

بررسی فراوانی باکتری بروسلا کنیس در سگ‌های سقط کرده در شیراز

بهنام پدرام^{۱*}، حسین فتاحی^۲، بهناز نیک افراز^۳، شقایق قناد^۴، حمید خرم^۵

۱- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران

۳- دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

۴- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، شوشتر، ایران

۵- دانش آموخته دکتری تخصصی بیماریهای داخلی دامهای کوچک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: b1pedram@yahoo.com

چکیده

بیماری بروسلوز یک بیماری زئونوز جهانی است که به وسیله گونه‌های مختلف باکتری بروسلا ایجاد می‌گردد. در این مطالعه، حضور باکتری بروسلا در نمونه‌های سرمی و سواب واژن سگ‌های ارجاعی به کلینیک‌های دامپزشکی شیراز مورد بررسی قرار گرفت. به منظور انجام این پژوهش، نمونه خون و سواب واژن از ۵۰ قلاده سگ غیرعقیم ساکن شهر شیراز اخذ شد. از این تعداد، ۲۵ نمونه از مراکز پرورشی سگ‌ها در حوالی شیراز و ۲۵ نمونه از سگ‌های ارجاعی به کلینیک دام‌های کوچک در شیراز جمع‌آوری گردید. آزمایش سرولوژیک با استفاده از کیت ELISA IgG Brucella Canis انجام شد. از میان ۵۰ قلاده سگ، ۱۲ قلاده (۲۴٪) سرولوژی مثبت و ۳۸ قلاده (۷۶٪) منفی بودند. از بین سگ‌های ماده‌ای که جفت‌گیری داشتند، ۳۲ قلاده (۶۶٪) آبستن و ۱۷ قلاده (۳۴٪) غیرآبستن بودند. ۴۲ قلاده (۸۴٪) زایش موفق داشتند و ۸ قلاده فاقد زایش بودند. ۷ قلاده (۱۴٪) سابقه سقط جنین داشتند و در ۴۳ قلاده (۸۶٪) سقط مشاهده نشد. نوزادان ۷ سگ تلف شدند (۱۶/۲۸٪) و نوزادان ۳۶ سگ زنده ماندند (۸۳/۷۲٪). نوزادان ۲ سگ (۴/۶۵٪) دارای ناهنجاری مادرزادی بودند. نمونه‌های سواب واژن با روش Real-time PCR بررسی شدند و باکتری بروسلا در ۲ نمونه (۴٪) شناسایی گردید. یافته‌ها نشان می‌دهند که سگ‌ها می‌توانند یکی از مخازن بالقوه بیماری بروسلوز باشند.

واژه‌های کلیدی: بروسلوز کنیس، الیزا، سواب واژن، سگ

مقدمه

بروسلا کنیس (*Brucella canis*) یکی از گونه‌های پاتوژن جنس بروسلا است که عمدتاً در سگ‌ها بیماری‌زا بوده و در شرایط خاص می‌تواند به انسان نیز منتقل شود. سگ‌ها میزبان طبیعی بروسلا کنیس^۱ می‌باشند ولی این حیوان می‌تواند از طریق خوردن جفت و جنین‌های سقط شده عفونی دام‌های اهلی به بروسلا آبورتوس^۲، بروسلا ملی‌تنسیس^۳ و بروسلا سوئیس^۴ مبتلا شود (۱،۲).

این باکتری گرم‌منفی، هوازی و میله‌ای‌شکل، اغلب از طریق تماس مستقیم با ترشحات تولیدمثلی سگ‌های آلوده، منتقل می‌شود و یکی از عوامل اصلی سقط جنین در سگ‌ها به شمار می‌رود. منابع اصلی آلودگی شامل جنین‌های سقط‌شده، ترشحات واژینال، مایع منی، ادرار و خون هستند که می‌توانند از راه‌های مختلفی از جمله جفت‌گیری، لیسیدن ترشحات یا بلع بقایای جفت و جنین وارد بدن سگ سالم شوند (۵،۶). شیوع عفونت با بروسلا کنیس به عواملی مانند سن، نژاد، شرایط زندگی و موقعیت جغرافیایی بستگی دارد. سگ‌های خانگی نسبت به سگ‌های ولگرد شیوع کمتری دارند که ناشی از کنترل بهتر جمعیت است. عفونت معمولاً در مراکز پرورش باقی‌مانده و با جابجایی حیوانات به مناطق دیگر گسترش می‌یابد. نرخ شیوع در کشورها متفاوت است؛ از ۱ تا ۱۸ درصد در آمریکا و ژاپن، تا ۲۸ درصد در مکزیک و پرو. در جنوب

