

جستجوی ژنومی بروسلا در گاوهای سرم مثبت استان چهارمحال و بختیاری

محمد رضا محزونیه^۱ حمیدرضا مهری^۲ حسن صیدی سامانی^{۳*} امیر مؤمنی^۳ علی شکوهی^۲ خدیجه خاکسار^۲ محمد اسدی^۲ مرضیه صفر پور^۴
فاطمه یکتنه^۴ پیام نیک پور^۲

(۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران
(۲) اداره کل دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری، شهرکرد-ایران
(۳) دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران
(۴) پژوهشکده بیماریهای مشترک انسان و دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران

(دریافت مقاله: ۲۰ مرداد ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۹ آبان ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: بروسلوز یکی از مهمترین بیماریهای مشترک انسان و دام در خاورمیانه و ایران می باشد. هدف: انجام این مطالعه جستجوی ژنومی بروسلا در گاوان سروپوزیتو بود. روش کار: برای انجام این تحقیق در طی سال های ۱۳۹۱-۱۳۹۲، از ۲۸۵۱۹ رأس گاو خونگیری انجام شد. سپس نمونه ها توسط تست های رز بنگال، رایت و ۲-مرکاپتو اتانول از نظر حضور آنتی بادی ضد بروسلا، غربالگری شدند. نمونه های با تیتراژ آنتی بادی برابر یا بیشتر از ۸۰ و ۴۰ به ترتیب در تست های رایت و ۲-مرکاپتو اتانول به عنوان نمونه مثبت تلقی و کشتار شدند. بافت های عقده های لنفی، کبد و کلیه از ۱۲۲ مورد از گاوهای کشتار شده جمع آوری شد. بیضه حیوانات نیز نیز گرفته شد. نمونه های سروپوزیتو با مجموعه ای از پرایمرهای اختصاصی برای بروسلا آبور توس، بروسلا ملی تنسیس و سویه های واکسن Rev1 و RB51 توسط آزمون PCR تست شدند. نتایج: نتایج تست های سرولوژی نشان داد که ۴۵۰ نمونه در تست رز بنگال مثبت هستند و ۴۴۷ نمونه در تست رایت دارای تیتراژ آنتی بادی ≥ 180 هستند و ۳۸۹ نمونه، در تست ۲ME مثبت می باشند. نتایج PCR نشان داد که ۴۶ مورد (۳۷/۷٪) از ۱۲۲ نمونه از نظر حضور توآلی نوکلئوتیدی خاص بروسلا مثبت اند یا به عبارتی عفونت فعال داشته و به باکتری جنس بروسلا آلوده بودند، در حالی که ۶۲/۳٪ از نمونه ها منفی بودند. از بین موارد مثبت، ۲ مورد (۴/۳۵٪) به بروسلا ملی تنسیس، ۲ مورد (۴/۳۵٪) به سویه واکسن Rev1 و ۴۲ مورد (۹/۱۳٪) به بروسلا آبور توس آلوده بودند. نتیجه گیری نهایی: همان طور که انتظار می رود اکثر گاوها با گونه آبور توس آلوده هستند. موارد آلوده با سویه های واکسن Rev1 و *B.melitensis* احتمالاً به دلیل پرورش گوسفند و بز در محیط نگهداری گاوها می باشد. اما ۶۲/۳٪ از دام های سروپوزیتو در آزمون PCR به بروسلا آلوده نبودند که می تواند به دلیل بروز واکنش متقاطع در تست های سرولوژی و یا برانگیخته شدن سیستم ایمنی و حذف باکتری از اندام های داخلی باشد.

واژه های کلیدی: گاو، بروسلا، PCR، سرولوژی

مقدمه

با توجه به این که باکتری برای مدت زمان کوتاهی در خون حضور دارد و پس از باکتری می کوتاه در بافت ها لوکالیزه می شود، در این مطالعه جهت جستجوی باکتری در دام های سرم مثبت از بافت هایی نظیر غدد لمفاوی، کبد و کلیه استفاده شد (۱۲،۲۰).

روش هایی از جمله سرولوژی، کشت و جداسازی و تعیین خواص بیوشیمیایی و مولکولی باکتری جهت تشخیص بیماری در دام مورد استفاده قرار می گیرد. رایج ترین روش جهت تعیین آلودگی در دامها، آزمون های سرولوژی است که با محدودیت هایی در تعیین سویه های مختلف عامل بیماری همراه است (۱). همچنین آزمون های سرولوژیک به دلیل حضور موارد منفی کاذب حاصل از آنتی بادی های بلوکان و وجود موارد مثبت کاذب به دلیل تشابه آنتی ژنی با سایر باکتری های گرم منفی (از جمله یرسینیا ائتره کولیتیکا، اشریشیا کلی O:۱۵۷، سالمونلا اوربانا و ویبریو کلرا) از حساسیت و اختصاصیت کافی برخوردار نمی باشند و به تنهایی قادر به تشخیص مرحله حاد و مزمن بیماری نیستند (۱۵،۱۸).

