مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۳، ۲۹۱-۲۹۷
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2017.141563.2425

مقایسه دو آنتی‌ژن بروسلا ابورتوس و بروسلا ملی تنسیس جهت استفاده در آزمایش حلقه‌ای شیر گوسفند

سیاوش مکتبی[1*] مهدی زارعی[1] مسعود قربانپور[2] طیبه طهماسبی[1] محسن پاک نژاد[3]

۱) گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲) گروه پاتو بیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۳) دامپزشک، شبکه دامپزشکی شهرستان اندیمشک، خوزستان، ایران

(دریافت مقاله: ۲۴ دی ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۱۷ اردیبهشت ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: بروسلوز یکی از خطرناکترین بیماری‌های عفونی مشترک میان انسان و دام است که انتشار جهانی دارد. مصرف شیر و فرآورده‌های آلوده دامی یکی از راه‌های اصلی انتقال بیماری به انسان است. در ایران گوسفند در مقایسه با گاو درصد آلودگی بالاتری به بروسلوز دارد، بنابراین تشخیص به موقع و دقیق این بیماری نقطه شروع هرگونه برنامه مؤثر به منظور کنترل آن در انسان و دام است. جهت پایش گله از نظر آلودگی به بروسلوز آزمایش حلقه‌ای شیر (MRT) توصیه می‌شود که در خصوص گله‌های گوسفند چندان قابل اعتماد نیست. شاید با تغییر نوع آنتی‌ژن مورد استفاده در MRT بتوان نتایج آن در گله‌های گوسفند را به واقعیت نزدیک‌تر نمود. **هدف:** مقایسه استفاده از دو آنتی‌ژن (بروسلا ابورتوس، بروسلا ملی تنسیس) در MRT جهت ردیابی پادتن ضد بروسلا و نیز بررسی وضعیت آلودگی شیر گوسفندان منطقه دزفول به بروسلا با جستجوی ژنوم‌های بروسلا ابورتوس و بروسلا ملی تنسیس در شیر با روش PCR بود. **روش کار:** در این مطالعه ۲۲۰ نمونه شیر از ۱۶ گله گوسفندان عشایر استان خوزستان منطقه دزفول اخذ گردید. بدین منظور ابتدا MRT با دو آنتی‌ژن بروسلا ابورتوس و بروسلا ملی تنسیس بر روی نمونه‌ها انجام گرفت و سپس تمام نمونه‌ها با PCR نیز مورد بررسی قرار گرفتند. **نتایج:** بررسی MRT نشان داد که از مجموع ۲۲۰ نمونه، ۴۷ مورد (۲۱/۳٪) با هر دو آنتی‌ژن بروسلا ابورتوس و بروسلا ملی تنسیس مثبت می‌باشند. با PCR مشخص گردید از مجموع ۲۲۰ نمونه، فقط ۹ نمونه (۴٪) به ژنوم بروسلا ملی تنسیس آلوده هستند که MRT این ۹ نمونه نیز مثبت بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** تفاوت معنی‌داری بین استفاده از آنتی‌ژن بروسلا ابورتوس یا بروسلا ملی تنسیس در MRT مشاهد نشد. اگرچه اساس دو روش PCR و MRT جهت تشخیص بروسلوز متفاوت است اما وجود تفاوت معنی‌داری بین نتایج حاصل از PCR و MRT نشان می‌دهد که MRT حتی با تغییر آنتی‌ژن هم، در گوسفند آزمایش قابل اعتمادی جهت تشخیص آلودگی شیر به بروسلا نمی‌باشد. با توجه به اینکه روش‌های مختلف شناسایی دارای محدودیت‌های خاص خود می‌باشند، پیشنهاد می‌شود در خصوص نمونه‌های شیر میش ضمن استفاده از یک روش سرولوژیکی به عنوان غربالگری از تکنیک‌های PCR و کشت جهت تشخیص قطعی استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: بروسلوز، بروسلا ابورتوس، بروسلا ملی تنسیس، گوسفند، آزمایش حلقه‌ای شیر، PCR

مقدمه

بروسلوز یکی از بیماری‌های مشترک میان انسان و دام است که توسط باکتری درون‌سلولی اختیاری جنس بروسلا ایجاد می‌گردد(۲). این بیماری بهداشت و سلامت عمومی و اقتصادی دامی در بعضی از کشورها از جمله ایران را به خطر انداخته است (۱۸). از خسارات اقتصادی این بیماری حذف دام‌های سقط کرده، کاهش تولید شیر و گوشت، ناباروری و افزایش فاصله بین دو زایش را می‌توان نام برد. به‌استثنای تعداد کمی از کشورهای جهان که عاری از این عفونت بوده و یا موفق به ریشه‌کنی شده‌اند، اکثریت کشورها به بروسلوز آلوده‌اند. انسان ممکن است با مصرف محصولات لبنی غیرپاستوریزه، تماس با ترشحات واژن بعد از سقط‌جنین یا بعد از زایمان از دام آلوده و حتی استنشاق هوای اصطبل دام‌های آلوده مبتلا گردد. دامپزشکان و کارکنان آزمایشگاه‌ها، سلاخان و کارگران کشتارگاه‌ها، بازرسان گوشت و کسانی که به نحوی با فرآورده‌های دامی در ارتباط هستند در معرض خطر این بیماری می‌باشند (۲).