آمریکا نژادهایی مانند بیگل و لابرادور رتریور بیشتر درگیر هستند. مواردی از بیماری در اروپا، شمال آفریقا و چین نیز گزارش شده و حتی در سگ‌های وارداتی از کشورهایی با قرنطینه‌های سخت نیز دیده شده است. بنابراین غربالگری سگ‌های وارداتی از مناطق اندمیک ضروری است (۸). علائم بالینی بروسلوز در سگ‌ها متنوع بوده و بسته به جنس حیوان و مرحله بیماری متفاوت است. در ماده‌ها، سقط جنین معمولاً در اواخر آبستنی (هفته‌های ۷ تا ۹) رخ می‌دهد و ممکن است با ترشحات چرکی واژینال همراه باشد. همچنین ناباروری و زایمان توله‌های مرده یا ناتوان نیز از دیگر نشانه‌های بالینی در ماده‌ها محسوب می‌شود. در نرها، بیماری با التهاب بیضه‌ها (ارکیت)، اپیدیدیمیت و در نهایت آتروفی بیضه بروز می‌کند که اغلب منجر به ناباروری می‌شود. در موارد پیشرفته، بروسلا کنیس می‌تواند موجب دیسکواسپوندیلیت (التهاب دیسک بین‌مهره‌ای) گردد که با درد، لنگش و ناتوانی حرکتی همراه است. علائم عمومی نظیر بی‌حالی، کاهش اشتها، کاهش وزن و بزرگ شدن غدد لنفاوی نیز ممکن است مشاهده شود. در سگ‌های مبتلا به بروسلوز، خصوصاً گونه‌های غیر اختصاصی، ممکن است حیوان در عین آلودگی هیچ‌گونه علائمی را از خود نشان ندهد (۸،۹،۱۰).

تشخیص قطعی عفونت ناشی از بروسلا کنیس در سگ‌ها به طور معمول بر پایه روش‌های کشت باکتری و آزمون‌های

^۳- *B. melitensis*

^۴- *B. suis*

^۱- *B. Canis*

^۲- *B. abortus*

در سال ۱۹۸۶ ادسیون و همکاران بر روی شیوع آنتی‌بادی بروسلا آبورتوس و بروسلا کنیس در سگ‌ها و به روش آزمایش‌های رزینگال و آگلوتیناسیون در کشور نیجریه تحقیق کردند (۱۶).

در سال ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹ یانگ در کشور چین شیوع بیماری بروسلا را در بین نژادهای مختلف و با آزمایش‌های رزینگال و آگلوتیناسیون در بین سگ‌های ولگرد بررسی کرد (۱۷).

در سال ۲۰۱۲ طی مطالعه دنتینجر و همکاران در نیویورک یک مورد ابتلا به بروسلا کنیس را در کودک ۳ ساله با علائم تب و اختلال تنفسی گزارش کردند. تشخیص از طریق کشت خون انجام شد و پس از درمان آنتی‌بیوتیکی بیمار بهبود یافت. سگ آلوده شناسایی و قرنطینه شد و ۳۱ نفر از کارکنان آزمایشگاه نیز در معرض آلودگی قرار داشتند (۱۸).

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع مقطعی و در سال ۱۴۰۲ بر روی ۵۰ قلاده سگ ماده، عقیم‌نشده و ارجاع‌شده به کلینیک‌های دام کوچک شهر شیراز انجام شد. از هر حیوان حدود ۵ میلی‌لیتر خون و یک نمونه سواب واژینال تهیه گردید.

خون‌ها از ورید جاگولار یا سافن گرفته و در لوله‌های ژل‌دار (FL Medical, Italy) ریخته شدند. پس از لخته شدن کامل، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ G در دستگاه سانتریفیوژ قرار گرفتند و سرم جدا شد. سرم هر نمونه

سرولوژیک انجام می‌گیرد. با توجه به سختی و زمان‌بر بودن کشت، آزمایش‌های سرولوژیک مانند تست آگلوتیناسیون سریع (RSAT)، تست آگلوتیناسیون با ۲-مرکاپتو اتانول (2ME-RSAT) و الیزا به عنوان روش‌های رایج‌تر، سریع‌تر و کاربردی‌تر برای شناسایی پادتن‌های ضد بروسلا در سرم حیوانات مشکوک مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). بروسلا کنیس از نظر بهداشت عمومی نیز اهمیت دارد، چرا که به‌عنوان یک پاتوژن زئونوز، توانایی انتقال به انسان را دارد. انتقال در انسان معمولاً از طریق تماس مستقیم با ترشحات یا نمونه‌های آلوده در محیط‌های آزمایشگاهی یا کلینیکی رخ می‌دهد و بیشتر افرادی که با سگ‌ها یا بافت‌های آلوده در تماس هستند (مانند دامپزشکان، تکنسین‌های آزمایشگاه و پرورش‌دهندگان سگ)، در معرض خطر قرار دارند. علائم بیماری در انسان معمولاً غیراختصاصی بوده و شامل تب مداوم یا متناوب، تعریق شبانه، درد عضلانی و مفصلی، خستگی مزمن و در مواردی نادر، دیسکواسپوندیلیت یا آرتریت می‌باشد.

ایران به عنوان یکی از مناطق اندمیک بروسلا مطرح است و علیرغم تلاش‌های زیاد در زمینه‌ی مبارزه با آن، هنوز به عنوان یک معضل بهداشتی و با شیوع بالا در اکثر استان‌های کشور مطرح است (۱۲، ۱۳). با توجه به نقش بروسلا کنیس در سگ‌ها و خطرات احتمالی برای انسان، توجه به پیشگیری، مدیریت و کنترل کنل‌های پرورش سگ یا کنل‌های آلوده از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۴، ۱۵).

