهاض في الحيوانات المحصنة بالجرعة القياسية، وإن أعلى نسبة إجهاض حدثت بعد 40 –60 يوماً من التحصين. كما أشار Jimenez وزملاؤه (1989) إلى أن حدوث الإجهاض بعد التحصين بلقاح الذريةRev1 يعتمد على مرحلة الحمل عند التحصين، فعند تحصين الأغنام الحوامل خلال الشهر الأخير من الحمل كانت نسبة الإجهاض اقل قياساً بتحصينها في الثلث الأول من الحمل، حيث بلغت نسبة الإجهاض 80% عندما حصنت النعاج الحوامل خلال الشهرين الثاني والثالث من الحمل.

أهمية البحث وأهدافه :

نظراً للخسائر الاقتصادية الكبيرة التي يسببها المرض المتمثلة بإجهاض إناث الماعز الحوامل ولخطر المرض على الصحة العامة ولعدم وجود اختبار مصلي وحيد كاف لتشخيص المرض بمراحله كلها. فقد هدفت هذه الدراسة إلى:

1- محاولة عزل جراثيم البروسيلة باستخدام المنابتالزرعية الانتقائية
2- استخدام اختبار البُوليميِراز المتسلسل (PCR) لتأكيد نتائج العزل الجرثومي وتحديد النوع .
3- التفريق بين الذراري الحقلية والذراري اللقاحية للعزلات المدروسة.

طرائق البحث ومواده :

1- العينات :

تم جمع العينات من المنطقة الوسطى من سوريا (محافظة حمص ومحافظة حماة) خلال موسمي الولادات 2011 و2012 واجريت الدراسة في كلية الطب البيطري/ جامعة البعث/حماة.حيثجمعت 58 عينة إجهاض من إناث ماعز(36 جنين مجهض إضافة إلى 22 مسحة مهبلية خلال فترة لم تتجاوز أسبوعين بعد الإجهاض) وتم التعامل معها بحسب طريقة (Alton *et al.*,1975).

** أخذت عينات الزرع الجرثومي من محتويات المنفحة والأحشاء الداخلية للأجنة المجهضة، واعتبرت العيّنة إيجابية في حال كونها إيجابية للزرع من المنفحة أو الأحشاء أو كليهما .

2- طرائق العزل الجرثومي

اتبعت طريقة (Alton & Forsyth, 1996) في الزرع الجرثومي وباستخدام مستنبت البروسيلة الصلب (Brucella Basel agar, Biolive_Italy) وقد أضيف إليه 5% من مصل دم الخيول المعقم الخالي من الأضداد الخاصة بجراثيم البروسيلة، كما أضيف له عبوة واحدة من الإضافات الانتقائية (Brucella selective supplement, HIMEDIA-INDIA)، لكل 500 مل من المستنبت

وبعد الحضانة لمدة 5 أيام بدرجة حرارة 37م°. فحصت الأطباق من أجل الكشف عن المستعمرات المشتبه بأنها جراثيم البروسيلة (ذات مظهر ناعم وشكل أبيض لؤلؤي) وتمت تنقية هذه العزلات بأخذ مستعمرة مفردة وزرعها مرة ثانية بنفس ظروف الزرع الأولي، وعند ظهور مستعمرات ناميةأخذت مسحة منها لغرض عمل لطاخة صبغت بصبغة زيل نلسن المعدل وصبغة غرام، وبعد التأكد من الصفات الشكليائية للمستعمرات النامية ودراسة الجراثيم مجهرياً بعد تلوينها، طبقت عليها الاختبارات الكيمياحيوية التي أوصى بها (Quinn *et al.*, 2002). وقد شملت اختبار الأوكسيداز، اختبار الكاتالاز، اختبار حمرة الميثيل وفوغسبروسكاور، اختبار حلمهة اليوريا، اختبار ارجاع النترات، استهلاك السترات، اختبار الأندول. وبعد التأكد من صفات الكيمياحيوية للمستعمرات النامية طبق عليها اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل.

3- اختبار تفاعل البُوليميِراز المتسلسل

A. استخلاص الدنا: اتبعت طريقة الغليان لاستخلاص قالب الدنا. حيث أخذت مستعمرة جرثومية وحلت في 200 مكرولتر من الماء المقطر الخالي من DNAase ضمن أنابيب ابندروف معقمة (سعة 1.5 مل). بعد ذلك وضعت الأنابيب في محم مائي بدرجة حرارة 100م° لمدة 10 دقائق، بعد ذلك وضعت الأنابيب مباشرةً على الثلج، ثم ثفلت بسرعة 12000دورة/دقيقة بدرجة حرارة 4م° لمدة 20 ثانية. اخذ السائل الطافي فقط والحاوي على مرصاف الدنا (قالب الدنا والذي يمثل العينة في اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل) ووضع في أنابيب ابندروف معقمة وحفظت بدرجة حرارة -20 م° لحين استخدامها في تحضير مزيج التفاعل (OIE,2009).

