التحـري عن مرض البروسيلوسز في الأغنـام
باستخدام تقنية الـPCR والفحوصات المصلية الأخرى

رسالة تقدمت بها

هديل عاصم محمد مصطفى

إلى

مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

في اختصاص الطب البيطري/الطب الباطني والوقائي البيطري

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

عامـر نعمـت سلـيم

الخلاصة

تم جمع ثلاثة آلاف عينة دم من 22 قطيعاً من الأغنام وبصورة عشوائية حيث تم فحص 485 عينة دم منها بفحص وردية البنكال Rose bengal plate test (RbpT) (النعاج 425، الكباش 60) لغرض التحري عن مرض البروسيلوسز في القطعان التي أظهرت حيواناتها علامات الإجهاض وفي مناطق مختلفة من محافظة نينوى اعتماداً على الفحوصات المصلية فضلاً عن إجراء العزل الجرثومي للأجنة المجهضة والمسحات المهبلية لغرض بيان أنواعها وأنماطها، كما تم تأكيد التشخيص للعينات الموجبة والسالبة لاختباري وردية البنكال Rose bengal plate test (RbpT) والتلازن الأنبوبي للمصل Tube agglutination test (TAT) ونتائج العزل الجرثومي باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR).

أظهرت نتائج الدراسة تبايناً في نسب الإجهاض في القطعان الخاضعة للدراسة اعتماداً على تاريخ الحالة المرضية التي بلغت من 1.6% لغاية 21.1% بمعدل 11.9%، في حين بلغت نسب الإجهاض في القطعان اعتماداً على فحص وردية البنكال من 5.4%. كما لوحظ ارتفاع ملحوظ في نسبة إصابة الذكور (الكباش) بالبروسيلوسز التي وصلت إلى 50%. لوحظ من خلال الدراسة أن أغلب حالات الإجهاض بسبب الإصابة بالبروسيلوسز تحددت في الأعمار بين 2 إلى 3 سنوات إذ بلغت 49.8% في الإناث في حين ارتفعت نسبة الإصابة في الذكور لتصل إلى 62.2% في عمر 2–3 سنوات. كما تبين من الدراسة أن نسبة التوافق بين اختباري وردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل بلغت 90.7%. وأظهرت نتائج العزل الجرثومي عزل 6 عزلات تابعة لجنس *Br. melitensis* وعزلة واحدة من جراثيم *Br. abortus* عزلت أغلبها من محتويات المعدة والكبد.

تم استخدام ثلاثة أزواج من البادئات Primers للتعرف على جراثيم البروسيلا عن طريق مضاعفة أجزاء من الحامض النووي DNA الموجود في المصل باستخدام جهاز المبلمر الحراري وهي Brucella OMP2 (193 زوجاً قاعدياً) و Brucella B4/B5 (223 زوجاً قاعدياً) للتعرف على جنس البروسيلا ، في حين استخدم البادئ الخاص بعترة *Br. melitensis* (731 زوجاً قاعدياً) للتعرف على عترة *Br. melitensis* فقط. وتم تطبيق البادئات الثلاثة على قسم من العينات المنتخبة الموجبة والسالبة لاختباري وردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل فضلاً عن إجرائه على عينات العزل الجرثومي .

أظهرت نتائج استخدام تقنية الـPCR توافقاً 100% للعينات الموجبة لاختباري وردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل باستخدام البادئ Brucella B4/B5 في حين أعطت العينات السالبة لاختباري وردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل نتائج موجبة لوجود البروسيلا بنسبة 94.4% باستخدام البادئ Brucella OMP2 . أما فيما يخص العزل الجرثومي فقد أعطت جميعها نتائج موجبة باستخدام البادئ الخاص بعترة *Br. melitensis* والذي أثبت بأن أغلب حالات الإجهاض تعود إلى الإصابة بالـ*Br. melitensis* .

Detection Of Brucellosis In Sheep Using PCR With Other Serological Tests

A Thesis Submitted

by

Hadeel Asim Mohammad Mustafa

To

The Council of the College of Veterinary Medicine

University of Mosul

In the Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master

In Veterinary Internal and Preventive Medicine

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Amir Nimat Saleem

2006 A.D. **1427 A.H.**

Summary

The aim of the present study was to identify the presence of brucellosis among sheep flocks suffering from abortion and distributed through different localities at Nineveh Province through serological examination of aborted ewes, furthermore, bacterial isolation was performed on aborted fetuses and vaginal swabs in order to determine species and strains of brucella. A comparative study have been done to samples which were give positive and negative results to Rose-Bengal plate test (RBPT) and Tube agglutination test (TAT) and bacterial isolation on compared with polymerase chain reaction (PCR) technology.

Results of the study indicated that there was a difference in an incidence rate of abortion depending on case history ranged from 1.6% to 21.1% with an average rate of 11.9%, however, abortion rate depending on RBPT was from zero up to 12%, incidence rate of brucella was 5.4%, an elevation in brucella incidence rate noticed in rams, it was 50%. The study also revealed that the appropriate age of abortion due to brucellosis was between 2-3 years, it was 49.8% in ewes and 62.2% in rams specially at age of 3 years. The study showed that the agreement rate between RBPT and TAT was 90.7%. Bacterial isolation identify six isolate of *Br. melitensis* and one isolate of *Br. abortus*, all isolate were from stomach content and liver.

PCR was performed using three pairs of specific primers for amplification of genus brucella DNA from serum and bacterial growth using thermocycler. These primers including Brucella OMP2 (193 base pair "bp"), Brucella B4/B5 (223 bp) for identification of brucella genus, and species specific primer for *Br. melitensis* (731 bp) for identification of *Br. melitensis*. Selected positive and negative serum samples to both RBPT and TAT were applied using the mentioned three primers. Furthermore, bacterial isolates were also identified using the three

primers. PCR results was given an agreement 100% with positive samples to RBPT and TAT using primers B4/B5, however, samples which were negative for both RBPT and TAT were given an agreement 94.4% and 100% using Brucella OMP2 and Brucella B4/B5 respectively. Moreover, our results were revealed that the main cause of abortion in ewes was *Br. melitensis* based on the uses of species specific primers of *Br. melitensis.*