استخراج DNA از سواب‌های واژینال با استفاده از کیت GeneAll Exgene™ (Korea) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. واکنش Real-Time PCR با استفاده از Master mix آماده (Solis BioDyne، تکاپوزیست ایران) انجام گردید. ابتدا واکنش با DNA بروسلا/بورتوس سویه واکسنی برای استاندارد سازی انجام شد. پنج رقت متوالی (10^{-1} تا 10^{-5}) تهیه و بررسی شد؛ اختلاف Cq بین رقت‌ها حدود ۳ سیکل مشاهده شد که نشان‌دهنده کارایی مناسب بود. سپس واکنش برای نمونه‌های DNA استخراج‌شده اجرا گردید که توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

وزن محصول (bp)	توالی	نام پرایمر
169	TCAATGCGATCAAGTCGG	BCSP31-F
	GCATCCTTACGCGCAA	BCSP31-R

جدول ۱: توالی پرایمرها

در لوله‌های ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌لیتری شماره‌گذاری و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

برای ارزیابی IgG ضد *Brucella canis* از دو کیت الیزا (PISHTAZTEB, Iran) استفاده شد. ابتدا کلیه معرف‌ها از دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد به دمای محیط منتقل شدند. نمونه‌ها یخ‌زدایی و با ورتکس یکنواخت شدند. از هر نمونه ۱۰ میکرولیتر سرم برداشته و با ۴۰ میکرولیتر بافر رقیق‌کننده مخلوط شد. نمونه‌ها در پلیت الیزا همراه با کنترل مثبت و منفی مطابق دستورالعمل کیت قرار گرفتند و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس با استفاده از دستگاه ELx50 (Bio Tek, USA) پنج مرتبه با بافر شستشو، چاهک‌ها شسته شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر آویدین HRP به چاهک‌ها اضافه و مجدداً انکوبه و شسته شد. در مرحله آخر، سوبسترای A و B و محلول توقف افزوده شد و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه ELISA Reader (BioTek 800, USA) خوانده شد. تفسیر نتایج براساس دستور کیت انجام گرفت.

نمونه‌های سرمی مثبت در آزمون ELISA با آنتی‌ژن بروسلا/بورتوس و بروسلا ملی تنسیس نیز توسط تست رزبنگال ارزیابی شدند. به میزان مساوی (۳۰ میکرولیتر) از آنتی‌ژن و سرم بر روی صفحه‌ی تمیز ریخته شد، سپس مخلوط و پس از ۴ دقیقه از نظر آگلوتیناسیون صورتی بررسی شد. تمام نمونه‌ها از نظر این دو آنتی‌ژن منفی گزارش شدند.

نحوه نگهداری	تعداد(قلاده)	فراوانی نسبی	نتیجه آزمون کای اسکوتر
سگ خانگی	۲۵	۵۰	$X^2=۰/۰۳^{ns}$ $Df=۱$ $P=۱/۰۰$
سگ ولگرد	۲۵	۵۰	
مجموع	۵۰	۱۰۰	

جدول ۳: تعداد و درصد فراوانی نسبی آزمودنی‌ها بر اساس نحوه نگهداری و مقایسه با آزمون کای اسکوتر

از نظر محل نگهداری اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون کای اسکوتر در سطح احتمال یک درصد بین نگهداری داخل منزل و بیرون از منزل وجود داشت(جدول ۴)

محل نگهداری	تعداد(قلاده)	فراوانی نسبی	نتیجه آزمون کای اسکوتر
داخل منزل	۱۵	۳۰	$X^2=۷/۲۲$ $Df=۱$ $P=۰/۰۰۵$
بیرون منزل	۳۵	۷۰	
مجموع	۵۰	۱۰۰	

جدول ۴: تعداد و درصد فراوانی نسبی آزمودنی‌ها بر اساس محل نگهداری و مقایسه با آزمون کای اسکوتر

از نظر فاکتور سن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون کای اسکوتر وجود داشت. بطوریکه بیشترین فراوانی مربوط به سن دو تا چهار سال (۶۰ درصد) و کمترین مربوط به کمتر از دو سال و چهار تا شش سال (۱۰ درصد) بود(نمودار ۱).

برنامه زمانی انجام Real-time PCR در جدول ۲ آمده است.

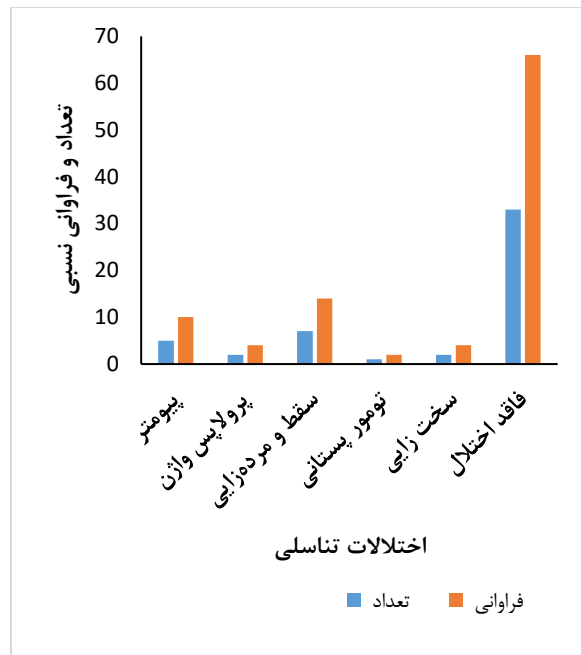
تعداد چرخه	زمان	دما(C)	مرحله
۱	۱۵ دقیقه	۹۵	پیش گرمایش
۳۵	۱۵ ثانیه	۹۵	دناتوراسیون
۳۵	۲۰	۶۰	اتصال پرایمر
۳۵	۲۰	۷۲	گسترش
۱	۱۰	۹۵	مرحله ذوب
۱	۱۰	۶۵	اتصال
۱	۱	۹۷	گسترش

