

# بررسی فراوانی کراتوکونژنکتیویت عفونی ناشی از موراکسلا بویس در گاو

شاهین نکویی<sup>۱\*</sup>، افشین رئوفی<sup>۲</sup>، مهدی سخا<sup>۳</sup>، حسن ممتاز<sup>۴</sup>

## A survey on frequency of infectious bovine keratoconjunctivitis caused by moraxella bovis in cattle

Nekouei. S.<sup>1\*</sup>, Raoufi. A.<sup>2</sup>, Sakha M.<sup>3</sup>, Momtaz. H.<sup>4</sup>

1- \* Department of clinical science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahr-e-Kord Branch, Islamic Azad University, Shahr-e-Kord, Iran (Nekouei\_s@yahoo.com).

2- Department of clinical science, Faculty of Veterinary Medicine Tehran University, Tehran -Iran.

3- Department of clinical science, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

4- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahr-e-Kord Branch, Islamic Azad University, Shahr-e-Kord, Iran

This study was done with the aim of surveing of frequency rate of Infectious Keratoconjunctivitis caused by Moraxell bovis.

For this purpose, history of animals including time and frequency of previous ocular diseases, types of ocular disorders, and measurement of vision were recorded.

From 11500 cattle, 100 cattle affected to eyes disorders were examined physically.

For paraclinical examinations samples were collected from affected eyes to Infectious Keratoconjunctivitis. The samples were tested for: bacteriology and molecular. Molecular test (PCR test) were used for detecting Moraxella bovis.

Results showed that from 100 cattle which suffered from eyes disorders, 27 cattle were affected to bovin infectious Keratoconjunctivis. (Moraxella bovis was isolated from 27 cattle).

**Key words:** Ocular disorders, Infectious Keratoconjunctivitis, Moraxella bovis, Cattle

## چکیده

این مطالعه با هدف بررسی میزان فراوانی کراتوکونژنکتیویت عفونی (Infectious Keratoconjunctivitis) ناشی از موراکسلا بویس انجام شد. برای این منظور تاریخچه ای مربوط به دامها شامل زمان و تعداد موارد قبلی اختلالات چشم، نوع اختلالات چشمی و میزان بینایی دام ثبت شد. از ۱۱۵۰۰ راس گاو، ۱۰۰ راس گاو مبتلا به اختلالات چشم، مورد معاینه بالینی قرار گرفتند. جهت مطالعات آزمایشگاهی از چشم های مبتلا به کراتوکونژنکتیویت عفونی نمونه برداری شد. آزمایشات مولکولی (PCR) (Polymerase Chain Rection) جهت تشخیص موراکسلا بویس بر روی نمونه های جمع آوری شده انجام شد. نتایج نشان داد که از ۱۰۰ راس گاو مبتلا به اختلالات چشم، ۲۷ راس گاو مبتلا به بیماری کراتوکونژنکتیویت عفونی ناشی از موراکسلا بویس (Moraxella bovis) بودند.

واژگان کلیدی: اختلالات چشم، کراتوکونژنکتیویت عفونی، موراکسلا بویس، گاو

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۳ تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۵

## مقدمه

اصولاً معاینه چشم و ساختارهای چشم در مورد هر دامی از اهمیت زیاد برخوردار است. چرا که به دنبال ابتلای چشم به بیماری های مادرزادی و اکتسابی، دام دچار کاهش تولید و حتی در مواردی حذف از گله می گردد.

از طرف دیگر در بیماری های اکتسابی چشم می توان با اخذ نمونه های لازم، اقدام به تشخیص عامل و نوع بیماری کرده و سپس درمان به موقع و موثر را انجام داد و از هزینه های اضافی، درمان های بی نتیجه جلوگیری بعمل آورد.

از جمله این بیماری ها، کراتو کونژنکتیویت عفونی چشم است که با توجه به علائم مشاهده شده بر روی چشم دام و نمونه برداری لازم از آن آزمایش PCR، می توان یکی از عوامل

۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

داخل ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل به آزمایشگاه باکتری شناسی منتقل گردید.

اگر هر دو چشم گاو دچار علائم درگیری بودند، در کنار نمونه برداری از چشم های مبتلا، از چشم یک راس گاو سالم در همان گله به صورت همزمان نمونه برداری می گردید و اگر یک چشم نشانه درگیری را نشان می داد، ضمن نمونه برداری از چشم سالم همان گاو، از چشم گاو سالمی که در همان محل نگهداری می شد به طور همزمان نمونه برداری می گردید.