قبل از انجام این مطالعه، نمونه های ارسالی از کشتارگاه توسط کارشناسان اداره دامپزشکی استان، در شرایط مناسب از نظر آنکو باسیون، به

بروسلوز (تب مالت) یکی از شایع ترین بیماریهای مشترک بین انسان و حیوانات است که به عنوان یکی از مهمترین چالش ها برای سلامتی انسان و حیوان مورد بررسی قرار می گیرد (۹،۲۱). عامل بیماری باکتری گرم منفی، کوکوباسیل، هوازی، بدون تحرک و غیر اسپورزا می باشد که قادر است به صورت اختیاری و درون سلولی زندگی کند (۲۴). این باکتری بر اساس پاتوژنیسیته و میزان ترجیحی دارای ۱۰ گونه شناخته شده، *B.abortus*، *B.melitensis*، *B.ovis*، *B.canis*، *B.suis*، *B.neotomae*، *B.pinnipedialis*، *B.ceti*، *B.microti*، *B.inopinata* می باشد (۴،۱۶). بروسلا به سیستم لمفاوی در بدن میزبان نفوذ کرده و در مقابل نوتروفیل ها مقاومت می کند و با تکثیر در داخل ماکروفاژها باعث گسترش در ارگان ها شده و با لوکالیزه شدن در اندام هایی نظیر طحال، مغز، قلب و استخوان، باعث مننژیت، اندوکاردیت، ورم مفاصل و استئومیلیت می شود. عامل بیماری در حیوانات اهلی از جمله گاو، گوسفند، شتر و خوک باعث تورم بیضه و سقط جنین می شود (۹).



مولکولی به آزمایشگاه ارسال گردید.

آزمایش رزبنگال: آنتی ژن رزبنگال، تولید مؤسسه تحقیقات، سرم و واکسن سازی رازی، ایران، طبق پروتکل مراحل آزمایش انجام شد. **آزمایش رایت و آزمایش ۲ME:** این دو آزمون طبق پروتکل کیت آزمون رایت انجام شد (شرکت بهینه پرور پارسیان).

تفسیر نتایج رایت و ۲ME در جدول ۱ خلاصه شده است (۲۵).

استخراج DNA از بافت: جهت استخراج DNA از بافت‌هایی که احتمال حضور باکتری وجود دارد نظیر عقده‌های لمفی فوق پستانی، مزانتریک، کلیه، بیضه و کبد استفاده شد (۱۲). استخراج طبق پروتکل کیت استخراج شرکت سیناژن (Kit for the isolation of DNA from Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF) (Cat. No.: PR881613) انجام شد.

آزمون PCR: برای انجام آزمون PCR، از چهار نوع پرایمر (محصول TAG, Copenhagen) استفاده شد. مشخصات پرایمرها در جدول ۲ خلاصه شده است (۱۴).

پرایمر شماره ۱ در تمام گونه‌های بروسلا به جز *B.pinnipedialis* و *B.ceti* باند تشکیل می‌دهد. این دو گونه از پستانداران دریایی جدا شده‌اند. پرایمر شماره ۲ در تمامی گونه‌ها به جز در *B.ovis* و سویه RB51 باند تشکیل می‌دهد.

پرایمر شماره ۳ فقط در صورت آلودگی با سویه Rev1 باند تشکیل می‌دهد.

پرایمر شماره ۴ در تمامی گونه‌ها به جز *B.abortus*، سویه S19 و RB51 باند تشکیل می‌دهد.

بنابراین طبق مشخصات این پرایمرها، ابتدا تمامی نمونه‌ها توسط پرایمر شماره ۱ از نظر حضور توالی نوکلئوتیدی بروسلا مورد بررسی قرار گرفتند. پس از این آزمون، نمونه‌های مثبت از نمونه‌های منفی جدا شدند. سپس نمونه‌های مثبت توسط پرایمر شماره ۳ بررسی شدند. با توجه

به این که این پرایمر فقط در حضور سویه Rev1 در محدوده ۲۱۸bp باند تشکیل می‌دهد، بنابراین مواردی که توسط این پرایمر مثبت اعلام می‌شود، در نتیجه آلودگی با سویه Rev1 می‌باشد. در مرحله بعد نمونه‌های مثبت باقی مانده توسط پرایمرهای شماره ۲ و ۴ به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این دو آزمون به صورت زیر تفسیر می‌شدند: اگر نمونه‌ای در آزمون توسط پرایمر شماره ۲ و ۴ مثبت شود، یعنی هم در محدوده ۱۶۸۲bp (و هم در محدوده ۱۰۷۱bp تشکیل باند دهد، به عنوان آلودگی با *B.melitensis* در نظر گرفته می‌شود. اما اگر نمونه‌ای توسط پرایمر شماره ۲ مثبت شود (باند در محدوده ۱۰۷۱bp) ولی توسط پرایمر شماره ۴ منفی باشد، آلودگی با *B.abortus* در نظر گرفته می‌شود. آزمون PCR در حجم ۲۵µL انجام شد. مواد و مقدار لازم جهت انجام آزمون عبارت بودند از:

وسیله روش استاندارد طلایی کشت مورد بررسی قرار گرفتند. اما از آنجایی که تعداد زیادی از موارد کشت منفی گزارش شد این احتمال داده شد که ممکن است آزمون‌های سرمی تحت تأثیر دیگر عواملی که احتمال دارد در واکنش اختلال ایجاد کند، قرار گرفته باشند یا اینکه باکتری به هر دلیلی از بدن پاک شده باشد. از جمله این اختلالات می‌توان به حذف شدن باکتری از بدن به علت برانگیخته شدن سیستم ایمنی میزبان، استفاده از داروها و یا واکنش‌های متقاطع اشاره کرد که در آزمون‌های سرولوژی اختلال ایجاد می‌کنند.

یکی از روش‌های نوین جهت تشخیص موارد آلوده روش ملکولی PCR می‌باشد که نتایج آن تحت تأثیر تیتراژهای آنتی بادی قرار نمی‌گیرد. با توجه به حساسیت و ویژگی بالا، صرفه جویی در زمان و امکان تعیین موارد آلوده در حد گونه و سویه امروزه کاربرد فراوانی یافته است و به همین دلیل در این مطالعه از این روش استفاده شد (۲، ۳، ۴، ۵، ۱۸).

در ایران روش کار معمول و مورد تأیید سازمان دامپزشکی، روش‌های سرولوژی رایت و ۲ME می‌باشد (۲۵). با این حال عدم جداسازی باکتری از تعدادی از موارد سرم مثبت این گمان را ایجاد می‌کند که در حال حاضر ممکن است حساسیت و ویژگی این روش برای شناسایی گاوهای واقعاً آلوده در حد مطلوب نباشد. برای اثبات آلودگی این گاوها به روش‌های تکمیلی نظیر الایزا، آزمایش ثبوت عناصر مکمل، آزمایش پادتن‌های درخشان غیر مستقیم و PCR نیاز است. به‌رغم روش‌های متعددی که برای کنترل و ریشه کنی این بیماری در کشورهای در حال توسعه انجام می‌شود هنوز بیماری از شیوع بالایی برخوردار است و هزینه‌های سنگینی را به بخش بهداشت و دامپروری تحمیل می‌کند (۱۴).

هدف از این مطالعه بررسی ژنومی گاوهای سروپوزیتیوی بود که به عنوان راکتور بروسلا حذف شده‌اند.

مواد و روش کار

در این مطالعه از تعداد ۲۸۵۱۹ رأس دام، که از تاریخ ۱۳۹۰/۱۰/۱ الی ۱۳۹۲/۴/۳۱ در برنامه ملی کنترل بیماری به طور معمول توسط ادارات دامپزشکی استان، مورد پایش قرار داشتند، خونگیری انجام شد. نمونهی سرم از خون آنها تهیه و با آزمون‌های سرولوژی رزبنگال مورد آزمایش غربالگری قرار گرفتند. نمونه‌های مثبت در مرحله اول، با روش‌های سرولوژی رایت و ۲ME بر اساس دستورالعمل کشوری (۲۵) مورد آزمایش قرار گرفت و کلیه گاوهای مثبت (۳۸۹ رأس) به عنوان گاو راکتور کشتار شدند. پس از کشتار دام‌های راکتور، به صورت تصادفی از ۱۲۲ مورد از آنها نمونه بافتی اخذ شد. دامنه سنی این دام‌ها ۸۴-۱۲ ماهه بود. طبق پروتکل سازمان دامپزشکی کشور، تمامی گوساله‌ها در سنین بین ۱۲-۴ ماهگی با واکسن دز کامل RB51 مایه کوبی می‌شوند. نمونه‌های بافتی به صورت کاملاً استریل اخذ شده و در ظروف مناسب نگهداری شد و جهت ارزیابی



جدول ۱. تفسیر نتایج سرولوژی.

رزینگال	رایت	۲ مرکاپتواتانول	تفسیر نتایج
مثبت	۷۱۶۰ و بالاتر	هر تیتری	مثبت (راکتور)
مثبت	۴/۸۰ تا ۷/۸۰	۴/۴۰ و بالاتر	
مثبت	۷۸۰	۳/۴۰ و پایین تر	مشکوک
مثبت	۴/۴۰ تا ۲/۲۰	۴/۴۰ و پایین تر	
مثبت	۷۲۰ و پایین تر	۷/۲۰ و پایین تر	منفی