جدول ۲: برنامه زمانی انجام Real-time PCR

تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. برای مقایسه فراوانی تیتر مثبت بین گروه‌های مختلف، از آزمون کای دو و در موارد لزوم از آزمون دقیق فیشر استفاده گردید. مقایسه متغیرهای پیوسته بین دو گروه مثبت و منفی از نظر وجود آنتی‌بادی بروسلا با آزمون T پارامتریک انجام شد. سطح معنی‌داری در تمامی آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

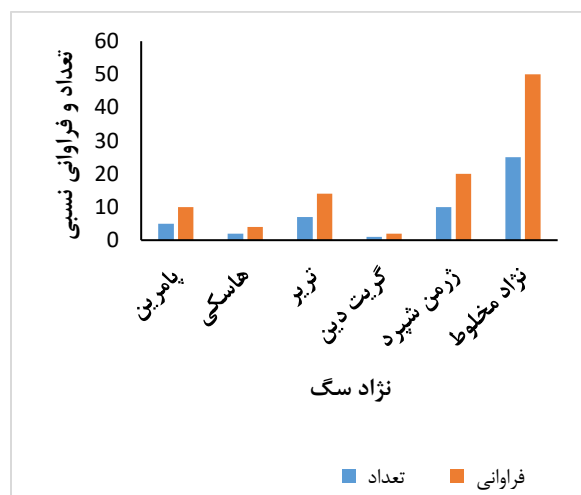
نتایج

براساس جدول ۳ از نظر نحوه نگهداری بین ۵۰ نمونه مورد بررسی از لحاظ خانگی (۵۰ درصد) و یا ولگرد بودن (۵۰ درصد)، بین دو گروه سگ اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون کای اسکوتر وجود نداشت.

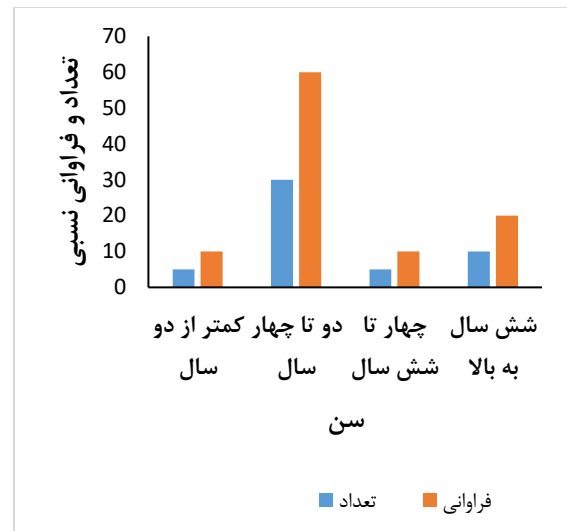


نمودار ۲: تعداد و درصد فراوانی نسبی آزمون‌های بر اساس اختلالات تناسلی

نتایج حاصل از بررسی نژادهای سگ نشان داد که در این پژوهش بیشترین نژاد سگ مربوط به نژاد مخلوط با فراوانی ۵۰ درصد و کمترین مربوط به نژاد گریت دین با فراوانی ۲ درصد می‌باشد (نمودار ۳).



نمودار ۳: تعداد و درصد فراوانی نسبی آزمون‌های بر اساس نژاد سگ



نمودار ۱: تعداد و درصد فراوانی نسبی آزمون‌های بر اساس سن

نتایج حاصل از وضعیت آبستنی نشان داد که فراوانی سگ‌های آبستن در این پژوهش بیشتر از سگ‌های غیر آبستن بوده و اختلاف معنی‌داری بین دو گروه آبستن و غیر آبستن با استفاده از آزمون کای اسکور در سطح احتمال ۵ درصد وجود داشت (جدول ۵).

وضعیت آبستنی	تعداد (قلاده)	فراوانی نسبی	نتیجه آزمون
سگ آبستن	۳۳	۶۶	$X^2=4/5$
سگ غیر آبستن	۱۷	۳۴	$Df=1$
مجموع	۵۰	۱۰۰	$P=0/024$

جدول ۵: تعداد و درصد فراوانی نسبی آزمون‌های بر اساس وضعیت آبستنی و مقایسه با آزمون کای اسکور

از لحاظ اختلالات تناسلی کمترین اختلال مربوط به تومور پستانی (۲ درصد) و بیشترین مربوط به گروه فاقد اختلال (۶۶ درصد) بود (نمودار ۲).

نتیجه‌ی آزمون مربع کای در این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی داری در مورد ارتباط جفت گیری بین جمعیت سروپازتو و سرونکاتو دیده نمی شود ($p=0/074$).