سپس آزمایش مولکولی PCR جهت ردیابی عامل موراکسلابووویس استفاده شد. در این آزمایش از زوج پرایمرهای زیر استفاده گردید:

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی موراکسلابووویس

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
Moraxella -F 5'	GTG AAG TCG TAA CAA GGT ACC CGT -3'	۶۵۰
Moraxella -R 5'	ACG GAC GCT TAT CGC AGC CTA TGA-3'	

سرانجام در آزمایش PCR نمونه هایی که از چشم مبتلا، آلوده به موراکسلابووویس تشخیص داده شدند ولی در چشم سالم فاقد این باکتری بودند به عنوان بیماری کراتو کونژونکتیویت عفونی قبل به موراکسلابووویس در نظر گرفته شدند.

جهت انجام آزمایش PCR پس از نمونه برداری از چشم ها، از سوآپ اخذ شده مستقیماً با استفاده از کیت (Fermentas) DNA genomic purification نمونه DNA استخراج و با استفاده از از زوج پرایمرهای معرفی شده در جدول ۱ آزمون PCR انجام گرفت.

PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واحد، ۵ میکرولیتر PCR buffer، ۱۰X، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱۵۰ میکرومول MgCl<sub>2</sub>، ۱ واحد آنزیم DNA Polymerase Tag، ۲ میکرومول از زوج پرایمرهای R,F و ۱ میکروگرم از DNA هر نمونه انجام شد. برنامه حرارتی مورد استفاده شامل:

افزایش بازده اقتصادی در صنعت پرورش دام است را مهیا کرد.

برای انجام این تحقیق، ابتدا از ۱۱۵۰۰ راس گاو از طریق پرسشنامه اقدام به اخذ تاریخچه و کسب اطلاع در مورد زمان و تعداد موارد قبلی بیماری های چشم در گاوها شد.

سپس در مورد وقوع فعلی بیماری های چشم در گله از طریق بازدید از محل نگهداری دام، بررسی سن دام، فصل، علائم حیاتی شامل تعداد ضربان قلب، تعداد تنفس و میزان دمای بدن، مشاهده و معاینه از نزدیک چشم دام، بر اساس نشانه های درگیری چشم از جمله تغییر رنگ چشم و ضمایم آن از جمله ملتحمه، انواع ریزش از چشم (سرروزی، موکوسی، موکوسی - چرکی)، وجود درد بر اساس اسپاسم پلک ها، ترس از نور و نهایتاً نشانه های کوری، دامها معاینه شدند.

همچنین در معاینه از چشم دامهای مبتلا، قسمت های مختلف چشم مورد معاینه قرار گرفت از جمله:

پلک ها: از نظر فلجی، برگشتگی به داخل یا خارج، تورم، حضور هر نوع توده غیر طبیعی، اجسام خارجی و مژه های غیر طبیعی و نابجا.

قرنیه: از نظر ادم، عروق دار شدن، کدورت، اجسام خارجی و وجود زخم با استفاده از رنگ فلورسئین.

اتاقک قدامی: چشم از نظر وجود کدورت.

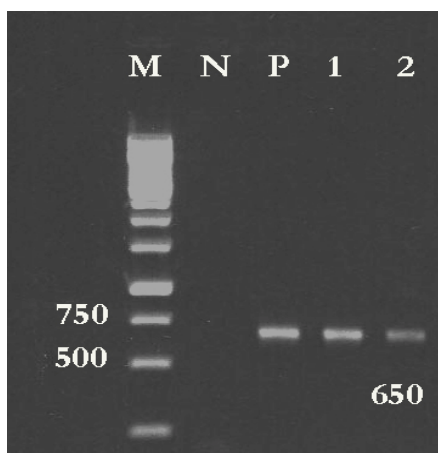
عدسی چشم: از نظر کدورت و جابجایی.

شبکیه: از نظر جداشدگی، خونریزی، ویژه دژنرسانس و آتروفی با استفاده از افتالموسکوپ.

بر اساس این روش معاینه قسمت های مختلف چشم، ۱۰۰ راس از گاوها مبتلا به اختلالات چشم تشخیص داده شدند که در این بین از گاوهایی که مبتلا به کراتو کونژونکتیویت عفونی بودند جهت تشخیص عامل موراکسلابووویس نمونه برداری شد.