B. مراحل اختبار تفاعل البُوليميِراز المتسلسل

1- تحضير مزيج التفاعل

وضعت جميع المواد المستخدمة في تحضير مزيج التفاعل على الثلج وحضر المزيج باستخدام المواد الموضحة في الجدول (1)

جدول (1) يبين المواد المستخدمة في تحضير مزيج التفاعل

المواد المستخدمة في تحضير مزيج التفاعل	الكمية (µL)
عتيدة 2X Taq PCR Master Mix من شركة Qiagen الألمانية	25
Primer A (B. M. Forword) 5/- AAA, TCG, CGT, TGC, TGG, TCT,GA-3/ من شركةFunakoskiاليابانية	0.3 من محلول تركيزه 100 بيكومول
Primer B(B.M. Reverse) 5/-TGC, CGA, TCA, CTT, AAG, GGC, CTT,CAT-3/ من شركةFunakoskiاليابانية	0.3 من محلول تركيزه 100 بيكومول
قالب الدنا DNA Tamplate	3
ماء مقطر خال من الدنا من شركة Qiagen الألمانية	21.4
المجموع	50

2-مرحلة التضخيم

نقلت الأنابيب الحاوية على مزيج التفاعل إلى جهاز المدور الحراري (TEchine TC-512) الذي تمت برمجته وفقاً للطريقة التي وصفها (Leal-Klevezas*et al.*,1995). وقد كان البرنامج الحراري يتألف من خطوات بدأت بتسخين أولي لدرجة 94 م° لمدة أربع دقائق كان الهدف منها فك سلاسل الدنا وجعلها مفردة، تلا ذلك ثلاثون دورة ثلاثية الأشواط : الشوط الأول (مرحلة التَمَسُّخ Denaturation step) بدرجة حرارة 94 م° لمدة دقيقة واحدة. الشوط الثاني (مرحلة ارتباط المشرعات Primer-annealing step) بدرجة حرارة 60 م° لمدة دقيقة واحدة. الشوط الثالث (مرحلة إطالة الدنا DNA extension step) بدرجة حرارة 72 م° لمدة دقيقة واحدة. وأضيفت خطوة أخيرة بدرجة حرارة 72 م° لمدة 10 دقائق للتأكد أن جميع نواتج التفاعل أصبحت مزدوجة السلسة.

3-مرحلة الكشف عن نواتج التفاعل

تم ترحيل العينات في هلامةالأغاروز2% بعد إضافة دارئة التحميل (10X loading buffer, TaKaRa) باستخدام جهاز الرحلان (Biotechnology GMbh) مع تضمين كل قالب لمعلم الوزن الجزيئي (100pb DNA leader, AB-Gene) وشاهد إيجابي (عينة محضرة من لقاح البروسيلة المالطية الذرية REV1) وشاهد سلبي (مكونات التفاعل مع إبدال قالب الدنا بماء مقطر خالٍ من الدنا). علماً أن دارئة الرحلان كانت (TBETris-Boric acid- EDTA) (Leal-Klevezas*et al.*,1995). بعد اكتمال الرحلان رفعت هلامة الأغاروز وفحصت أنطقة الدنا على جهاز الأشعة فوق البنفسجية (التي تعطي لمعاناً مع صبغة الاثيديوم بروميد

المرتبط بها) من اجل الكشف عن أنطقة الدنا(DNA bands) ومقارنتها بالشاهد الايجابي وتحديد حجمها قياساً بمعلم الوزن الجزيئي.اعتبرت العينة إيجابية في حال ظهور انطقه الدنا بحجم 731 قاعدة ازوتية (Ilhan*et al.*,2008)

4- التفريق بين الذراري الحقلية والذراري اللقاحية للبروسيلة المالطية:

اعتمدت الاختبارات التي أوصى بها Alton وزملاؤه (1975). حيث تم استخدام أربعة مثبطات هي:

1- الثايونين : حضر محلول الثايونين بإذابة 0.1 غرام من الثايونين (Thionin, Fluka_ Germany) في 100 مل من الماء المقطر، وذوب في محم مائي بدرجة 80م° لمدة ساعة، ليكون تركيزه 1:1000 وحفظ المحلول بدرجة حرارة 4م°، وهو صالح للاستخدام لمدة 3 أشهر من تحضيره.

2- الفوكسين القاعدي: حضر محلول الفوكسين القاعدي بإذابة 0.1 غرام من الفوكسين القاعدي (Scharlau, AspinBasic fuchsin,) في 100 مل من الماء المقطر(1:1000)، وذوب في محم مائي بدرجة 80م° لمدة ساعة، وحفظ المحلول بدرجة حرارة 4م°، وهو صالح للاستخدام لمدة 3 أشهر من تحضيره.