که طی مطالعه Mostafavi و همکاران در سال ۲۰۱۲ روند بیماری در کشور از سال ۱۳۷۰ تا ۱۳۸۷ در گاو رو به کاهش بوده است (۱۷). طبق دستورالعمل سازمان دامپزشکی کشور، شناسایی موارد آلوده توسط آزمون‌های سرولوژی رزینگال، رایت و ۲ME انجام می‌شود (۱۸، ۱۵). لیکن این آزمایش‌ها به دلیل حساسیت و ویژگی پایین، قادر به تشخیص صحیح موارد آلوده نمی‌باشند و گاه با نتایج منفی و مثبت کاذب همراهند. نتایج منفی کاذب به معنی عدم تشخیص گاو آلوده و باقی ماندن منبع عفونت در بین دام‌های گله است که خود تا زمان آزمایش بعدی که حداقل ۶ ماه طول می‌کشد موجب انتشار باکتری در بین دام‌ها و خطر آلودگی انسان از طریق مستقیم یا غیر مستقیم را به دنبال خواهد داشت و مثبت کاذب یعنی حذف دامی که علی‌رغم تولید در گله و عدم خطر انتشار عفونت با پرداخت غرامت توسط دولت و وارد کردن خسارت به دامدار به کشتارگاه اعزام می‌شود. باید اذعان نمود که آزمون‌های سرولوژی ویژگی کافی جهت تعیین موارد منفی کاذب را ندارند و با عنایت به ارزش گاو شیری در حال حاضر ضروری است روش‌های تشخیصی را مورد ارزیابی قرار داده و تلاش شود تا از روش‌های جایگزین با حساسیت و ویژگی بالاتر یا از آزمون‌های تکمیلی برای شناسایی موارد سروراکتیو استفاده نمود، زیرا در مجموع خسارت زیادی را به اقتصاد ملی وارد می‌نماید، مضافاً بر این که دامداری که به عنوان مثبت گزارش می‌شود دچار بحران‌های جدی می‌شود. روش‌های سرولوژی جدید از جمله الایزا، کشت میکروبی و تکنیک‌های تشخیص مولکولی در زمره روش‌های تکمیلی به حساب می‌آیند که محققین مختلف آنرا مورد ارزیابی قرار داده‌اند. نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز تنها توانست حدود ۲۸٪ از موارد سروپوزیتو رادر آزمون PCR با ۴ زوج پرایمر تأیید نماید یعنی اگر این عدد را تنها در استان چهارمحال و بختیاری روی همه گاوهای سروپوزیتو (۳۸۹ رأس) تعمیم دهیم، خسارتی بالغ بر ۲۰ میلیارد ریال را در سال مورد مطالعه ایجاد کرده است. البته باید بر این خسارت، هزینه‌های مبارزه را نیز افزود.

تشخیص دام مبتلا از طریق کشت میکروبی محدود به موارد خاص بوده و نمونه برداری جهت کشت میکروبی در حجم وسیع امکان پذیر نیست (۱۸، ۲۳). لذا بیشتر باید به فکر روش‌های سرولوژی بهتر یا تکنیک‌های تشخیص مولکولی بود. در مطالعه‌ای که Ghosian Moghadam و همکاران در سال ۲۰۰۷ به منظور مقایسه بین نتایج کشت و PCR نسبت به آزمایش رایت در گاو، انجام دادند نتیجه گرفتند که روش کشت ۳۱/۶٪

مستر میکس رد (Cat.No.: 180301 Amplicon, Denmark) $1\mu\text{L}$ ، پرایمرهای R و F هر کدام به مقدار $1\mu\text{L}$ از غلظت 10pmol ، آب $8\mu\text{L}$ و DNA استخراج شده $2\mu\text{L}$.

برنامه دمایی دستگاه ترموسیکلر (Applied Biosystem, USA) بدین شرح بود:

دنا تورا سیون اولیه 95°C به مدت ۵ دقیقه و 40 سیکل شامل دنا تورا سیون در دمای 95°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای 55°C به مدت یک دقیقه، مرحله‌ی پلی‌مریزاسیون در دمای 72°C به مدت یک دقیقه و در انتهای سیکل، واکنش در دمای 72°C به مدت ۷ دقیقه پایان یافت.

ارزیابی محصول PCR: محصول PCR به مقدار $5\mu\text{L}$ بر روی ژل آگارز ۱٪ به درون چاهک‌ها انتقال یافت. سپس الکتروفورز در بافر TAE با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۵۰ دقیقه انجام شد. سپس نتایج بر روی دستگاه ایلومینیتور (UVitec, UK) مشاهده و ثبت شدند.