در مورد میزان ارتباط زایش موفق با حضور آنتی بادی بروسلا کنیس، مجموعاً تعداد ۵۰ قلاده سگ (سگ های ماده ای که جفت گیری داشتند) مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۷).

تعداد کل در هر ردیف	تعداد سگ‌هایی که زایش نداشتند	تعداد سگ‌هایی که زایش داشتند	
۱۲	۲ (٪۲۳)	۱۰ (٪۷۷)	سروپازتو ^a
۳۸	۶ (٪۲۷/۱)	۳۲ (٪۷۲/۹)	سرونکاتو ^a
۵۰	۸ (٪۱۰۰)	۴۲ (٪۱۰۰)	تعداد کل در هر ستون

جدول ۷: مقایسه‌ی تعداد و درصد سگ‌های سروپازتو و سرونکاتو آزمایش شده از نظر سابقه‌ی زایش پس از جفت گیری

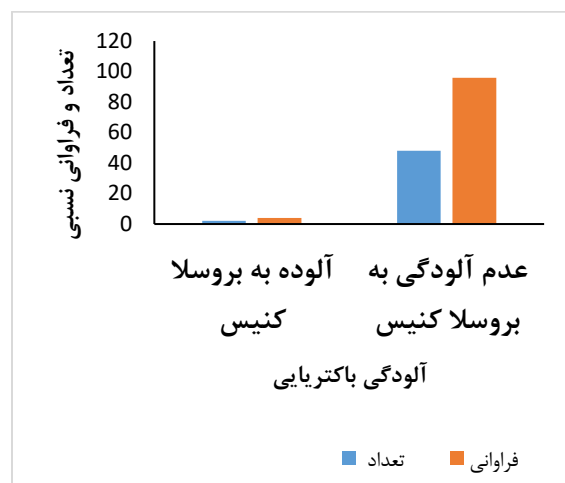
نتیجه‌ی آزمون مربع کای در این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی داری در مورد زایمان موفق سگ ها بین جمعیت سروپازتو و سرونکاتو دیده نمی شود ($p=0/797$).

در مورد میزان وقوع سقط با حضور آنتی بادی بروسلا کنیس، مجموعاً تعداد ۵۰ قلاده سگ (سگ های ماده ای که جفت گیری داشتند) مورد ارزیابی قرار گرفتند. (جدول ۸)

تعداد کل در هر ردیف	تعداد سگ‌هایی که سقط نداشتند	تعداد سگ‌هایی که سقط داشتند	
۱۶	۱۱ (٪۲۵/۵۸)	۵ (٪۷۱/۴۳)	سروپازتو ^a
۳۴	۳۲ (٪۷۴/۴۲)	۲ (٪۲۸/۵۷)	سرونکاتو ^b
۵۰	۴۳ (٪۱۰۰)	۷ (٪۱۰۰)	تعداد کل در هر ستون

جدول ۸: مقایسه‌ی تعداد و درصد سگ‌های سروپازتو و سرونکاتو آزمایش شده از نظر سابقه‌ی سقط

از نظر آلودگی به باکتری، نتایج حاصل از آزمون کای اسکوئر حاکی از معنی داری در سطح احتمال یک درصد بین دو گروه می‌باشد (نمودار ۴).



نمودار ۴: تعداد و درصد فراوانی نسبی آزمودنی‌ها بر اساس آلودگی باکتریایی بروسلا کنیس

در مورد میزان ارتباط جفت گیری با حضور آنتی بادی بروسلا کنیس، مجموعاً تعداد ۵۰ قلاده سگ (تمامی سگ‌های مورد مطالعه) مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۶).

تعداد کل در هر ردیف	تعداد سگ‌هایی که فقط یکبار جفت‌گیری داشتند	تعداد سگ‌هایی که بیش از یکبار جفت‌گیری داشتند	
۱۲	۱ (٪۱۴/۲۸)	۱۱ (٪۲۵/۵۹)	سروپازتو ^a
۳۸	۶ (٪۸۵/۷۲)	۳۲ (٪۷۴/۴۱)	سرونکاتو ^a
۵۰	۷ (٪۱۰۰)	۴۳ (٪۱۰۰)	تعداد کل در هر ستون

جدول ۶: مقایسه‌ی تعداد و درصد سگ‌های سروپازتو و سرونکاتو آزمایش شده از نظر جفت گیری

تعداد کل در هر ردیف	تعداد سگ با توله بدون ناهنجاری	تعداد سگ با توله ناهنجار	
۱۲	۱۲ (٪۳۰)	۰ (٪۰)	سروپازتیو ^a
۳۰	۲۸ (٪۷۰)	۲ (٪۱۰۰)	سرونگاتیو ^b
۴۲	۴۰ (٪۱۰۰)	۲ (٪۱۰۰)	تعداد کل در هر ستون

جدول ۱۰: مقایسه ی تعداد و درصد سگ های سروپازتیو و سرونگاتیو آزمایش شده از نظر ناهنجاری های مادرزادی در توله های آن ها

نتیجه ی آزمون مربع کای در این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی داری در مورد تولد توله های دارای ناهنجاری های مادرزادی در سگ های سروپازتیو در مقابل سگ های سرونگاتیو وجود دارد (p=0/03).