3- البنسلين Penicillin: استخدمت عبوة من (Benzyl penicillin, Sigma_ Germany) تحتوي على 1000,000 وحدة دولية. وحلت بإضافة 10 مل من الماء المقطر، ليكون تركيزه 000, 100 وحدة دولية/مل وحفظ المحلول بدرجة حرارة -20م°.

4- الستربتوميسينStreptomycin: استخدم عبوة منه (Streptomycin, Meijii_Japan) تحتوي على 1غ وحلت في 5 مل من الماء المقطر ليكون تركيزه 200 ملغ/مل . وحفظ المحلول بدرجة -20م°.

حضر مستنبت أغار الصُّويا بِالتِرِيبتِيكاز (Tryptone soya agar, HIMEDIA_INDIA) بحسب تعليمات الشركة المجهزة، وبعد تعقيمه بالموصدة ترك ليبرد بدرجة حرارة الغرفة ليصل إلى درجة حرارة 60م° ثم أضيفت له الصبغات والصادات المثبطة بصورة منفصلة وفق التمديدات الآتية :

1- مستنبت أغار الصُّويا بِالتِرِيبتِيكاز أضيف له الثايونين بتمديد نهائي 50,000:1

2- مستنبت أغار الصُّويا بِالتِرِيبتِيكاز أضيف له الفوكسين القاعدي بتمديد نهائي 50,000:1

3- مستنبت أغار الصُّويا بِالتِرِيبتِيكاز أضيف له البنسلين بتمديد نهائي 5 وحدة دولية/مل

4- مستنبت أغار الصُّويا بِالتِرِيبتِيكاز أضيف له الستربتوميسين بتمديد نهائي 2.5مكروغرام/مل.

بعد ذلك صبت المنابت في أطباق بتري عقيمة ثم زرع عليها عزولات البروسيلة المالطية المعزولة في الدراسة (وقد زرعت كل عزلة على المنابت الأربعة المحضرة والمضاف إليها المثبطات) ثم حضنت الأطباق هوائياً بدرجة حرارة 37م° لمدة 3-5 أيام بعد ذلك فحصت الأطباق لملاحظة وجود نمو جرثومي من عدمه.

**عدت البروسيلة المالطية ذرية حقلية عند نموها على الأطباق الحاوية على الفوكسينوالثايونين والبنسلين وعدم نموها على الأطباق الحاوية على الستربتوميسين. وعدت البروسيلة المالطية ذرية لقاحية عند نموها على الأطباق الحاوية على الستربتوميسين فقط(Alton, *et al.*, 1975).

النتائج والمناقشة :

النتائج:

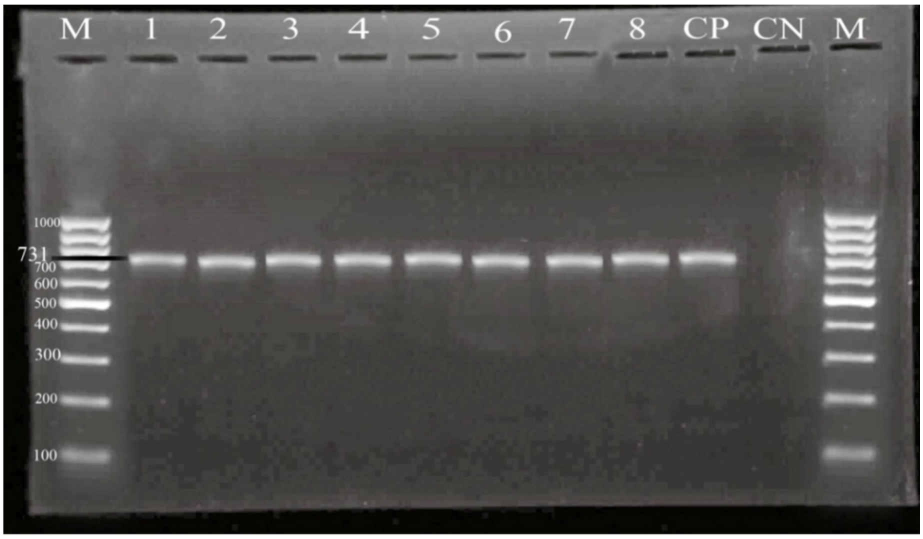
أظهرت نتائج الدراسة انتشار جراثيم البروسيلة بنسبة 53.4% بين الحالات الكلية للإجهاض عند الماعز، حيث تم عزل 31 ذرية من جراثيم البروسيلة من بين 58 حالة إجهاض. إذ عزلت 17 عزلة من جراثيم البروسيلة من 36 جنيناً مجهضاً ويتباين بحسب مكان العزل(منفحة أو أعضاء داخلية) وبنسبة 47.2% جدول (2). كما عزلت 14

عزلة من جراثيم البروسيلة من بين 22 مسحة مهبلية بنسبة 63.6% وكانت جميع العزلات عائدة لنوع البروسيلة المالطية *Brucella melitensis* اعتماداً على الصفات المزرعية (نموها بدون الحاجة الى CO_2) وشكل المستعمرات (الشكل الناعم) والاختبارات الكيمياحيوية (حيث أظهرت العزلات نتائج إيجابية لاختبارات الاوكسيداز والكاتالاز واليورياز والنترات، ونتائج سلبية لاختبارات الاندول والسترات وحمرة الميثيل واختبار الفوغس-بروسكاور وتخمير سكر اللاكتوز.