نتایج

نتایج حاصل از آزمون‌های سرولوژی نشان داد که ۱/۵۸٪ از نمونه‌ها در آزمون رزینگال، ۱/۵۷٪ از نمونه‌ها در آزمون رایت و ۱/۳۶٪ از نمونه‌ها در آزمون ۲ME مثبت هستند. نتایج آزمون‌های سرولوژی در جدول ۳ خلاصه شده است. همچنین نتایج حاکی از آن هستند که مناطقی وجود دارند که از نظر بروسلا شیعوب بالایی دارند (منطقه شماره ۱). نتایج حاصل از جستجوی ژنومی بروسلا به تفکیک فصل و منطقه در جدول ۴ نشان داده می‌شود. نتایج حاصل از آزمون PCR که روی ۱۲۲ مورد از دام‌های راکتور انجام شد، نشان داد که ۴۶ مورد (۳۷/۷٪) از دام‌ها، از نظر حضور باکتری مثبت هستند. در حالی که ژنوم باکتری در تعداد ۷۶ مورد (۶۲/۳٪) از دام‌هایی که توسط آزمون‌های سرولوژی به عنوان راکتور شناخته شده بودند، یافت نشد. در بین موارد مثبت، تعداد ۴۲ مورد از دام‌ها به بروسلا آبور توس (۹۱/۳٪)، ۲ مورد به بروسلا ملی تنسیس (۴/۳۵٪) و ۲ مورد (۴/۳۵٪) به سویه واکسن Rev۱ آلوده بودند.

بحث

بروسلا یکی از مهمترین بیماری مشترک انسان و دام از نظر فراوانی موارد بروز بیماری و علائم بالینی، در انسان و خسارات اقتصادی از جمله سقط جنین، کاهش باروری و مخاطرات بهداشتی در بین دام‌های ایران است. بیش از نیم قرن برنامه مبارزه و کنترل نتوانسته آنرا ریشه کن نماید و هنوز کماکان مواردی از بروز آن در انسان به چشم می‌خورد. برنامه‌ی واکسیناسیون دام‌های حساس در سنین بین ۴ تا ۱۲ ماهگی برای ارتقاء سطح ایمنی و آزمون دام‌های بالغ پس از اولین زایمان و کشتار موارد آلوده در بین گاوها نتوانسته تا حدی از میزان شیوع آن بکاهد، به شکلی



جدول ۲. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده.

Number	Gene	Primer sequences 5'→3'	Amplicon size (bp)	Source of genetic differences
1	BMEI0535f BMEI0536r	F:GCGATTCTTCGGTTATGAA R:CGCAGGCGAAAACAGCTATAA	450	IS711 insertion in BMEI0535–BMEI0536 in <i>Brucella strains</i> isolated from marine mammals
2	BMEI0998f BMEI0997r	F:ATCCTATTGCCCGGATAAGG R:GCTTCGCATTTTCACTGTAGC	1682	IS711 insertion in BMEI0998 in <i>B. abortus</i> RB51 and deletion of 15,079 bp in BMEI0993–BMEI1012 in <i>B. ovis</i>
3	BMEI0752f BMEI0752r	F:CAGGCAAACCCCTCAGAAAGC R:CATGTGTAACGCACACCAA	218	Point mutation in BMEI0752 in <i>B. melitensis</i> Rev.1
4	BMEI10843f BMEI10844r	F:TTTACACAGGCAATCCAGCA R:GCGTCCAGTTGTTGTGATG	1071	Deletion of 25,061 bp in BMEI10826–BMEI10850 in <i>B. abortus</i>

جدول ۳. نتایج تست‌های سرولوژی.

عنوان	زمستان ۹۰	بهار ۹۱	تابستان ۹۱	پاییز ۹۱	زمستان ۹۱	بهار ۹۲	کل
تعداد نمونه خون	۶۵۲۰	۶۶۰۳	۴۸۸۸	۳۸۰۵	۱۹۳۵	۴۲۶۸	۲۸۵۱۹
رزینگال+	۱۷۵	۴۵	۹۹	۶۸	۴۶	۱۷	۴۵۰
	(٪۲/۶۸)	(٪۰/۶۸)	(٪۲/۰۲)	(٪۰/۷۹)	(٪۲/۳۸)	(٪۰/۳۶)	(٪۰/۵۸)
رایت+	۱۷۵	۴۵	۹۸	۶۷	۴۵	۱۷	۴۴۷
	(٪۲/۶۸)	(٪۰/۶۸)	(٪۲)	(٪۰/۷۶)	(٪۲/۳۲)	(٪۰/۳۶)	(٪۰/۵۷)
+۲ME	۱۲۳	۴۳	۹۷	۶۷	۴۴	۱۵	۳۸۹
	(٪۰/۸۷)	(٪۰/۶۵)	(٪۰/۹۸)	(٪۰/۷۶)	(٪۰/۲۷)	(٪۰/۳۱)	(٪۰/۳۶)

جدول ۴. نتایج آلودگی بر حسب منطقه و فصل توسط آزمون.