در کشورهای دیگر درصد آلودگی در گاوها بیشتر از گوسفندان است ولی در ایران گوسفندها درصد آلودگی بالاتری را در مقایسه با گاوها نشان می‌دهند (۸). ابتلا به بروسلوزیس در گوسفندان عشایر استان خوزستان، همواره به عنوان یك مسئله و معضل بهداشتی مطرح بوده است، بنابراین شناسایی و تشخیص دقیق گونه‌های بروسلا جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی در انسان و حیوانات اهلی، به منظور بکارگیری راه‌های کنترلی مناسب، اهمیت پیدا می‌کند (۲۰). یکی از آزمایش‌های معمول که برای پایش و غربالگری بروسلوز در سطح گله استفاده می‌شود، آزمون حلقه‌ای شیر (MRT) است. به‌خصوص در گله‌های گوسفند، MRT چندان قابل اعتماد نیست (۳). شاید با تغییر نوع آنتی‌ژن مورد استفاده در MRT بتوان نتایج آن در گله‌های گوسفند را به واقعیت نزدیک‌تر نمود. گرچه حساسیت این آزمون مورد تائید است ولی اختصاصی بودن آن به خصوص در مواردی که شیوع بیماری پایین باشد مورد سؤال قرارگرفته است (۱۲،۱۹). مهم‌ترین

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۶۱-۳۳۳۰۰۷۳ نمابر: ۰۶۱-۳۳۶۰۸۰۷ Email: s.maktabi@scu.ac.ir

مشـکل اسـتفاده از روش‌های سـرولوژیک، نتایج مثبت کاذب ناشـی از واکنش متقاطع سـایر آنتی‌بادی‌های باکتری‌ها با آنتی‌ژن بروسلا می‌باشد (۳،۱۰،۱۴). کاربرد روش‌های جدید تشـخیصی که از یک طرف منجر به ردیابی و تشخیص سریع و دقیق بروسلا شود و از طرف دیگر خطر عفونت با این باکتری را در آزمایشـگاه به حداقل برساند، ضروری به نظر می‌رسد بنابراین روش‌های تشخیص مولکولی که ساده، سریع و دارای خطر کم‌تر بوده و معمولاً حساسیت بیشتری، برای تشخیص بروسلا دارند، گسترش یافته‌اند. PCR روشی است سریع و دقیق که حساس‌تر از روش کشت بوده و نسـبت به آزمون‌های سرولوژیکی برای تشخیص بروسلوز اختصاصی‌تر می‌باشد (۷،۹،۲۲). با توجه به اینکه آنتی‌ژن موجود در ایران جهت تشخیص سـرولوژیکی بروسلا در شیر، آنتی‌ژن تهیه شده توسط موسسه سرم‌سازی رازی و مربوط به گونه بروسلا آبورتوس است، هدف از این تحقیق مقایسه تشخیص بروسلوز در شیر گوسفند با MRT و به کمک دو آنتی‌ژن بروسلا آبورتوس تولید شده توسط موسسه رازی و بروسلا ملی تنسیس تهیه شده در بخش میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی اهواز و نیز با استفاده از تکنیک PCR در شیر گوسفندان عشایر منطقه دزفول بود.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه‌های شـیر: به منظور انجام آزمایش به صورت کاملاً تصادفی طی دو ماه به ۱۶ گله گوسـفند مربوط به عشـایر منطقه دزفول کـه دارای ۶۰ تا ۳۰۰ رأس گوسـفند بودند، مراجعـه و جمعا اقدام به تهیه ۲۲۰ نمونه شیر گردید. علاوه بر این نسبت به تهیه اطلاعاتی نظیر سابقه واکسیناسـیون گله و سابقه سقط در گوسـفندان از دامداران گردید. جهت تهیه هر نمونه از ۲ کارتیه یك میش به طریقه استریل اقدام به برداشت ml ۵۰ شیر درون لوله فالکون گردید. نمونه‌ها سریعاً در کنار یخ به آزمایشگاه بهداشـت مواد غذایی دانشـکده دامپزشکی دانشگاه شـهید چمران اهواز منتقل و سریعاً آزمایش‌های لازم روی آن‌ها انجام گرفت.