در مورد میزان ارتباط عدم آبستن شدن با حضور آنتی بادی بروسلا کنیس، مجموعاً تعداد ۵۰ قلاده سگ (سگ های ماده ای که جفت گیری داشتند) مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱۱).

تعداد کل در هر ردیف	تعداد سگ هایی که آبستن می شوند	تعداد سگ هایی که آبستن نمیشوند	
۱۲	۲ (٪۶/۰۶)	۱۰ (٪۵۸/۸۲)	سروپازتیو ^a
۳۸	۳۱ (٪۹۳/۹۴)	۷ (٪۴۱/۱۸)	سرونگاتیو ^b
۵۰	۳۳ (٪۱۰۰)	۱۷ (٪۱۰۰)	تعداد کل در هر ستون

جدول ۱۱: مقایسه ی تعداد و درصد سگ های سروپازتیو و سرونگاتیو آزمایش شده از نظر باروری

نتیجه ی آزمون مربع کای در این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی داری در مورد عدم باروری در سگ های سروپازتیو در مقابل سگ های سرونگاتیو وجود دارد (p=0/018).

نتیجه ی آزمون مربع کای در این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی داری در مورد افزایش میزان سقط در سگ های سروپازتیو در مقابل سگ های سرونگاتیو وجود دارد (p=0/00).

در مورد میزان وقوع مرگ و میر توله ها پس از تولد با حضور آنتی بادی بروسلا کنیس، مجموعاً تعداد ۴۲ قلاده سگ (سگ های ماده ای که زایش داشتند) مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۹).

تعداد کل در هر ردیف	تعداد سگ با توله زنده مانده	تعداد سگ یا توله تلف شده	
۱۶	۷ (٪۲۰)	۵ (٪۷۱/۴۳)	سروپازتیو ^a
۳۴	۲۸ (٪۸۰)	۶ (٪۲۸/۵۷)	سرونگاتیو ^b
۴۲	۳۵ (٪۱۰۰)	۷ (٪۱۰۰)	تعداد کل در هر ستون

جدول ۹: مقایسه ی تعداد و درصد سگ های سروپازتیو و سرونگاتیو آزمایش شده از نظر وضعیت زنده مانده توله ها

نتیجه ی آزمون مربع کای در این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی داری در مورد مرگ و میر توله ها در سگ های سروپازتیو در مقابل سگ های سرونگاتیو وجود دارد (p=0/00).

در مورد میزان وقوع ناهنجاری های مادرزادی در توله ها با حضور آنتی بادی بروسلا کنیس، مجموعاً تعداد ۴۲ قلاده سگ (سگ های ماده ای که زایش داشتند) مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱۰).

علیه بروسلا کنیس ۶/۶٪ اعلام شد. علائم مشاهده شده در این مرکز شامل سقط، ناهنجاری های مادرزادی هنگام تولد و ناباروری بود که تقریباً با نتایج مطالعه ما یکسان بود (۱۹).

بهبودی و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطالعه ای با روش ICT (سنجش ایمونوکروماتوگرافی) بر روی ۲۱ قلاده سگ از یک مرکز پرورش در حوالی شیراز انجام دادند. میزان شیوع سرمی بروسلا کنیس در این مرکز ۵۷/۲٪ اعلام شد. همه ی موارد مثبت بزرگتر از ۲ سال بوده و ۷۵٪ از موارد مثبت را سگ های ماده تشکیل می دادند [20]. با توجه به محدود بودن جمعیت سگ های نمونه گیری شده توسط بهبودی و همکاران حصول درصد شیوع بالا و اختلاف با مطالعه ی حاضر دور از انتظار نیست.

مصلی نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی ۲۴۳ قلاده سگ ارجاعی به بیمارستان دانشکده ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که برای واکسیناسیون و یا سایر بیماری ها مراجعه کرده و به صورت تصادفی انتخاب شده بودند؛ آزمون ICT را انجام دادند. تعداد ۱۶ مورد مثبت و میزان شیوع سرمی آنتی بادی های علیه بروسلا کنیس در این جمعیت ۶/۸۵٪ محاسبه شد (۲۱).

اختلاف مشاهده شده در میزان فراوانی به دست آمده در مطالعه ی حاضر با مطالعه ی مصلی نژاد و همکاران (اهواز ۲۰۱۳) به دلیل جمعیت سگ های ارزیابی شده در این دو مطالعه است که در مطالعه ی حاضر بر روی جمعیت سگ

در مورد میزان ارتباط اختلالات تناسلی با حضور آنتی بادی بروسلا کنیس در سگ های ماده، مجموعاً تعداد ۵۰ قلاده سگ (سگ های ماده) مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱۲).

تعداد کل در هر ستون	تعداد سگ ماده با اختلال تناسلی	تعداد سگ ماده بدون اختلال تناسلی	تعداد کل در هر ردیف
سروپازتیو ^a	۱۲ (۷۰/۵۹٪)	۰ (۰٪)	۱۲
سرونگاتیو ^b	۵ (۲۹/۴۱٪)	۳۳ (۱۰۰٪)	۳۸
تعداد کل در هر ستون	۱۷ (۱۰۰٪)	۳۳ (۱۰۰٪)	۱۱۷

جدول ۱۲: مقایسه ی تعداد و درصد سگ های ماده ی سروپازتیو و سرونگاتیو آزمایش شده از نظر اختلالات تناسلی

نتیجه ی آزمون مربع کای در این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی داری در مورد افزایش اختلالات تناسلی در سگ های ماده ی سروپازتیو در مقابل سگ های ماده ی سرونگاتیو وجود دارد ($p=0/001$).