فصل شماره منطقه	زمستان ۹۰	بهار ۹۱	تابستان ۹۱	پاییز ۹۱	زمستان ۹۱	۴ ماه اول ۹۲	کل
۱	۱۶	۱۱	۲	۱	۳	-	۳۳
							٪۰/۷۷۴
۲	-	-	۳	۱	۱	۱	۶
							٪۰/۱۳/۰۴
۳	۳	-	-	-	-	-	۴
							٪۰/۸/۷
۴	۲	-	-	-	-	-	۲
							٪۰/۴/۳۵
۵	۱	-	-	-	-	-	۱
							٪۰/۲/۱۷
کل	۲۲	۱۲	۵	۲	۴	۱	۴۶
	٪۰/۴۷/۸۳	٪۰/۲۶/۰۹	٪۰/۱۰/۸۷	٪۰/۴/۳۵	٪۰/۸/۷	٪۰/۲/۱۷	

مقاریر برای آزمایش PCR، ۵۸٪ حساسیت و ۶۵٪ همخوانی بود و از اینرو پیشنهاد نمودند که روش PCR می‌تواند به عنوان یک روش سریع و مناسب در تشخیص بروسلا مورد استفاده قرار گیرد (۸). در گوسفند نیز نتایج تقریباً مشابه است. در مطالعه Ilhan و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه روی بافت‌های ۱۶۲ رأس گوسفند، شامل ۴۵ مورد سرپوزیتو و ۱۱۷ مورد سرورنگاتیو با روش کشت و PCR، باکتری بروسلا ملی تنسیس، از ۱/۲٪ موارد خون و ۱۷/۲٪ موارد عقده‌های لمفی جدا شد. در حالی که ۲۷/۷٪ از نمونه‌های خون و ۲۹٪ از اندام‌های لمفاوی آنها در آزمون PCR نتیجه مثبت نشان دادند (۱۱) که با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر در گاو تقریباً همخوانی دارد. در شتر نیز گزارش شده است که موفقیت PCR در شناسایی

مقاریر مثبت بیشتر از آزمایش سرولوژی بوده است. در مطالعه Ghorbani و همکاران در سال ۲۰۱۲ نتایج بررسی سرولوژی، کشت و nested-PCR روی ۳۱۰ نمونه سرم شتر نشان داد که حساسیت PCR در شناسایی موارد از روش سرولوژی و کشت بیشتر است. هیچ یک از نمونه‌های عقده لمفاوی در کشت نتیجه مثبت به همراه نداشتند در حالی که ۶ نمونه‌ی خون و ۹ نمونه سرم در بین ۱۰۰ نمونه در روش nested-PCR مثبت بودند (۱۰). در مطالعه حاضر نیز روش کشت نتیجه مثبتی به همراه نداشت ولی حدود ۳۸٪ اندام‌های لمفاوی در PCR مثبت بودند.

با توجه به این که روش‌های ملکولی انجام شده معمولاً روی خون انجام می‌شود و نظر به این که باکتری برای مدت طولانی در خون حضور ندارد، در این مطالعه آزمون PCR در دام‌های سرپوزیتو روی بافت‌هایی



محترم اداره کل دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری و اعضای پژوهشکده بیماریهای مشترک انسان و دام دانشگاه شهر کرد تقدیر و تشکر می نمایند.