تهیه آنتی‌ژن: در این رابطه از آنتی‌ژن باکتری بروسلا آبورتوس تولید شـده توسط موسسه رازی (کرج- ایران) اسـتفاده گردید. آنتی‌ژن باکتری بروسـلا ملی تنسـیس مورد نیاز در آزمایشـگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشـکی اهواز تهیه شـد. به طور خلاصه ابتدا سوسپانسیون خالصی از باکتری تهیه شـده و پس از سانتریفیوژ به رسوب باقیمانده، هماتوکسلین اضافه و به مدت ۴۸ سـاعت در دمای اتاق نگهـداری گردید. این مخلوط مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه (۴۰۰۰ دور در دقیقه) سـانتریفوژ گردید و رسوب باقیمانده با محلولی شامل سدیم کلرید (۶/۴ g)، اسیدلاکتیک ۸۵٪ (۱/۵ mL) و سـدیم هیدروکسید ۱۰٪ (۴/۴ mL) که با آب مقطر به حجم ۱/L۶ رسـانده شـده و pH نهایی آن بر روی ۳ تنظیم گردیده بود، طی ۳ مرحله شستشو داده شد تا کاملاً از رنگ و سایر مواد زائد پاکسازی گردد. یک گرم از رسوب باکتری در ۳۷ mL سرم فیزیولوژی ۰/۵ ٪حل گردید و pH به‌وسیله محلول اسیدسـیتریک ۰/۱ mol (۲/۵ mL) و ۰/۵ مولار سدیم هیدروژن فسفات (۱ mL) بین ۳/۳ تا ۳/۷ تنظیم گردید. براساس دستورالعمل موجود لازم بود که مقدار فشرده شده باکتری (PCV) آنتی‌ژن حدود ۴ باشد. جهت این‌کار PCV آنتی‌ژن تهیه شـده با دستگاه میکروسانتریفیوژ اندازه‌گیری شد. آنتی‌ژن تهیه شده تا زمان مصرف در دمای ۴°C نگهداری گردید (۲۱).

تسـت حلقه‌ای شـیر (MRT): ابتدا بر روی هر نمونه شیر به منظور تشخیص بروسـلوز به صورت جداگانه ۲ مورد آزمون حلقه‌ای شیر صورت گرفـت. جهت این‌کار درون ۲ لوله باریک همولیز به‌طور جداگانه ۲ mL از نمونه شیر یکنواخت شده ریخته شد و به یک لوله ۳۰ µL آنتی‌ژن بروسلا ملی تنسیس و به لوله دیگر ۳۰ µL آنتی‌ژن بروسلا آبورتوس اضافه گردید. محتویات لوله پس از افزودن آنتی‌ژن به مدت یک دقیقه به آرامی مخلوط گردید و لوله‌ها به مدت ۱ سـاعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شد و نتایج قرائت گردید (۲۱).

روش انجـام PCR: اسـتخراج DNA از نمونه‌هـای شـیر بـا کیت استخراج DNA شرکت سیناژن و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شـد. DNA اسـتخراج شـده تا انجام مراحل بعدی در فریزر منفی ۲۰°C نگهداری گردید. در این مطالعه از پرایمرهای اختصاصی بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس ارائه شده توسط Bricker و Halling در سال ۱۹۹۴ استفاده گردید(۶). توالی نوکلئوتید پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است.

جهت انجام PCR ابتدا محلول مسـترمیکس (سیناژن، ایران) حاوی پرایمرهای مورد بررسی با حجم نهایی ۷۵۰ µL برای ۵۰ نمونه تهیه گردید. همچنین در این مطالعه آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی و DNA اسـتخراج شده از ۲ سویه باکتری بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس که توسط بخش میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی اهواز تأیید و تأمین شده بود به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. سپس ۱۵ µL از مسترمیکس را درون میکروتیوب اسـتریل ۰/۲ ml ریخته و سـپس ۱۰ µL از DNA استخراج شده به آن اضافه شد و نمونه در دستگاه ترمال سایکلر (Bioer, China) قـرار گرفت. همچنین به منظـور تهیه نمونه‌های کنترل مثبت، همزمـان و بطور جداگانـه ۱۰ µL از DNA باکتری بروسـلا آبورتوس و بروسـلا ملی تنسـیس به ۱۵ µL مسـتر میکس اضافه و برای تهیه نمونه کنترل منفی نیز ۱۰ µL آب مقطر به ۱۵ µL مسـتر میکس اضافه گردیده و درون ترمال سـایکلر قرار گرفتند. چرخه دمایی به‌کاررفته شامل ۵ دقیقه حرارت در ۹۴°C، سـپس ۳۵ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴°C، ۴۵ ثانیه در ۶۰°C و ۱ دقیقه در ۷۲ °C و در پایان ۵ دقیقه در ۷۲°C بود. برای مشاهده محصول PCR ژل آگارز ۱٪ تهیه و سـپس محصـولات PCR به درون چاهک‌های ژل منتقل ودر دسـتگاه الکتروفورز (پایـا پژوهش، ایران) قرار داده شـدند. پس از پایان الکتروفورز، ژل روی دستگاه ترانس‌لومیناتور قرار گرفت و تحت تابش نور UV باندهای تشکیل شده مشاهده و مورد بررسی

جدول۱. توالی پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص گونه‌های بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس.

