



## جداسازی و شناسایی بروسلا ملی تنسیس بیووار ۱ با استفاده از روش‌های کشت، سرولوژی و مولکولی در بزهای سانن استان البرز - ایران

حافظ صادقی<sup>۱</sup>، ایرج اشرفی‌نمای<sup>۲</sup>، مهدی وجگانی<sup>۱</sup>، فرامرز قراگوزلو<sup>۱</sup>، تقی زهرائی صالحی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه آموزشی مامایی و بیماری‌های تولیدمثل دام، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه میکروبیولوژی ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۸ اسفند ماه ۱۴۰۰، تاریخ پذیرش: ۲۸ اردیبهشت ماه ۱۴۰۱

doi 10.22059/jvr.2021.318798.3133



20.1001.1.20082525.1401.77.2.5.2

### چکیده

**زمینه مطالعه:** بروسلوز یا تب مالت از شایع‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام می‌باشد که به لحاظ بهداشت جامعه و خسارات اقتصادی ناشی از آن، از اهمیت فراوانی برخوردار است.

**هدف:** جستجوی باکتری بروسلا با روش‌های مختلف در نمونه‌های شیر و خون بزهای سانن و استفاده از یک روش مطمئن و قطعی در تشخیص این بیماری می‌باشد. **روش کار:** در مطالعه حاضر مقطعی - توصیفی نمونه‌های خون و شیر از ۱۲۲ بز سانن مربوط به یک دامداری صنعتی بزرگ در استان البرز به صورت جداگانه جمع‌آوری شد و پس از کشت، آزمون‌های سرولوژی رزبنگال، رایت و ۲ امرکاپتوانول برای نمونه‌های خون و آزمون تست حلقه‌ای شیر برای نمونه‌های شیر انجام گرفت. سپس DNA استخراج شده تمام نمونه‌های شیر و خون با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس بروسلا مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد از پرایمرهای اختصاصی گونه‌های آبورتوس و ملی تنسیس برای شناسایی برخی از گونه‌های بروسلا استفاده شد.

**نتایج:** کشت تمام نمونه‌های خون منفی گزارش گردید اما رشد باکتری در سه نمونه شیر، مشاهده شد که در بیوتایپینگ، بیووار ۱ ملی تنسیس تشخیص داده شد. در آزمون سرولوژی خون نیز، ۸ نمونه مثبت و یک نمونه مشکوک به بروسلا شناسایی گردید که با روش مولکولی هر ۹ نمونه (۷/۴ درصد) مثبت مشاهده شد. همچنین در آزمون تست حلقه‌ای شیر هم ۱۲ نمونه مثبت بود که در روش مولکولی، ۹ نمونه (۷/۴ درصد) مثبت مشاهده شد. با استفاده از پرایمرهای گونه به روش مولتی پلکس، هر ۹ نمونه شیر و خون، بروسلا ملی تنسیس تشخیص داده شدند.

**نتیجه‌گیری نهایی:** بهبود سیستم تشخیصی مناسب باکتری و استفاده از روش‌های مولکولی مانند PCR یا Real Time PCR به‌عنوان یک روش سریع و با حساسیت بالا و همچنین ایجاد آگاهی در جامعه، در کنار سایر عملکردهای سازمان دامپزشکی می‌تواند در کنترل بیماری، سیر نزولی و ریشه‌کنی آن مهم باشد.

**کلمات کلیدی:** بروسلا ملی تنسیس، بز سانن، سرولوژی، PCR، بروسلوز

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

**نویسنده مسئول:** ایرج اشرفی‌نمای، گروه میکروبیولوژی ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

پست الکترونیکی: Iashrafi@ut.ac.ir

### مقدمه

پاپیونیس و ۳ گونه غیر تیپیک: میکروتی، اینوپیناتا و ولپیس طبقه‌بندی شده است (۵). بیماری تب مالت در انسان متعاقب تماس مستقیم با حیوان آلوده خصوصاً ترشحات و مایعات رحمی در زمان زایمان، و تماس غیرمستقیم از طریق شیر و محصولات لبنی صورت می‌گیرد. هرچند از طریق پوست و تنفسی هم وارد می‌شود. بروسلا در دام‌های آلوده در غدد پستانی و غدد لنفاوی فوق‌پستانی جایگزین شده

باکتری بروسلا عامل بیماری بروسلوز یا تب مالت، از شایع‌ترین بیماری مشترک بین انسان و دام بوده که به لحاظ بهداشت جامعه و ضرر و زیان اقتصادی اهمیت فراوانی را دارد. این باکتری طیف وسیعی از پستانداران شامل: انسان، شتر، گاو، گوسفند، بز، جوندگان و پستانداران دریایی را درگیر می‌کند (۴-۱). گونه‌های اصلی بروسلا در ۹ گونه: ملی تنسیس، آبورتوس، سویس، کنیس، اوپس، نئوتومه، ستی، پینی پیدیالیس و