جدول (2): نسبة العزل موزعة بحسب العضو الذي تم منه العزل

نوع العينات								
أجنة مجهضة						إناث ماعز مجهضة		
محتويات منفحة			أحشاء داخلية			مسحات مهبلية		
عدد العينات	إيجابية الزرع من المنفحة	%	عدد العينات	إيجابية الزرع من الأحشاء	%	عدد العينات	ايجابية الزرع	%
36	15	%41.6	36	13	%36.1	22	14	%63.6
المجموع 36 جنيناً	عزلت البروسيلة المالطية من 17 جنيناً وبنسبة 47.2%، كان هنالك جنينان إيجابيان للزرع من الأحشاء وسلبيان للزرع من المنفحة وقد اعتبرا حالتين ايجابيتين للبروسيلة					22 مسحة مهبلية عزلت البروسيلة من 14 مسحة بنسبة 63.6%		

ولدى تطبيق اختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل على مستعمرات جراثيم البروسيلة النامية بعد التأكد من صفاتها الشكليائية والاختبارات الكيمياحيوية، فقد أظهرت نتائج هذا الاختبار أن حجم أنطقة الدنا الناتجة (DNA band) من تضخيم مرصاف الدنا باستخدام المشرعات الخاصة بالبروسيلة المالطية كان 731 قاعدة أزوتية وهو الحجم المتوقع. وذلك فإن جميع العزلات كانت من نوع البروسيلة المالطية. الشكل (1).



الشكل (1) يبين نتائج اختبار تفاعل البُوليمِراز المتسلسل لبعض ذراري البروسيلة المالطية المعزولة من حالات إجهاض عند الماعز

M :معلم الوزن الجزيئي، CN: شاهد سلبي، CP: شاهد ايجابي (لقاح REV1)،

والأعمدة 1 -8 : تمثل النتائج الإيجابية للذراري المدروسة.

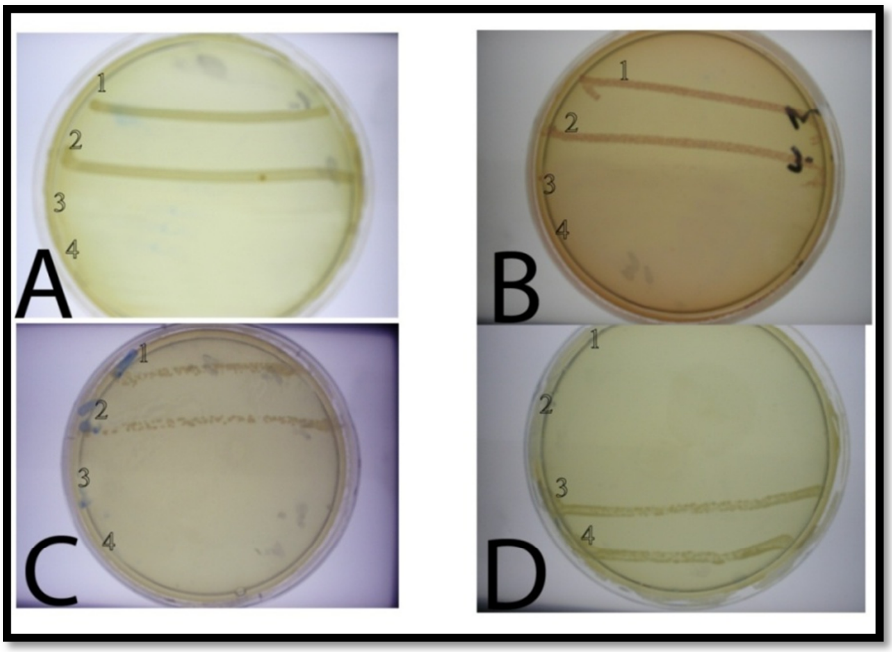
ولما كان التحصين ضد داء البروسيلات شائعاً في سوريا باستخدام لقاح البروسيلة المالطية الذرية REV1. فقد أجريت الاختبارات التفريقية على ذراري البروسيلة المالطية المعزولة (31ذرية). وقد أظهرت نتائج هذه الاختبارات أن هنالك عزلتين فقط عائدتين للبروسيلة المالطية الذرية Rev1 من بين 31 ذرية وبنسبة 6.4% (لم تنمُ بوجود الثايونينوالفوكسين والبنسيلين ولكنها نمت بوجود الستربتوميسين) في حين كانت 29 ذرية من أصل31 ذرية حقلية وبنسبة 93.5%(نمت بوجود الثايونينوالفوكسين والبنسيلين ولم تنمُ بوجود الستربتوميسين) (جدول 3، الشكل 2).