گونه	اندازه محصول	توالی پرایمر	پرایمر	منبع
B. abortus	bp ۴۹۸	۵´ - GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC- ۳´	F	۶
		۵´ - TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT- ۳´	R	
B. melitensis	bp ۷۳۱	۵´ - AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA - ۳´	F	
		۵´ - TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT- ۳´	R	

جدول ۲. نتایج آزمون حلقه‌ای شیر و PCR در نمونه‌های شیر گوسفند.

تست	باکتری	نمونه‌های مثبت (درصد)	نمونه‌های منفی (درصد)	تعداد نمونه
آزمون حلقه‌ای شیر (MRT)	بروسلا آبورتوس	(٪۲۱/۳)۴۷	(٪۷۸/۶)۱۷۳	۲۲۰
	بروسلاملی‌تنسیس	(٪۲۱/۳)۴۷	(٪۷۸/۶)۱۷۳	
PCR	بروسلا آبورتوس	-	(٪۱۰۰)۲۲۰	۲۲۰
	بروسلاملی‌تنسیس	(٪۴/۰۹)۹	(٪۹۵/۹)۲۱۱	

قرار گرفتند.

نتایج

نتایج آزمون حلقه‌ای شیر: آنتی‌ژن اختصاصی جهت آزمون حلقه‌ای شیر گوسفند در ایران وجود ندارد و لذا معمولاً از آنتی‌ژن بروسلا آبورتوس استفاده می‌گردد. در همین راستا هدف از تهیه آنتی‌ژن اختصاصی گوسفند و بز با استفاده از بروسلا ملی‌تنسیس مقایسه این دو آنتی‌ژن با یکدیگر و درنهایت با روش PCR بود. بررسی نمونه‌های شیر نشان داد که ۴۷ نمونه (٪۲۱/۳) در MRT با هر دو آنتی‌ژن بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی‌تنسیس مثبت بوده (جدول۲) و حلقه بنفش رنگ واضح بر روی نمونه‌های فوق شکیل شد.

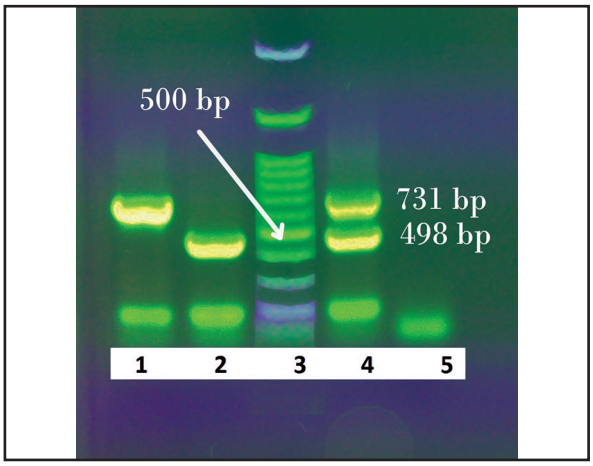
نتایج حاصل از آزمایش PCR: از مجموع ۲۲۰ نمونه شیر مورد آزمایش، ۹ نمونه (٪۴) ازنظر وجود ژن‌های بروسلا مثبت شدند. نکته قابل توجه این‌که تمام این ۹ نمونه فقط با پرایمرهای اختصاصی بروسلا ملی‌تنسیس مثبت بوده و آزمون MRT آن‌ها نیز مثبت بود (جدول۲).

تصویر ۱ الکتروفورز محصول PCR در ژل آگاروز مربوط به تعدادی از نمونه‌ها به همراه نمونه کنترل مثبت و منفی را نشان می‌دهد. چنانچه مشخص است باند ۷۳۱ جفت بازی مربوط به بروسلا ملی‌تنسیس در تعدادی از نمونه‌ها تشکیل شده است.

نتایج بررسی‌های میدانی: نتایج نشان داد که از ۴۷ نمونه مثبت به روش MRT، ۳۶ مورد فقط مربوط به ۲ گله می‌باشد. نکته جالب این‌که ۸ مورد از ۹ مورد شیرهای که به روش PCR حضور ژن بروسلا ملی‌تنسیس در آن‌ها شناسایی شد نیز مربوط به این دو گله بود. این دو گله دارای سابقه سقط جنین بوده که براساس اطلاعات جمع آوری شده یک گله در سال ۱۳۹۳ با واکسن Rev۱ نیز واکسینه شد بود اما از سابقه واکسیناسیون گله دیگر اطلاع چندانی در دسترس نبود. تعداد ۱۱ مورد MRT مثبت به طور پراکنده در ۵ گله دیگر شناسایی شدند که نمونه شیرPCR مثبت نهم نیز مربوط به گله‌ای بود که ۴ مورد MRT مثبت داشت. وجود سقط جنین در این ۵ گله در سنوات گذشته نیز گزارش شده بود.