از هر چشم مبتلا سوآپی که ابتدا با محلول نرمال سالین استریل مرطوب شده بودند، در شرایط استریل نمونه برداری شد و در

شده، ۲۷ مورد (۳۱/۰۳ درصد) مبتلا به بیماری کراتوکونژنکتیویت عفونی ناشی از باکتری موراکسلابووینس بودند، که در آزمایش PCR واجد قطعه ژنی ۶۵۰ جفت بازی بوده و تصویر حاصل PCR در شکل (۱) نشان داده شده است.



شکل ۱- ژل حاصل از PCR از نمونه های مورد مطالعه (ستون M - مارکر ۱ کیلو بازی DNA، ستون N- نمونه کنترل منفی، ستون P نمونه کنترل مثبت، ستون های ۱ و ۲- نمونه های مورد مطالعه).

یک سیکل ۹۵ درجه ۴ درجه، ۳۳ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۸ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۱ دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۵ دقیقه است.

محصول PCR مربوط به هر سری از آزمایش در ژل یک درصد آگاروز و بعد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت الکتروفورز گردیده و از ژل حاصله با دستگاه UV illuminator تصویر برداری گردید.

لازم به ذکر است باکتری *Moraxella bovis* که از دانشکده دانشگاه تهران گرفته شده به عنوان نمونه کنترل مثبت در آزمایش PCR استفاده شد.

جهت انجام محاسبات آماری داده ها در نرم افزار Excel(2003) جمع آوری و طبقه بندی گردید. سپس فراوانی ها با کمک این نرم افزار محاسبه شده و تفاوت فراوانی ها با استفاده از آزمون مربع کای اصلاح شده با برنامه نویسی در همین نرم افزار مورد مقایسه قرار گرفتند.

## نتایج

در تحقیق انجام شده از ۱۰۰ مورد اختلالات چشم بررسی

جدول ۲- میزان فراوانی میزان جراحات چشم بر حسب باکتری موراکسلابووینس

اسپاسم پلک	پرخونی شبکیه	التهاب عنینیه، جسم مزگانی	کدورت عدسی	زخم قرنیه	کدورت قرنیه	التهاب ملتحمه	ریزش از چشم	جراحی چشم عامل
۲۵	--	۱۳	۵	۱۳	۱۴	۲۷	۲۷	موراکسلابووینس

جدول ۳- میزان فراوانی ابتلا یک طرفی یا دوطرفی چشم بر

حسب باکتری موراکسلابووینس

درگیری دوطرفی	درگیری یک طرفی	نوع جراحی عامل
۴ (۱۴/۸٪)	۲۳ (۸۵/۲٪)	موراکسلابووینس
a	a	

از ۲۷ راس دام مبتلا، چشم ۲۳ راس گاو (۸۵/۲ درصد) به صورت یکطرفه و چشم ۴ راس (۱۴/۸ درصد) به صورت دو طرفی به IBK مبتلا بودند.

چشم تمام ۲۷ راس گاوهای مبتلا به IBK (Infectious bovine keratocconjunctivitis) دچار ریزش از چشم و التهاب ملتحمه بود ولی کدورت قرنیه در ۱۴ مورد، زخم قرنیه در ۱۳ مورد، کدورت عدسی در ۵ مورد و التهاب عنینیه، جسم مزگانی و مشیمیه در ۱۳ مورد و اسپاسم پلک نیز در ۲۵ مورد مشاهده شد. ولی هیچ کدام دچار پرخونی شبکیه نبودند.

در هر ردیف حروف لاتین غیر مشابه نشانه وجود اختلاف آماری معنی دار ( $p < 0.05$ ) و حروف لاتین مشابه نشانه عدم وجود اختلاف آماری معنی دار ( $p < 0.05$ ) است.

### بحث

نتایج بدست آمده از نظر نشانه های بالینی چشم های مبتلا و اپیدمیولوژی بیماری مبتنی بر سن (ابتلای دام های جوان) و فصل وقوع بیماری (بیشتر در فصل تابستان و پاییز) مطابق با گزارشات آنجلوس (۲۰۰۹) و اطیابی و برین (۱۳۷۶) می باشد. در تحقیقی که توسط اطیابی و برین (۱۳۷۶) در پی آزمایشات کشت باکتریایی از چشم گاو، گوساله، گوسفند و بز در طی سالهای ۱۳۷۱، ۱۳۷۲ و ۱۳۷۳ انجام شد، بیشترین باکتری جدا شده از موارد عفونت چشم گاوها موراکسلابوویس بود، به طوری که در طی سه سال، نمونه های جمع آوری شده از چشم گاوها، ۱۳۲ مورد بود که از ۷۲ مورد (۵۴/۴ درصد) آنها موراکسلابوویس جدا شد و این مطلب مطابق با تحقیق انجام شده که از ۱۰۰ مورد اختلال چشم، ۲۷ مورد (۳۱/۰۳ درصد) موراکسلابوویس جدا شده، می باشد.