جدول (3): الاختبارات التفريقية لذراري البروسيلة المالطية الحقلية واللقاحية

نوع الذرية (درست 31 ذرية من نوع البروسيلة المالطية)	النمو بوجود المثبطات			
	النمو بوجود الصادات		النمو بوجود الصبغات	
	البنسلين (5 IU/ml)	الستربتوميسين (2.5 µg/ml)	الفوكسين 1:50000	الثايونين 1:50000
الذرية الحقلية 29(93.5%)	+ve	−ve	+ve	+ve
الذرية اللقاح 2(6.4%)	−ve	+ve	−ve	−ve

+ve : إيجابية النمو بعد الحضانة الهوائية بدرجة حرارة 37م° لمدة خمسة أيام

−ve: سلبية النمو بعد الحضانة الهوائية بدرجة حرارة 37م° لمدة خمسة أيام



الشكل (2) يبين نتائج اختبارات تثبيط النمو بوجود الصبغات والصادات

1،2: البروسيلة المالطية ذرية حقلية، 3،4: البروسيلة المالطية الذرية REV1

A : أغار الصُّويا بِالتريبتِيكاز مضاف إليه البنسلين بتركيز 5 وحدة دولية/مل. B : أغار الصُّويا بِالتريبتِيكاز مضاف إليه الفوكسين القاعدي بتركيز1:50,000 ، C أغار الصُّويا بِالتريبتِيكاز مضاف إليه الثايونين بتركيز 1:D. 50,000 : أغار الصُّويا بِالتريبتِيكاز مضاف إليه الستربتوميسين بتركيز 2.5 مكروغرام/مل

المناقشة:

هدفت هذه الدراسة إلى تحديد نسبة الإجهاض الذي تسببه البروسيلة المالطية في إناث الماعز بين حالات الإجهاض الكلية، وقد كشفت الدراسة أن نسبة انتشار البروسيلة المالطية بين حالات الإجهاض بلغت 47.2% وقد تقاربت هذه النسبة مع نسبة حدوث الإجهاض بالبروسيلة المسجلة في العراق من الحنكاوي (2006) البالغة 42.9% اعتماداً على العزل الجرثومي.

ولدى الموازنة بين نتائج الدراسة الحالية ونتائج الدراسات المحلية وجد اختلاف بينها وبين النسبة المسجلة من (Darwesh&Benkirane, 2001) حيث بلغت نسبة الانتشار المصلي في المجترات الصغيرة 2.94% اعتماداً على اختبار وردية البنغال. ويعود هذا الاختلاف إلى نوع العينات حيث شملت دراستنا عينات مأخوذة من حالات إجهاض فقط، إضافة إلى استخدام العزل الجرثومي واختبار تفاعل البُوليمِراز المتسلسل الذي يتميز عن الاختبارات المصلية بقدرته على تشخيص الإصابة قبل تكوين الأضداد، وعمر الحيوان المشمول بالدراسة، حيث إنّ المرض يصيب الحيوانات البالغة جنسياً (Charanjeet,*et al.*,2004).ويوضح الجدول (4) الموازنة بين نتائج هذه الدراسة والدراسات المذكورة آنفاً.

جدول (4): يبين الموازنة بين نتائج هذه الدراسة مع الدراسات السابقة

الدراسة	بلد الدراسة	نوع الدراسة	النسبة الإيجابية المسجلة في الدراسة
الدراسة الحالية	سوريا	عزل جرثومي واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل من حالات إجهاض عند الماعز	47.2%
Darwesh&Benkirane, (2001)	سوريا	دراسة مصلية عند أغنام وماعز (مجهضة وغير مجهضة)	2.94%
(الودع، 2011)	سوريا	عزل جرثومي واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل من حليب أغنام وماعز مجهضة	4.8% لحليب الأغنام و0% لحليب الماعز
(الحنكاوي، 2005)	العراق	عزل جرثومي من أغنام مجهضة	47.2%

استخدمت الباحثة الودع (2011) اختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل لتشخيص البروسيلة المالطية في حليب الماعز، غير أنها سجلت نتائج سلبية لـ 30 عينة حليب ماعز مفحوصة. وهذا يتفق مع ما ذكره (Wilson, 1984) حيث أشار إلى أن استخدام الحليب للعزل الجرثومي للبروسيلة لا يكون موفقاً دائما لأنّ الطرح الجرثومي يكون متقطعاً ويختلف عدد الجراثيم من يوم إلى آخر، حيث إن نسبة عزل الجراثيم من الحليب بلغت 19 – 33 % من نسبة الإصابة الحقيقية.