بحث

تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز بر پایه کشت و جداسازی عامل، زمان‌بر بوده و ممکن است با خطر ایجاد آلودگی‌های آزمایشگاهی همراه باشد (۲۴). در حال حاضر در خصوص گله‌های گاو، پایش گله از نظر بروسلوز با MRT بر روی شیر گله انجام می‌گیرد (۱۲،۱۸) که برای این کار از باکتری رنگ شده بروسلا آبورتوس که عامل اصلی ایجاد بروسلوز در گاو است استفاده می‌شود. به علت وجود مولکول ۴ آمینو ۴ و ۶ دی دزوکسی مانوز در لیپوپلی‌ساکارید بروسلا که ازنظر ژنتیکی با لیپوپلی‌ساکارید باکتری‌های اشرشیا هرمانی، اشرشیا کولای O:۱۵۷، سالمونلا O:۳۰، استنتروفوموناس مالتوفیلیا، ویبریو کلرا O:۱ و یرسینیا آنتروکولیتیکا O:۹، تشابه دارد، احتمال وقوع واکنش‌های متقاطع زیادی وجود داشته و لذا روش‌های سرولوژی تشخیص بروسلوز از جمله این روش از ویژگی پایینی برخوردار است (۱۱،۱۴،۱۵). عامل اصلی بروسلوز در گوسفند و بز، بروسلا ملی‌تنسیس است و به‌خصوص در گله‌های گوسفند، MRT چندان قابل اعتماد نیست. اگرچه این دو باکتری آنتی‌ژن‌های مشترک زیادی داشته و بر این اساس هم توصیه شده است در گوسفند و بز جهت انجام MRT از آنتی‌ژن بروسلا آبورتوس تجاری استفاده شود، ولی ممکن است استفاده از این آنتی‌ژن جهت پایش بروسلوز در گله‌های گوسفند با نتایج قابل قبولی همراه نباشد. این مطالعه با این هدف که شاید با تغییر نوع آنتی‌ژن مورد استفاده در MRT بتوان نتایج آن را در گله‌های گوسفند به واقعیت نزدیک‌تر نمود، انجام شد. بررسی متون علمی نشان داد که تاکنون مقایسه‌ای بین این دو آنتی‌ژن جهت انجام MRT در گوسفند و بز انجام نشده است و به نظر می‌رسد مطالعه حاضر اولین بررسی در این خصوص باشد. همانگونه که اشاره شد، نتایج دال بر عدم وجود تفاوت بین دو آنتی‌ژن فوق بود، ولی



تصویر ۱. الکتروفورز در ژل آگاروز محصول PCR جستجوی اختصاصی بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس در تعدادی نمونه شیر میش به همراه نمونه کنترل مثبت و منفی: ستون شماره ۱ نمونه مثبت بروسلا ملی تنسیس (۷۳۱ bp) ، ستون‌های شماره ۲ کنترل مثبت بروسلا آبورتوس (۴۹۸ bp)، ستون شماره ۳: نردبان ژنی bp۱۰۰، ستون شماره۴: کنترل مثبت بروسلا ملی تنسیس (۷۳۱ bp) و بروسلا آبورتوس (۴۹۸ bp) به صورت توأم، ستون شماره۵: کنترل منفی.

تفاوت معنی‌داری بین نتایج حاصل از PCR و MRT وجود داشت. این نتیجه با توجه به اینکه اساس روش PCR با MRT کاملاً متفاوت است تا حدودی قابل پیش‌بینی نیز بود. معمولاً استفاده از روش‌های مولکولی به عنوان یک روش تأییدی جهت تشخیص بروسلا در کنار روش‌های متداول غربالگری ضروری می‌باشد (۴،۱۴،۲۶). در MRT وجود پادتن ضد بروسلا در شیر و در PCR حضور ژنوم باکتری فوق مورد ارزیابی قرار می‌گیرد که البته هر کدام نیز نتایج مثبت و منفی کاذب خود را دارد. در خصوص نتایج مقایسه‌ای دو آنتی‌ژن مختلف جهت انجام MRT، همانگونه که ذکر شد، مطالعه‌ای انجام نشده است، لذا نتایج این بخش از مطالعه قابل قیاس با پژوهش‌های مشابه نمی‌باشد. در مطالعه حاضر در توافق با مطالعات bateni و Samadzadeh در سال ۲۰۰۱، Hamdy و Amin در سال ۲۰۰۲، Ihan و همکاران در سال ۲۰۰۸، Abdalla و Hamid در سال ۲۰۱۲ و Al-Mriri و Haj-Mahmoud در سال ۲۰۱۰، MRT در مقایسه با PCR میزان شیوع بالاتری را در میش‌ها نشان داد.