در تحقیق دیگری که توسط تاگل و زری هان (۲۰۰۰) به منظور مطالعه میزان شیوع IBK در گله های گاو شیری و ارزیابی فاکتورهایی که وقوع بیماری را تحت تاثیر قرار می دهند، انجام شد، مشخص گردید که از ۵۲۲۱ راس گاو شیری مورد مطالعه، ۱۱۰ راس به درجات مختلف IBK مبتلا بودند. در بین ۱۱۰ راس گاو، از ۸۰ راس (۸۸ درصد) عامل موراکسلابوویس جدا شد. ۹۴ مورد (۸۵/۵ درصد) به صورت یک طرفی و ۱۶ مورد (۱۴/۵ درصد) به صورت دو طرفی به بیماری مبتلا بودند.

شیوع بیماری تحت تاثیر سن و نژاد بوده است و گاوهای جوانتر بیشتر دچار عفونت و بیماری شده اند. این مطلب نیز منطبق با نتایج تحقیق انجام شده مبنی بر جداسازی بیشتر عامل موراکسلابوویس از چشم گاوها نسبت به بقیه اجرام و وقوع

جدول ۴- میزان فراوانی باکتری موراکسلابوویس جدا شده از

چشم بر حسب فصل

عامل	فصل	بهار	تابستان	پاییز	زمستان
موراکسلابوویس		۱۲ (۴۴/۵٪)	--	--	۱۵ (۵۵/۵٪)
		a			a

فراوانی بیماری IBK در فصل تابستان ۱۵ مورد (۵۵/۵ درصد) و در فصل پاییز ۱۲ مورد (۴۴/۵ درصد) بود ولی در فصل زمستان و بهار هیچ گاو مبتلا به IBK تشخیص داده نشد.

جدول ۵- میزان فراوانی باکتری موراکسلابوویس جدا شده از

چشم بر حسب سن (ماه)

عامل	سن (ماه)	> ۱۲	۱۲-۲۳	۲۴-۳۶	< ۳۶
موراکسلابوویس		۸ (۲۹/۷٪)	۹ (۳۳/۳٪)	۷ (۲۶٪)	۳ (۱۱٪)
		a	a	a	a

در تحقیق انجام شده، مشخص گردید که دامهای مبتلا به IBK نسبتاً جوان هستند و ۸ راس (۲۹/۷ درصد) از دامها سن کمتر از ۱۲ ماه، ۹ راس (۳۳/۳ درصد) سن ۱۲-۲۳ ماه و ۷ راس (۲۶ درصد) سن ۲۴-۳۶ ماه و ۳ راس (۱۱ درصد) سن بیشتر از ۳۶ ماه داشتند.

جدول ۶- میزان فراوانی باکتری موراکسلابوویس جدا شده از

چشم بر حسب نوع ترشحات

عامل	نوع ترشح	سروزی	موکوسی	موکوسی - چرکی
موراکسلابوویس		۱۵ (۵۵/۵٪)	۷ (۲۶٪)	۵ (۱۸/۵٪)
		ab	bc	cc

نوع ترشحات چشمی دامهای مبتلا سروزی با ۱۵ مورد (۵۵/۵ درصد) بود و فقط ۷ راس (۲۶ درصد) از دامها دچار ریزش ترشحات موکوسی و ۵ راس نیز دچار ریزش ترشحات موکوسی - چرکی از چشم بودند.

همچنین در همین تحقیق انجام شده توسط فریس و پدرسون در اولین شیوع بیماری، از سه راس گاو مورد بررسی قرار گرفته، موراکسلابووویس و مایکوپلازما بووکولی، و از یک راس گاو نیسریا اویس جدا گردید.

در دومین شیوع بیماری، از سه راس گاو مورد بررسی، موراکسلابووویس از هر سه راس گاو، نیسریا اویس از یک راس گاو جدا شد ولی از هیچ گاوی مایکوپلازما جدا نگردید.

در سومین شیوع بیماری از چهار راس گاو مورد بررسی، موراکسلابووویس از ۴ راس گاو، نیسریا اویس از یک راس گاو و مایکوپلازما بووکولی از دو راس گاو جدا شد.