References

1. Al-Jam'a, AH., Elbashir, A.M., Al-Faris, S.S. (1993) *Brucella pneumonia*: A case report. *Ann Saudi Med.* 13: 74-77.
 2. Budras, K.D., McCarthy Al Dahouk, S., Nockler, K., Scholz, H.C., Pfeiffer, M., Neubauer, H., Tomaso, H. (2007) Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella* spp. *Clin Chem Lab Med.* 45: 1464-1470.
 3. Bogdanovich, T., Skurnik, M., Lubeclek, P.S., Ahrens, P., Hoorfar, J. (2004) Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella*. *J Clin Microbiol.* 42: 2261-2263.
 4. Bounaadja, L., Albert, D., Chenais, B., Henault, S., Zygmunt, M., Poliak, S., Garin-Bastuji, B. (2009) Real-time PCR for identification of *Brucella* spp: A comparative study of Is711, bcp31 and per target genes. *Vet Microbiol.* 137: 156-164.
 5. Cloeckaert, A., Grayon, M., Grepinet, O. (2000) An IS711 element downstream of the bp 26 gene is a specific of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7: 835-839.
 6. Cloeckaert, A., Grayon, M., Grepinet, O. (2002) Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene. *Vaccine.* 20: 2546-2550.
 7. Esmaili, H., Tajic, P., Ekhtiarzadeh, H., Bolorchi, M., Hamedi, M., Khalaj, M., Amiri, K. (2012) Evaluation of bovine brucellosis control and eradication program in Iran: An epidemiological survey. *J Vet Res (In Persian).* 67: 211-221.
 8. Ghosian Moghaddam, M.H., Keyvani Amineh, H., Zahraei Salehi, T., Khazraei Nia, P., Fallah, N. (2008) A comparison of culture and PCR methods with Wright's test for diagnosis of Brucellosis. *J Shahed University (In Persian).* 74: 51-58.
 9. Gross, A., Bertholet, S., Mauel, J., Dornand, J. (2004) Impairment of *Brucella* growth in human macrophagic cells that produce nitric oxide. *Microb Pathog.* 36: 75-82.
- که احتمال حضور باکتری وجود دارد انجام شد. بنابراین اگر باکتری در این اندامها لوکالیزه شده باشد می توان باکتری را توسط این تکنیک ردیابی کرد. در این مطالعه ۳۷/۷٪ موارد PCR شده آلوده به باکتری متعلق به جنس بروسلا بودند و به عبارتی عفونت فعال را داشتند در حالی که در ۶۲/۳٪ از نمونه های سرپوزیتیو، باکتری ردیابی نشد که می تواند به دلیل برانگیخته شدن سیستم ایمنی میزبان و حذف باکتری و یا به دلیل واکنش های متقاطع باشد که توسط سایر باکتری ها نظیر یرسینیا اترو کولیتیکا به خصوص سویه O9 ایجاد شده است. البته باید خاطر نشان کرد که در روش مولکولی PCR، موارد مثبت کاذب به دلیل آلودگی نمونه ها در مراحل انجام کار و موارد منفی کاذب به دلیل حذف عامل بیماری از بدن به هر دلیل (استفاده از داروها و یا برانگیخته شدن سیستم ایمنی میزبان)، نیز وجود دارد. همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که مناطقی که به عنوان کانون برای بیماری مطرح می باشند تعداد موارد مثبت واقعی در آنها بیشتر می باشد و مناطقی که به صورت تک گیر آلودگی در آنها مشاهده می شود، موارد مثبت کاذب در آنها بیشتر می باشد (جدول ۴).
- یافته ها بیانگر آن است که ۴/۳۵٪ از موارد آلوده، به علت آلودگی با بروسلا ملی تنسیس سویه Rev1 در گاو می باشد که ممکن است به دلیل پرورش گوسفند و بز در کنار گاوها باشد که با نتایج مطالعه Pishva و همکاران در سال ۲۰۰۸ همخوانی دارد (۱۹). توجه بیشتر به گوسفند و بز از نظر اهمیت این گونه ها در انتشار بروسلا ملی تنسیس که عامل اصلی عفونت در موارد بالینی انسان است و می تواند مخزن آلودگی برای گاو هم باشد نیز قویا توصیه می گردد.
- شیوع بالای بیماری در منطقه شماره ۱ می تواند به این دلیل باشد که این منطقه از نظر پرورش دام به صورت یک مجتمع دامپروری می باشد که با توجه به این که ضوابط بهداشتی در رفت و آمد به این مجتمع و حتی در ورود به محوطه هر گاوداری رعایت نمی شود، و از طرفی فاصله بین مزرعه ها بسیار کوتاه بوده که این موضوع می تواند بر شیوع بیش از پیش بیماری در منطقه بیافزاید. علاوه بر این برخی افراد در این مجتمع با شغل دامپروری فعالیت نکرده و با خرید دام های مشکل دار (مثلاً خرید دام سقطی و...) با قیمت مناسب تر باعث شیوع بیماری در منطقه می شوند.
- در پایان پیشنهاد می گردد با توجه به این که نتایج کشت اکثر نمونه ها منفی و ۶۲/۳٪ از نمونه های سرم مثبت در PCR منفی بودند، مطالعات بیشتری برای یافتن روش آزمایشگاهی مناسب جهت تفکیک واکنش های مثبت کاذب و احیاناً بروز واکنش متقاطع صورت گیرد. همچنین مطالعات جدیدی برای یافتن عواملی که موجب بروز این گونه واکنش های کاذب در آزمون های سرولوژی بروسلا می گردند انجام شود.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله بدین وسیله از همکاری آقای مهدی سلیمی و پرسنل