مطالعاتی هم‌چون مطالعه Abdalla و Hamid در سال ۲۰۱۲ و Al-Mriri و Haj-Mahoud در سال ۲۰۱۰، دال بر ویژگی و حساسیت کم‌تر MRT در مقایسه با PCR بوده و به موارد مثبت کاذب نسبتاً قابل توجه MRT اشاره دارند. بر اساس نظر این محققین، MRT می‌تواند در موارد دریافت واکسن بروسلوز، وجود کلستروم در شیر، وقوع ورم پستان و آلودگی به اجرام خاص مثبت کاذب گردد. موارد منفی کاذب این آزمون نیز به مواردی هم‌چون کم بودن میزان پادتن شیر (مثلا در ابتدای بیماری) و هموژنیزه بودن چربی شیر مربوط می‌شود. در مطالعه Hamdy و Amin جهت تشخیص بروسلوز، تحقیقی بر روی ۱۰۳ نمونه شیر و سرم گاو، گوسفند، بز و شتر با ۴ روش PCR، آزمون آگلوتنیاسیون استاندارد، آزمایش رزبنگال و MRT انجام داده‌اند و اعلام کرده‌اند که اگر چه روش PCR روشی با سرعت و حساسیت بالا برای تشخیص بروسلا در شیر گاو، گوسفند، بز و شتر است، اما باید توجه داشت که این تکنیک DNA ارگانیسم زنده و مرده را در این نمونه‌ها ردیابی می‌کند (۱۰). در مطالعه دیگری که توسط Ilhan و همکاران در کشور ترکیه صورت گرفته است، ۱۰۲ نمونه شیر میش‌هایی که سابقه سقط‌جنین داشته‌اند با استفاده از ۳ روش MRT،PCR و کشت میکروبی، جهت تشخیص بروسلا ملی تنسیس مورد بررسی قرار گرفته‌اند. نتایج نشان داده است که با روش PCR، ۲۴ نمونه (۲۳/۵٪)، با روش کشت میکروبی ۸ نمونه (۷/۸٪) و با روش MRT ۲۸ نمونه (۲۷/۴٪) آلوده می‌باشند (۱۳). در برخی مطالعات گزارش شده است که حساسیت روش PCR در تشخیص ۹۸ ٪ است (۱۶). مطالعه‌ای توسط Saleha و همکاران در سال ۲۰۱۴ به‌منظور مقایسه MRT، آزمایش اگلوتیناسیون و PCR جهت تشخیص بروسلا بر روی ۱۴۲ نمونه شیر و خون گاو در کشور پاکستان صورت گرفته است. نتایج نشان داده که MRT حساسیت بسیار کمی (۴/۸٪) دارد در حالی که ویژگی آن ۹۰/۹٪ است. همچنین آگلوتیناسیون حساسیت کم (۴۱٪) و ویژگی بالا (۶۶/۷٪) دارد و نتیجه‌گیری شده است، که در مجموع PCR به عنوان یك روش قابل اعتمادتر جهت تشخیص بروسلا در حیوانات می‌باشد (۲۳). در مطالعه‌ای Mohamand و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز جهت تشخیص بروسلوز در گاو از MRT استفاده شده است. در بررسی ایشان بر روی ۱۰۹ نمونه شیر گاو ۱۸/۳۵٪ از نمونه‌ها در MRT مثبت بوده‌اند و نتیجه‌گیری شده است که با توجه به سادگی، MRT را می‌توان به‌عنوان روشی ارزان برای غربالگری اولیه عفونت بروسلا آبورتوس در گاو استفاده نمود (۱۷).

مطالعات فوق نشان می‌دهند که تفاوت زیادی ازنظر میزان آلودگی شیر و محصولات لبنی با استفاده از روش‌های مختلف سرولوژیکی، کشت میکروبی و تکنیک PCR وجود دارد. در مطالعه حاضر نیز میزان آلودگی شیر گوسفندان منطقه دزفول به بروسلا با روش تست حلقه‌ای شیر ۲۱/۳ ٪ و با روش PCR فقط ۴/۱ ٪ تعیین گردید. ضمنا تمامی مواردی که توسط روش PCR مثبت بودند، آلودگی به بروسلا ملی تنسیس داشتند. نتایج نشان داد که روش MRT حتی با استفاده از آنتی‌ژن اختصاصی بروسلا ملی تنسیس موارد مثبت کاذب زیادی دارد. با توجه به این‌که بیشترین موارد مثبت کاذب آزمون MRT در مقایسه با PCR در گله‌هایی بود که سابقه واکسیناسیون داشتند، تعدادی از موارد مثبت MRT می‌تواند ناشی از واکسیناسیون باشد.

اگر چه هدف مطالعه حاضر بررسی شیوع بروسلا در شیر میش نبود، اما به طور کلی نتایج نشان داد که حدود ۴٪ شیر گوسفندان منطقه دزفول به بروسلا ملی تنسیس آلودگی دارند که می‌تواند خطر بهداشتی و ایجاد بیماری توسط مصرف غیرصحیح اینگونه شیرها که متاسفانه در بین عشایر منطقه دیده می‌شود را گوشزد نماید. مقایسه یافته‌های مطالعه حاضر با سایر مطالعاتی که در ایران صورت گرفته (۵،۷،۲۷)، بیانگر وجود یک هم‌خوانی نسبی است. لازم به ذکر است که صرف نظر از میزان آلودگی در

بررســی‌های مذکور، تمامی نمونه‌های آلوده در مطالعه حاضر صرفاً حاوی بروسلا ملی تنسیس بوده‌اند و در هیچکدام از نمونه‌های شیر حضور همزمان هر دو سویه بروسلا ملی تنسیس و آبورتوس تشخیص داده نشده است.