أشارت الدراسات إلى أن الزيادة في نسبة انتشار داء البروسيلات عند المجترات الصغيرة يعود إلى عوامل عديدة منها عدم وجود برنامج متكامل للسيطرة على المرض وجهل المربين بخطر وسرعة انتشاره، وعدم اتباع الطرق الصحية في التخلص من الأجنة المجهضة فضلا عن سهولة تنقل الحيوانات من منطقة إلى أخرى دون مراقبة الأمر الذي يسهل انتشار المرض من المناطق الموبوءة إلى المناطق الخالية من المرض إضافة إلى دَور الحيوانات غير المستأنسة

التي تعد مخازن مهمة لجراثيم البروسيلة حيث تقوم بحملها ونشرها إلى مناطق عديدة Omer, *et al.*, (2000;Kolar, 1995)

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن أفضل مكان للعزل الجرثومي هو محتويات معدة الجنين، وبذلك تتفق هذه النتيجة مع نتائج دراسة كل من (العبدلي،2005؛ الحنكاوي،2006) اللذين أشارا إلى أن أعلى نسبة عزل جرثومي كانت من محتويات المعدة للأجنة المجهضة وأقلها من الأحشاء. في حين أشار Hadad وAl-azawy(1990) إلى أن أعلى نسبة عزل كانت من أحشاء الأجنة المجهضة ثم تلتها المسحات المهبلية ومن ثم محتويات المعدة.

وقد يعزى هذا التباين الى حجم العينة ونوع المستنبت ونوع الإضافات الانتقائية فمثلاً Nalidixic acid وBacitracin لهما تأثير مثبط لنمو بعض الذراري الجرثومية للبروسيلة المالطية، كما أن كفاءة العزل الجرثومي تعتمد على وعدد جراثيم البروسيلة الموجودة في العينة حيويتها وطبيعة العينة (هل هي من أعضاء لجنين مجهض أو أغشية أو عقد لمفية) وعدد العينات المفحوصة والمأخوذة من الحيوان نفسه (Marin, *et al.*, .(1996; Macfadding, 1979

بينت نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل أن حجم أنطقة الدنا الناتجة من تضخيم قالب الدنا باستخدام المشرعات الخاصة بالبروسيلة المالطية كان 731 قطعة أزوتية وهو الحجم المتوقع (اعتماداً على تعليمات الشركة المنتجة للمشرع) وقد اتفقت هذه النتيجة مع نتائج (Ilhan*et al.*,2008 ; الودع،2011). عند استخدامهم لمشرع مشابه للمشرع المستخدم في الدراسة من حيث عدد القواعد الآزوتية وتسلسلها. وقد كانت جميع العزلات عائدة لنوع البروسيلة المالطية *Brucella melitensis* .

ويعلل سبب استخدام المستعمرات النامية في استخلاص قالب الدنا في الدراسة الحالية بنوع العينات المستهدفة بالدراسة (الأجنة المجهضة والمسحات المهبلية) التي تتميز بكثرة عدد الجراثيم فيها وسهولة الحصول على عزل جرثومي، كما أنها تتميز بكثرة وجود الملوثات، وكثرة وجود المثبطات، وللتخلص من الجراثيم الميتة في الحيوانات المعالجة التي تعطي نتائج إيجابية كاذبة (Poddar*et al.*,1998)

استخدم Cetinkaya وزملاؤه (1999) طريقتين مختلفتين لاستخلاص الدنا، الأولى باستخدام المستعمرات النامية والثانية بالاستخلاص الكيميائي من محتويات معدة أجنة الأغنام المجهضة، ووجدوا أن حساسية اختبار تفاعل البُوليميراز المتسلسل تكون أعلى في حالة استخدام المستعمرات النامية لاستخلاص الدنا لكون تركيز الدنا أكبر. كما أشار (Fekete*et al.*,1992). لنفس هذه النتيجة.

أشارت أبحاث (Radostits*et al.*,2007, OIE,2004; Mansour,2000; Blasco,1997) إلى أن البروسيلة المالطية هي المسبب الرئيس للإجهاض في الماعز في مناطق البحر المتوسط والشرق الأوسط، كما أن الماعز من الحيوانات الأكثر حساسية للإصابة بالبروسيلة المالطية

لما كانت الطريقة المتبعة للوقاية من داء البروسيلات عند الماعز في سوريا هي تحصينها بلقاح البروسيلة المالطية الذرية REV1، وأن تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل باستخدام المشرعات التي تم استخدامها في هذه الدراسة لا يمكنها التفريق بين الذراري الحقلية والذراري اللقاحية. فقد تم إجراء الاختبارات التفريقية باستخدام المثبطات(الصبغات والصادات) لغرض التفريق بين ذراري البروسيلة المالطية الحقلية واللقاحية، وقد أظهرت نتائج هذه الاختبارات وجود عزلتين بنسبة (6.4%)من البروسيلة المالطية تعود للذرية اللقاحية Rev1.

وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما أشارت إليهNashwa وزملاؤها (2007) في دراستهم التي أجروها لغرض التفريق بين ذراري البروسيلة المالطية الحقلية وذراري البروسيلة المالطية اللقاحية من وجود عزلتين من البروسيلة المالطية الذرية اللقاحية REV1 من بين ست عزلات من البروسيلة المالطية المعزولة من الأغنام (اتفقت من حيث عزل ذراري البروسيلة اللقاحية من حالات إصابة واختلفت من حيث النسبة). ويعود سبب اختلاف النسبة إلى اختلاف نوع الحيوان ونوع العينات حيث كانت دراستهم على أغنام والعينات مأخوذة من مجازر لحيوانات مصابة (اعتماداً على الاختبارات المصلية)، في حين شملت دراستنا عينات إجهاض من ماعز.

إن جراثيم البروسيلة المالطية الذرية اللقاحية REV1 المعزولة من حالات الإجهاض إما أن يكون مصدرها اللقاح نفسه (Blasco, 1997) أو مصدرها انتقال هذه الجراثيم أفقياً بين الحيوانات في نفس الحقل (Banai, 2002).

الاستنتاجات والتوصيات :

الاستنتاجات:

1- انتشار البروسيلة بين حالات الإجهاض في إناث الماعز بنسبة كبيرة في المنطقة الوسطى من سوريا

2- افضل مكان لعزل البروسيلة من الأجنة المجهضة هو محتويات المعدة

3- لايمكن التفريق بين الذراري الحقلية واللقاحية للبروسيلة المالطية باستخدام طرق الزرع الجرثومي والاختبارات الكيمياحيوية حتى اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل باستخدام المشرعات الاعتيادية

4- بعض حالات الإجهاض كان سببها التحصين بلقاح البروسيلة المالطية الذرية REV1 وذلك من خلال عزل هذه الذرية من بعض حالات الإجهاض.

التوصيات:

1- تنبيه المربين على ضرورة متابعة الحيوانات المجهضة والتخلص الأمثل من أجنتها المجهضة لأنها تعد من مصادر نشر جراثيم البروسيلة.

2- تنبيه المربين على ضرورة عزل الماعز المجهضة بالبروسيلة كونها تطرح هذه الجراثيم في سوائلها المهبلية.

3- ضرورة اختيار العمر والوقت الأمثل للتحصين بلقاح البروسيلة المالطية الذرية Rev1 لأنه يسبب الإجهاض في إناث الماعز الحوامل.

المراجع:

1- الحنكاوي، عمر خزعل سلّو. دراسة مقارنة لتشخيص مرض البروسلوسز في الضأن والمعز في محافظة نينوى باستخدام اختبار الإليزا مع الاختبارات المصلية الأخرى. . رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل. (2006)

2- العبدلي، إدريس بلال علي. الإصابة بالبروسيلا في محافظة نينوى وبعض الجوانب الكيمياوية الحيوية. أطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل.(2005)

3- الودع، ريما انور.الكشف عن جراثيم البروسيلة المالطية في الحليب باستخدام تقنيةال PCR . رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة البعث.(2011).

4- Alton, G. G. and Forsyth, J. R. L. (1996). Brucella. In: Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Living Stone. U.S.A.

5- Alton, G. G; Jones, L. M. and Pietz, D. E. (1975). Laboratory techniques in 2nd ed. World Health Organization. Geneva.

6- Alton, G.G; Jones, L.M; Angurs, R.D; Verger, J.M. (1988): Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA. Paris, France.

7- Banai, M., (2002): Control of small ruminant brucellosis by use of Brucella melitensis Rev. 1 vaccine: laboratory aspects and field observations. Vet. Microbiol; 90:497-519.

8- Blasco, J.M., (1997): Advantages and inconvenience of B. melitensis Rev.1 Vaccine for the prophylaxis of brucellosis in small ruminants. WHO meeting on development of new/improved brucellosis vaccine. Geneva. December 11-12.

9- Blood, D. C; Radostits, O. M. and Henderson, J. A. (1989). Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pig, goats and horses 5th ed. Baillieretindall. London. P: 677-696.

10- Cetinkaya, B; Ongor,H; Muz,A; Ertas,H.B;Kalender,H.andErdgan, H.M.(1999). Detectionof Brucella species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. Veterinary record 144:239-240.

11- Charanjeet, M. S., Katoch, R. C., Prasenjeet, D. and Rajinder, K. (2004). Application of RBPT, AST and Avidin-Biotin serum ELISA for detecting brucellosis among livestock in himachal Pradesh. Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis. 25(1): 15-18

12- Darwesh, M. and Benkirane, A. (2001). Field investigation of brucellosis in cattle and small ruminants in Syria, 1990-1996. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20(3): 769-775

13- FAO. (2003). Brucellosis International Research Conference including the 56th Brucellosis Research Conference.