10. Ghorbani, A., Rabbani Khorasgani, M., Zarkesh Esfahani, H., Sharifyazdi, H., Dehghan Kashani, A., Emami, H. (2013) Comparison of serology, culture, and PCR for detection of brucellosis in slaughtered camels in Iran. *Comp Clin Pathol.* 22: 913- 917.
11. Ilhan, Z., Aksakal, A., Ekin, I.H., Gulhan, T., Solmaz, H., Erdenlig, S. (2007) Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Lett Appl Microbiol.* 46: 301-6.
12. Leboffe, M.J., Pierce, B.E. (2012) A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory. (4th ed.) Morton Publishing Company. Englewood, Colorado. p. 138.
13. Lihan, Z., Aksakal, A., Ekin, I.H., Guihan, A., Solmaz, H., Erdenlig, S. (2007) Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Lett Appl Microbiol.* 46: 301-306.
14. López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, CM., de Miguel, MJ., Muñoz, PM., Blasco, JM., Jacques, I., Grayon, M., Cloeckeaert, A., Ferreira, A.C., Cardoso, R., Correa de Sa, M.I., Walravens, K., Albert, D., Garin-Bastuji, B. (2008) Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol.* 46: 3484–3487.
15. Lübeck, PS., Skurnik, M., Ahrens, P., Hoorfar, J. (2003) A multiplex PCR detection assay for *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9 and *Brucella* spp. based on the perosamine synthetase gene. Application to *Brucella* diagnostics. *Adv Exp Med Biol.* 529: 451-453.
16. Mayer-Scholl, A1., Draeger, A., Göllner, C., Scholz, HC., Nöckler, K. (2010) Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *J Microbiol Meth.* 80: 112–114.
17. Mostafavi, A., Asmand, M. (2012) Process of brucellosis (Malta fever) in Iran during 1993-2006. *Iranian Journal of Epidemiology (In Persian).* 8: 94-101.
18. Nielsen, K., Smith, P., Widdison, J., Gall, D., Kelly, L., Kelly, W., Nicoletti, P. (2004) Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157: H7. *Vet Microbiol.* 100: 25-30.
19. Pishva, E., Salehi, M. (2008) First report of isolation of *Brucella melitensis*, vaccine strain Rev.1 as a source of cattle infection in Iran. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran.* 19: 19-23.
20. Quinn, PJ., Carter, ME., Markey, B., Carter, GR. (2004) *Clinical Veterinary Microbiology.* (1st ed.) Morton Publishing Company. Philadelphia, USA.
21. Rossetti, CA., Galindo, CL., Garner, HR., Adams, LG. (2011) Transcriptional profile of the intracellular pathogen *Brucella melitensis* following HeLa cells infection. *Microb Pathogen.* 51: 338–344.
22. Schmoock, G., Ehrichthb, R., Melzera, F., Elschnera, M., Tomaso, H., Neubauer, H., Al Dahouk, S. (2011) Development of a diagnostic multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect and differentiate *Brucella* spp. *Diagn Microb Infect Dis.* 71: 341–353.
23. Scholz, HC., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kampfer, P., Neubauer, H., Cloeckeaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Falsen, E., Bahn, P., Gollner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J., Nockler, K. (2008) *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58: 375-382.
24. Zeinalian Dastjerdi, M., Fadaei Nobari, R., Ramazanpour, J. (2012) Epidemiological features of human brucellosis in central Iran, 2006–2011. *Public health.* 126: 1058-1062.
25. Zeinalian, M., Shirzadi, MR., Kianpour, M. (2012) National guideline for Brucellosis control. In: *Bovine Brucellosis Control.* Ministry of health and medical education. Health deputy, Center of communicable disease control, Zoonoses office. (2nd ed) Razeh Nahan, Tehran, Iran. p. 40-44.



Genomic detection of *Brucella* spp in Seropositive cattle in charmahal va Bakhtiari province, Iran

Mahzounieh, M.R.¹, Mehri, H.R.², Seidi Samani, H.^{3*}, Momeni, A.³, Shokuhi, A.³, Khaksar, KH.², Asadi, M.², Saffarpour, M.⁴, Yektaneh, F.⁴, Nikpour, P.²

¹Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord-Iran

²Veterinary directorate general of Chaharmahal and Bakhtiari, Shahrekord- Iran

³Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran

⁴Research Institute of Zoonotic Diseases, University of Shahrekord, Shahrekord- Iran

(Received 11 August 2015, Accepted 31 October 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Brucellosis is one of the most common zoonosis in Middle East and Iran. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was genomic detection of *Brucella* spp. in sero-positive dairy cattle. **METHODS:** We have collected 28,519 blood samples from cows during 2012-2013. Samples were screened by Slide and tube agglutination and 2-Mercaptoethanol tests. Samples with anti-*Brucella* antibodies titer $\geq 1:80$ and $\geq 1:40$ in tube agglutination and 2-ME tests were considered as positive respectively. Tissue samples include: lymph nodes, liver, testicle and kidney from 122 samples of slaughtered cows were collected. The Sero-positive samples were examined by a collection of specific primers for *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, vaccinal strains included RB51 and Rev1 using PCR tests. **RESULTS:** Results showed that 450 samples were positive in slide agglutination test and 447 samples had anti-brucella antibodies titer equal to or more than 1:80. So they were positive by tube agglutination test. Three hundred eighty nine samples were positive by 2- mercaptoethanol test. PCR test results showed that 46 samples (37.7%) out of 122 samples had a specific sequence of *Brucella* or otherwise they have an active infection with *Brucella* species, whereas 62.3% of samples were negative. The PCR results showed that 2 samples (4.35%) were infected by *B. melitensis*, 2 samples (4.35%) infected by Rev1 strain and 42 samples (91.3%) were infected by *B. abortus*. **CONCLUSIONS:** The results showed that, as we had expected, the majority of cows were infected by *B. abortus*. Animals who infected by *B. melitensis* and Rev1 strain may be a result of contact with sheep or goats. We couldn't find *Brucella* genome in 76 samples (62.3%) of sero-positive cows. It may be caused by cross reaction of sera with *Brucella* species in tests or activation of immune system response and elimination of organism from internal organs.

Keyword: bovine, *Brucella*, PCR, serology

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Interpretation of serological results.

Table 2. Specifications of the primer.

Table 3. Serological test results.

Table 4. Contamination results by region and season in PCR test.



*Corresponding author's email: samani.hassan@yahoo.com, Tel: 038-4424427, Fax: 038-4424427

J. Vet. Res. 70, 4:395-401, 2015