در نهایت نتیجه گیری می‌شــود که تفاوت معنی‌داری بین استفاده از آنتی‌ژن بروســلا ابورتوس یا بروسلا ملی تنســیس در MRT وجود ندارد و اگرچه اساس دو روش PCR و MRT جهت تشخیص بروسلوز متفاوت است اما وجود تفاوت معنی‌داری بین نتایج حاصل از PCR و MRT نشان می‌دهد که MRT حتی با تغییر آنتی‌ژن هم، در گوســفند آزمایش قابل اعتمادی جهت تشخیص آلودگی شیر گوسفند به بروسلا نمی‌باشد. با توجه به اینکه روش‌های مختلف شناســایی دارای محدودیت‌های خاص خود می‌باشند، در خصوص نمونه‌های شیر میش استفاده از MRT جهت غربالگری اولیه توصیه می‌شــود. لازم اســت موارد مثبت MRT با ســایر روش‌ها از جمله PCR و کشت تشــخیص قطعی گردند. لازم است تمامی دام‌های منطقه تحت پوشش بروسلوز قرار گرفته و آموزش‌های لازم در خصوص جلوگیری از انتقال بیماری به انســان و دام‌ها و خطرات مصرف شــیرهای نجوشیده صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر نتایج پایان نامه کارشناســی ارشد بهداشت مواد غذایی می‌باشــد که هزینه‌های انجام آن از طریق پژوهانه دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شــده است که بدینوســیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه سپاسگزاری می‌نماید.

References

1. Abdalla, A., Hamid, M.E. (2012) Comparison of conventional and non-conventional techniques for the diagnosis of bovine brucellosis in Sudan. Trop Anim Health Prod. 44(6): 1151-1155.
2. Agasthya, A. S., Isloor, S., Prabhudas, K. (2007) Brucellosis in high risk group individuals. Ind J Med Microbiol. 25(1): 28.
3. Al-Mariri, A., Ramadan, L., Akel, R. (2011) Assessment of milk ring test and some serological tests in the detection of *Brucella melitensis* in Syrian female sheep. Trop Anim Health Prod. 43(4): 865-870.
4. Amoroso, M. G., Salzano, C., Cioffi, B., Napoletano, M., Garofalo, F., Guarino, A., Fusco, G. (2011) Validation of a Real-time PCR assay for fast and sensitive quantification of *Brucella* spp. in water buffalo milk. Food Control. 22(8): 1466-1470.
5. Bateni, J., Samadzadeh, R. (2001) Contamination of traditional milk and cheese to *Brucella* and *E. coli* in Zanjan city. J Zanjan Uni Med Sci. 35: 58-65.
6. Bricker, B. J., Halling S. M. (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, Brucella ovis, and Brucella suis bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol. 32: 2660-2666.
7. Doosti, A., Dehkordi, P. G. (2011) Application of real-time PCR for identification and differentiation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in cattle. Bulg J Vet Med. 14(2): 109-115.
8. Ebrazeh, N., Asmar., M., Mozafari, N.A., Esfandiari, B. (2011) Investigation of prevalence and incidence brucellosis in slaughtered cattle and sheep in Amol. J Biolo Sci, Lahijan Branch. 2(17):1-9.
9. Gupta, V. K., Verma, D. K., Rout, P. K., Singh, S. V., Vihan, V. S. (2006) Polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Brucella melitensis* in goat milk. Small Rumin Res. 65(1): 79-84.
10. Hamdy, M. E. R., Amin, A. S. (2002) Detection of Brucella species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. Vet J. 163(3): 299-305.
11. Hosseini-Doust, SR., Ahmadi, A., Ahmadi, Z., Hajia, M., Safiri, Z., Golmanesh, L. (2005) Detection of *Brucella abortus* by PCR Assay and Comparison with Culture Assay. J Mil Med. (3): 239-245.
12. Ibrahim, A. K., AbdelAll, A. A., Amin, A. S. (2012) Long-term diagnostic studies for detection of *Brucella* spp. in milk samples. Glob Vet. 8: 54-61.
13. Ilhan, Z., Solmaz, H., Aksakal, A., Gulhan, T., Ekin, I. H., Boynukara, B. (2008) Detection of *Brucella melitensis* DNA in the milk of sheep after abortion by PCR assay. Arch Med Vet. 40(2): 141-6.
14. Memish, Z.A., Almuneef, M., Mah, M.W., Qassem, L.A., Osoba, AO. (2002) Comparison of the Brucella standard agglutination test with the ELISA IgG and IgM in patients with brucella bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis. 44: 129-132.