کد نمونه	Cq
کنترل مثبت (رقت 10^{-1})	۱۶/۰۴
کنترل مثبت (رقت 10^{-2})	۱۹/۵۷
کنترل مثبت (رقت 10^{-3})	۲۳/۸۰
کنترل مثبت (رقت 10^{-4})	۲۷/۱۲
کنترل مثبت (رقت 10^{-5})	۳۱/۳۳

جدول ۱۳: نتایج Real-time PCR

بحث

در سال ۲۰۰۸ آزمایش هایی در یک مرکز نگهداری و پرورش سگ در ایالت ساسکاچوان کانادا توسط برنان و همکاران انجام شد. تعداد ۳۳ سگ در این مرکز ساکن بودند که با آزمایش IFA تعداد ۲۰ قلاده مثبت و شیوع سرمی آنتی بادی های

نتیجه گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه با بخشی از مطالعات داخلی و بین‌المللی همخوان است و تأیید می‌کند که سگ‌ها می‌توانند به‌عنوان مخزن خاموش بروسلا کنیس عمل کرده و نقش مهمی در اپیدمیولوژی بروسلاز بازی کنند. با توجه به زئونوتیک بودن بیماری، انجام اقدامات کنترلی، عقیم‌سازی، غربالگری منظم، آموزش به صاحبان سگ و پایش مداوم بیماری می‌تواند نقش مؤثری در کاهش شیوع آن داشته باشد.

های غیر عقیم ساکن در مراکز پرورش و یا ارجاعی به بیمارستان‌ها و کلینیک‌های دام کوچک شهر شیراز کار شده ولی در مطالعه‌ی مصلی نژاد و همکاران نمونه‌های اخذ شده به صورت تصادفی از میان سگ‌های ارجاعی به بیمارستان دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتخاب شده که سالم یا بیمار بوده و احتمال عقیم بودن یا پایین بودن سن آن‌ها وجود داشته که خود باعث کاهش سابقه‌ی برخورد با عفونت می‌شود.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ توسط اودو و همکاران در نیجریه بر روی ۳۴۷ قلاده سگ ارجاعی به بیمارستان انجام شد، میزان شیوع سرمی آنتی بادی‌های علیه بروسلا کنیس با روش ELISA برابر ۱۴/۵۷ درصد محاسبه شد. میزان شیوع سرمی این بیماری در بین سگ‌های بالغ ۸۴/۳ درصد و در میان توله‌ها ۱۵/۷ درصد ارزیابی شد. میزان ۷۸/۴ درصد از موارد مثبت نر و ۲۱/۶ درصد از موارد مثبت ماده بودند (۲۲). این مطالعه از نظر میزان شیوع سرمی آنتی بادی‌های علیه بروسلا کنیس با مطالعه‌ی حاضر مشابهت دارد.

نکته قابل توجه این است که تفاوت در نتایج مطالعات می‌تواند ناشی از نوع سگ‌های مورد بررسی (خانگی، ولگرد، نگهبان)، روش‌های آزمایشگاهی (PCR، ELISA، IFA، RSAT) جمعیت نمونه، شرایط اقلیمی، وضعیت بهداشتی منطقه و حتی رفتارهای پرورشی و تغذیه‌ای باشد.

منابع

۱. احمدی، ملاح؛ دستمالچی ساعی، حبیب. اصول باکتری شناسی دامپزشکی، اصول باکتری شناسی دامپزشکی، تالیف جی. آر، کارتر و دالارچی، وایس. چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه، ۱۳۸۷، صفحات ۲۶۲ - ۲۴۷.
۲. حسن آبادی، ن. رضایی، م، خلیلی، م: بررسی حضور باکتری جنس بروسلا در نمونه های سواب واژنی جمع آوری شده از سگ های ارجاعی به بیمارستان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان به روش PCR. پایان نامه دانشکده دامپزشکی کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، سال تحصیلی ۱۳۹۷.
۳. ذوقی، اسماعیل. "سیمای بالینی و آزمایشگاهی بروسلوز در انسان تا لیف ادوارد جی یانگ، میخائیل جی کوربل. چاپ اول، موسسه انتشاراتی سازمان نظام دامپزشکی، ۱۳۸۲، صفحات ۱۵۶ - ۹۴.
۴. شیمی، احمد. باکتری شناسی دامپزشکی و بیماری های باکتریایی، باکتری شناسی دامپزشکی و بیماری های باکتریایی، چاپ اول، موسسه نشر جهاد دانشگاهی، ۱۳۷۶، صفحات ۳۳۷ - ۳۰۷.
۵. قربانپور نجف آبادی، م. مصلی نژاد، ب، محمدیان، ن: جستجوی آنتی بادی ضد بروسلوز (بروسلا کنیس) در سگ های شهری و روستایی شهرستان اهواز به روش ایمنو کروماتوگرافی. پایان نامه دانشکده دامپزشکی اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، سال تحصیلی ۱۳۸۹.
۶. مشهدی رفیعی، سیامک؛ آل داود، سید جاوید؛ نجار، محمدهادی. بررسی سرو اپیدمیو، وژی بروسلوز در سگ های بومی شهرستان نیشابور، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد گرمسار، ۱۳۸۹، صفحات ۶ - ۱.
۷. میرشکاری، پ. سرچاهی، ع، مهری، م: بررسی مقدماتی سرولوژیکی بروسلا کنیس در شهرستان مشهد. پایان نامه دانشکده دامپزشکی مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، سال تحصیلی ۱۳۹۸.
8. Dahlbom, M.; Johnsson, M.; Myllys, V.; Taponen, J. and Andersson, M. (2009). Seroprevalence of canine herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish breeding kennels with and without reproductive problems. *Reproduction Domestic Animals*, 44 (1): 128-131.
9. Dahlbom, M.; Johnsson, M.; Myllys, V.; Taponen, J. and Andersson, M. (2009). Seroprevalence of canine herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish breeding kennels with and without reproductive problems. *Reproduction Domestic Animals*, 44 (1): 128-131.