14- Fekete, A., Bantie, J.A, Halling, S.M., (1992): Detection of Brucella by polymerase chain reaction in bovine fetal and material tissues. J. Vet. Diagn. Invest, 4.79-83.

15- Garrido, F., Duran, M., Macmillan, A., Minas, A., Nicoletti, P. and Vecchi, G. (2001). Brucellosis in sheep and goats (*Br. melitensis*). European Commission, Report of Scientific committee on animal health and animal welfare.

16- Hadad, J. J. and Al-azawy, Z. S. (1990). Incidence of brucellosis in sheep and goats in Ninevah Province. Iraqi J. Vet. Sci. 4(1): 27-33.

17- Hamdy, M. E. R. and Amin, A. S. (2002). Detection of Brucella species in the milk of infection cattle, sheep, goat and camels by PCR. Vet. J.163:168-174.

18- Iihan, Z; Aksakal, A. Gulhan, T. Solmaz, H. and Erdenlig, S.(2008).Comparison of culture and PCR for the detection of Brucella melitenisis in blood and lymphoid tissuse of serologiaclpostive and necative slaughtered sheep. The society for applied Microbiology. Letters in applied Microbiology 46(2008)301-306

19- Jacques, I; Olivier-Bernardin, V. and Dubray,G. (1998).Efficacy of ELISA compared to conventional test (RBPT and CFT)for diagnosis of brucella melitensis infection in sheep. Vet Microbial 64:61-73.

20- Jiménez de Bagués, M.P.; Marín, C.M.; Barberán, M. and Blasco, J.M. (1989). Responses of ewes to B. melitensis Rev.1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy.Ann.Rech.Vet. 20: 205-213.

21- Keskin D., OkanAtay, SukruKirkan, OzdalGokdal, SertenTekbitik, Osman Kaya, VadullahEren., (2009): Detection of Brucrlla melitensis in Milk of Hair Gpat {Capra hircus} by Polymerase Chain Reaction (PCR). KafkasUniv Vet Fak derg.15 (2).255-259.

22- Kolar, J. (1995). Some experience from brucellosis control with Rev. 1. vaccine in a heavily infected country- Mongolia. FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev. 1. vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA, Alfort, France September, 21-22

23- Leal-Klevezas D.S., Irma Olivia Martinez-Vazquez, Ahide Lopez-Merino and Juan Pablo Martinez-Soriano., (1995): Single- Step PCR for Detection of Brucella spp. from Blood and Milk of Infected Animals. Journal of Clinical Microbaiology.Dec.3087-3090

24- Macfadding, J. F. (1979). Biochemical test for identification of medical bacteria. Williams and Willkins, Baltimore, U.S.A.

25- Mansour, S. R. (2000) . Epidemiology and diagnositic study of Brucellosis in Nineya province. Master thesis collage of vet. Medicine, university of Mosul.

26- Marin, C. M., Alabart, J. L. and Blasco, J. M. (1996). Effect of antibiotics contained in two brucella selective media on growth of Brucella abortus, Br. melitensis and Br. ovis. J. Clin. Microbiol. 34: 426-428.

27- Nashwa, M.H., M.Z. Hoda and S.S. Adawy., (2007): Identification and Differentiation of Brucella melitensis Rev.1 Vaccine and B. Melitensis Biovar 3 Field Isolates in Egypt by Serological and PCR-RELP Techniques. Journal of Applied Sciences Research., 3(9): 841-847.

28- OIE (2004) caprine and ovine brucellosis. In: OIE manual of diagnostis tests and vaccines for terrestrial animals. 5th ed. 2004, Chapter: 2.4.2.

29- OIE Terrestrial Manual (2009). Bovine brucellosis Chapter 2.4.3.

30- Omer, M. K; Skjerva E; Woldehiwet, Z. and Holstad, G. (2000). Risk factors for Brucella spp. infection in dairy cattle farms in Asmara, State of Eritrea. Prev. Vet. Med. 46: 257-265.

31- Poddar, S. K., Sawyer, M. H., and Connor, J. D. (1998) Effect of inhibitors in clinical specimens on Taq and Tth DNA polymerase-based PCR amplification of influenza A virus. J. Med. Microbiol. 47, 1131–1135.

32- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. C. and Leonard, F. C. (2002). Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 1st ed. Blackwell Science Ltd., London. 163-167.

33- Radostits, O.M; Henderson, J.A; Blood, D.C; Arundel, J.T. and Gay, C.C. (2007). "Veterinary Medicine : A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats, and Horses". 11th Ed; W.B. Saunders Elsevier. UK. Chapter 18, Pp: 966-993.

34- Wilson, G. (1984). Brucella. In: Wilson, G; Miles, A. and Parker, M. T. (eds). Principles of bacteriology, virology and immunity. Vol. 2. 7th ed. Edward Arnold (Publishers) Ltd; London. 141-161.