در چهارمین شیوع بیماری از چهار راس گاو مورد بررسی، موراکسلابووویس از دو راس گاو، نیسریا اویس از سه راس و مایکوپلازما بووکولی نیز از سه راس گاو جدا شد.

در پنجمین شیوع بیماری، از دو راس گاو مورد بررسی، موراکسلابووویس از دو راس گاو، نیسریا اویس از یک راس و مایکوپلازما بووکولی نیز از دو راس گاو جدا شد. همچنین مایکوپلازما یوره آ پلازما از یک راس گاو نیز جدا گردید.

در واقع گاهی آلودگی با یک یا بیش از دو باکتری ایجاد شده بود و با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می رسد که مایکوپلازما بووکولی اثر پاتوژنیسیته موراکسلابووویس را در بیماری کراتوکونژونکتیویت عفونی گاوها افزایش می دهد.

### فهرست منابع

۱. اطیایی، ن.، برین ع. (۱۳۷۶): عوامل باکتریایی مولد کونژونکتیویت و کراتوکونژونکتیویت در نشخوار کنندگان و بررسی پاتوژنیسیته و ایمنی زایی گونه های مختلف موراکسلا. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۱، (۳ و ۴)، ۱۲۵-۱۱۳.

2. Angelos, J. (2009): Disease of the eye In : large animal Internal medicine, 4<sup>th</sup> ed. edited by B.P. smith. Mosby, Inc. 1286-88.

بیشتر بیماری، در گاوهای جوان و همچنین وقوع بیشتر بیماری، به صورت یکطرفی می باشد.

در تحقیقی که توسط پاگ و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد، با توجه به اینکه چشم های ۵ راس گوساله از ۸ راس که در معرض مایکوپلازما کونژونکتیوا قرار گرفته بودند ولی در معرض موراکسلابووویس قرار نگرفته بودند، علائم بالینی IBK را نشان ندادند ولی چشم های ۴ راس گوساله که در معرض مایکوپلازما کونژونکتیوا قرار نگرفته بودند ولی در معرض موراکسلابووویس قرار گرفته بودند. علائم IBK را نشان دادند، مشخص شد که موراکسلابووویس نقش اصلی در ایجاد بیماری IBK را ایفا می کند.

در طی تحقیقی که توسط فریس و پدرسون (۱۹۷۹) در مدت چهارسال (۱۹۷۷-۱۹۷۳) بر روی پنج دوره شیوع بیماری کراتوکونژونکتیویت عفونی در چند گله گاو انجام شد، از چشم گاوهای مبتلای تعدادی گاو متعلق به هر گله جهت تشخیص عوامل باکتریایی و مایکوپلازمایی نمونه برداری به عمل آمد.

شیوع اول بیماری در بین ۳۰ راس گاو از دامهایی که بر روی مرتع چرا داشته و ۲۲ راس آنها به تازگی خریداری شده بودند اتفاق افتاد.

شیوع دوم در بین ۶۵۰ راس از گاوهای نوجوان بر روی مرتع، شیوع سوم در گاوهای پرواری یک گاوداری بزرگ، شیوع چهارم و ۵۰ راس از گاوهای بالغ و نابالغ بر روی مرتع و نهایتاً شیوع پنجم در ۵۰ راس از گوساله هایی که در سن ۱۰ روزگی خریداری و در محیط بسته نگهداری می شدند، رخ داد.

از همه موارد شیوع بیماری عامل موراکسلابووویس از همه موارد شیوع بیماری در دام ها، عامل موراکسلابووویس و نیسریا اویس (*Neisseria Ovis*) جدا شد. این نتیجه مطابق با نتایج تحقیق حاضر می باشد.

از چهار مورد شیوع بیماری در گاوها، مایکوپلازما بووکولی (*Mycoplasma bovoculi*) جدا گردید.

3. Friis, N. F., Pedersen, K.B. (1979): Isolation of mycoplasma bovoculi from cases of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Acta Vet Scand.* 20(1): 51-9.
4. Pugh, G. W., Hughes, D.E., Schulz, V.D. (1996): Infectious bovine keratoconjunctivitis: experimental induction of infection in calves with mycoplasmas and *Moraxella bovis*. *Am J Vet Res.* 37(5): 493-5.
5. Takele, G., Zerihun, A. (2000): Epidemiology of infectious keratoconjunctivitis in cattle in south-east Ethiopia. *J Vet Med A Physiopathol Clin Med.* 47(3): 169-73.