10. Christopher S, Umapathy B, Ravikumar K. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *Journal of laboratory physicians*. 2010;2(2):55
11. Megid J, Mathias LA, Robles C. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. *The Open Veterinary Science Journal*. 2010:119-26.
12. Cosford KL. *Brucella canis*: An update on research and clinical management. *The Canadian Veterinary Journal*. 2018;59(1):74.
13. Adesiyun AA, Abdullahi SU, Adeyanju JB. Prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella canis* antibodies in dogs in Nigeria. *J Small Anim Pract*. 1986 Jan;27(1):31–7.
14. Capasso L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *Journal of Infection*. 2002;45(2):122-7.
15. De Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rossetti CA, Adams LG. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*–Host Interactions. *The American journal of pathology*. 2015;185(6):1505-17.
16. Ruiz-Mesa J, Sanchez-Gonzalez J, Reguera J, Martin L, Lopez-Palmero S, Colmenero J. Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. *Clinical microbiology and infection*. 2005;11(3):221-5.
17. Smits HL, Kadri SM. Brucellosis in India: a deceptive infectious disease. *Indian Journal of Medical Research*. 2005;122(5):375.
18. Keid LB, Soares RM, Vasconcellos SA, Chiebao D, Salgado V, Megid J, et al. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology*. 2007;68(9):1260-70.56.
19. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. *The Lancet infectious diseases*. 2007;7(12):775-86.
20. Dentinger CM, Jacob K, Lee LV, Mendez HA, Chotikanatis K, McDonough PL, et al. Human *Brucella canis* infection and subsequent laboratory exposures associated with a puppy, New York City, 2012. *Zoonoses and public health*. 2015;62(5):407-14.
21. Brown J, Blue J, Wooley R, Dreesen D, Carmichael L. A serologic survey of a population of Georgia dogs for *Brucella canis* and an evaluation of the slide agglutination test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1976;169(11):1214-6.

-
22. Higgins R, Hoquet F, Bourque R, Gosselin Y. A serological survey for *Brucella canis* in dogs in the province of Quebec. *The Canadian Veterinary Journal*. 1979;20(11):315.

Investigation of the prevalence of *Brucella Canis* bacteria in aborted dogs in Shiraz

Behnam Pedram^{*1}, Hosein Fatahi², Behnaz Nikafriz³, Shaqayeq Qannad⁴, Hamid Khorram⁵

1. Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture and Veterinary Medicine, Shushtar Branch, Islamic Azad University, Shushtar, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazerun Branch, Kazerun, Iran
3. Doctor of Veterinary Medicine graduate, Shushtar Branch, Islamic Azad University, Shushtar, Iran
4. Doctor of Veterinary Medicine student, Shushtar Branch, Islamic Azad University, Shushtar, Iran
5. Ph.D in Small Animal Internal Diseases, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

***Corresponding author: b1pedram@yahoo.com**

Abstract

Brucellosis is a globally distributed zoonotic disease caused by various species of *Brucella*. This study aimed to investigate the presence of *Brucella* in serum and vaginal samples of non-neutered dogs in Shiraz. For this purpose, blood and vaginal swab samples were collected from 50 non-neutered dogs. Of these, 25 samples were taken from dog breeding centers around Shiraz and 25 from dogs referred to small animal clinics within the city. Serological analysis was performed using an IgG ELISA kit specific for *Brucella canis*. Among the sampled dogs, 12 (24%) were seropositive and 38 (76%) were seronegative. Of the mated female dogs, 32 (66%) were pregnant, while 17 (34%) were not. A total of 42 dogs (84%) gave birth, and 8 did not. Seven females (14%) had a history of abortion, and no abortion was observed in the remaining 43 (86%). Puppies of 7 dogs (16.28%) died, and puppies of 2 dogs (4.65%) had congenital anomalies. Vaginal swab samples were analyzed using Real-time PCR, and *Brucella* DNA was detected in 2 out of 50 samples (4%). According to these findings, dogs should be considered a potential reservoir of brucellosis. Detection of *Brucella* in vaginal samples highlights the need for more comprehensive surveillance in canine populations in this region.

Key words: *Brucella canis*, ELISA, Vagina soap, Dog