15. Mensah, G., Kwasi Addo, K. (2011) *Brucella Abortus* Antibodies in Raw Cow Milk Collected from Kraals. J Basic Appl Sci Res. 8: 942-947.
16. Mitka, S., Anetakis, C., Souliou, E., Diza, E., Kansouzidou, A. (2007) Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. J Clin Microbiol. 45: 1211-8.
17. Mohamand, N., Gunaseelan, L., Sukumar, B., Porteen, K. (2014) Milk Ring Test for spot identification of *Brucella abortus* infection in single cow herds. J Adv Vet Anim Res. 1(2): 70-72.
18. Moradi, G., Esmaiel Nasab, N., Ghaderi, E., Sofi Majidpour, M., Salimzadeh, H. (2006) Brucellosis in Kurdistan Province from 1997 to 2003. Ann Alquds Med. 2(1): 32-7.
19. Morgan, B. W. J., MacKinnon, D. J., Gill, K. P. W., Gower, S. G. M., Norris, P. I. W. (1987) Brucellosis diagnosis: Standard Laboratory Techniques. MAFF (2nd ed.). London, UK.
20. Ocholi, R. A., Kwaga, J. K. P., Ajogi, I., Bale, J. O. O. (2004) Phenotypic characterization of Brucella strains isolated from livestock in Nigeria. Vet Microbiol. 103(1): 47-53.
21. OIE. (2015) Bovine brucellosis; In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016, Chapter 2.1.4: 24-26.
22. O'Leary, S., Sheahan, M., Sweeney, T. (2006) *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. Res Vet Sci. 81(2): 170-176.
23. Saleha, S., Basit, A., Rahim, K., Shahid, M., Khan, M. A. (2014) Comparison of milk ring test; serum plate agglutination test and polymerase chain reaction for the detection of bovine brucellosis. Res J Vet Pract. 2(1): 5-8.
24. Serpe, L., Gallo, P., Fidanza, N., Scaramuzzo, A., Fenizia, D. (1999) Single- step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. J Dairy Res. 66(02): 313-317.
25. Shafeie, B., Ahmadi, M., Dastmalchi Saei, H., (2012) Diagnosis of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in the milk of cattle and sheep in Kordestan province by polymerase chain reaction. J Vet Microbiol. 8(2): 127-135.
26. Wright, P.F., Tounkara, K., Lelenta, M., Jeggo, M.H. (1997) International reference Standards: antibody standard for the indieect enzyme- linked immunosorbent assay. Rev Sa Tech. 3: 824-832.
27. Zoghi, E., hajiKhani, R., Vandyoussefi, J. (2006) Brucellosis in Veterinary Medicine. (2nd ed.). Hagh Yavaran Publications, Qum, Iran.

Comparison of Two *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Antigens Used in Ewe's MRT

Maktabi, S.[1*], Zarei, M.[1], Ghorbanpour, M.[2], Tahmasebi, T.[1], Paknejad, M.[3]

[1]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

[2]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

[3]*Veterinarian, Khuzestan Provincial Veterinary Service, Andimeshk, Iran*

(Received 14 January 2018, Accepted 7 May 2018)

Abstract:

BACKGROUND: Brucellosis is one of the most dangerous worldwide infectious zoonotic diseases that are common between ruminants and human. Consumption of infected milk and by-products is the major transmission source to human. In Iran, sheep compared to cow, has a higher rate of contamination with brucellosis. Therefore, early detection and precision could be a starting point for any efficient program to control the disease in human and animals. For brucellosis monitoring, milk ring test (MRT) is recommended but the test is not reliable in sheep herds. Perhaps a more realistic outcome could be achieved by changing the antigen used in MRT. **OBJECTIVES:** Comparison of two *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* antigens in MRT for detection of Brucella antibodies in milk, as well as monitoring contamination of ewe's milk in Dezful region by detection of *B. abortus* and *B. melitensis* genes using PCR. **METHODS:** In this research, 220 milk samples from 16 different herds were collected from Dezful region's nomadic at Khuzestan province. As the first step, MRT by two antigens, *B. abortus* and *B. melitensis*, were conducted on the samples. Next, the samples were subjected to detect Brucella genes using PCR technique. **RESULTS:** Results showed that 47 (21/3 %) out of 220 cases were positive by MRT test, in terms of both antigens of *B. abortus* and *B. melitensis*. In PCR, out of 220 samples, only 9 (4%) samples were positive for specific genes of *B. melitensis* which were MRT positive as well. **CONCLUSIONS:** A significant difference between *B. abortus* and *B. melitensis* antigens was not observed in MRT. Although the nature and basis of PCR and MRT methods for the diagnosis of brucellosis is different but a significant difference between the results obtained by PCR and MRT showed that MRT even by changing of antigens is still not authentic. Considering that various methods of identification have their limitations, it is recommended that in ewe's milk samples, in addition to using a serological method as screening, PCR and culture methods should be used for definitive diagnosis.

Keyword: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, Ewe, MRT, PCR

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Results of MRT and PCR in ewe's milk samples.

Table 2. Primers used for detection of *B. abortus* and *B. melitensis*.

Figure 1. PCR results on gel electrophoresis No: 1 positive sample of *B. melitensis* (731 bp), No: 2 positive control (*B. abortus*, 498 bp), No: 3, Ladder 100 bp plus, No: 4, Positive control (*B. abortus* and *B. melitensis*), No: 5, negative control.

***Corresponding author's email: s.maktabi@scu.ac.ir, Tel: 061-3330073, Fax: 061-3360807**