## مواد و روش کار

**نمونه‌گیری:** نمونه‌گیری از ۱۲۲ رأس بز سانن یک دامداری

بزرگ در استان البرز و در زمستان ۱۳۹۸ با سابقه چندین سقط و بدون سابقه واکسیناسیون صورت گرفت. نمونه‌های شیر و خون از بزهای سانن و با رعایت اصول نمونه‌برداری اخذ گردید. جهت آزمایش‌های کشت، سرولوژی و مولکولی از نمونه‌های خون، سه تا پنج میلی‌لیتر خون وریدی بدون ماده ضد انعقاد و هم به‌صورت هپارینه اخذ گردد همچنین برای آزمون‌های کشت، سرولوژی و مولکولی نمونه‌های شیر، ۲۵ میلی‌لیتر شیر از کارتیبه‌ها جمع‌آوری و در یک فالکون استریل ریخته شد و با حفظ شرایط سرمایی به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل گردید. سرم نمونه‌های خون به روش سانتریفیوژ کردن جداسازی شد (۱۹) و همراه با نمونه‌های شیر پس از کشت دادن، تا زمان آزمون مولکولی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

**کشت از نمونه‌های خون و شیر:** نمونه‌های شیر و خون در

محیط انتخابی بروسلای همراه با مکمل رشد با آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌میکسین ب (۲۵۰۰ واحد بین‌الملل)، باسیتراسین (۱۲۵۰۰ واحد بین‌الملل)، سیکلوهگزامید (۵۰۰۰ میلی‌گرم)، نالیدیکسیک اسید (۲۵۰ میلی‌گرم)، نیستاتین (۵۰۰۰۰ واحد بین‌الملل)، ونکومایسین (۱۰۰۰ میلی‌گرم) (Oxoid, Basingstoke, UK) کشت داده شد و به مدت پنج روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دی‌اکسید کربن ۱۰ درصد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس به محیط انتخابی بروسلای اگر انتقال داده شد و به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دی‌اکسید کربن ۱۰ درصد نگهداری شد. پرگنه‌های رشد کرده از نظر آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، اوره، نیترات،  $H_2S$ ، گلوکز و لاکتوز بررسی شدند (۲۰). بیوتایپینگ کلاسیک طبق روشی که توسط Alton و همکاران در سال ۱۹۹۸ توصیف شده است انجام شد. آنتی‌سرم‌های اختصاصی A و M و فاژ مرجع بروسلای تفلیس (Tb) تهیه شده از موسسه رازی برای تشخیص و تجزیه و تحلیل استفاده گردید. برخی از آزمایش‌های بیوتیپ مانند وابستگی به  $CO_2$ ، تولید  $H_2S$ ، آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم A و M، رشد در محیط حاوی تیونین و فوشین، آگلوتیناسیون توسط آکریفلاوین و لیز توسط فازهای خاص انجام شد و نتایج با توجه به داده‌های مستند تفسیر شد (۲۲-۲۰).

**آزمون سرولوژی:** نمونه‌های سرم به روش غربالگری رزینگال

(RBPT) بر روی پلیت (یک قطره سرم و یک قطره آنتی‌ژن A و M) با بررسی از نظر آگلوتیناسیون انجام گرفت (۲۲). نمونه‌های شیر نیز به روش آزمون حلقه‌های شیر (MRT) با استفاده از آنتی‌ژن بروسلای

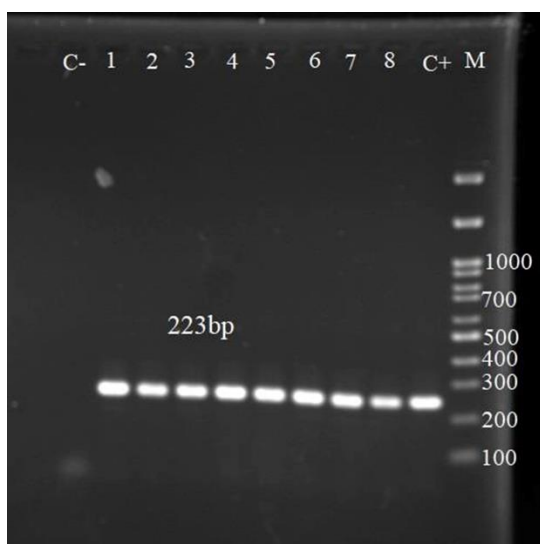
و به داخل شیر منتقل می‌شود و ایجاد بیماری می‌کند (۸-۶). هر چند برخی از کشورهای توسعه‌یافته با استراتژی‌های مختلف، برنامه‌ریزی‌های دقیق و امکانات مناسب دامپزشکی و حمایت سازمان‌های پزشکی توانستند این بیماری را ریشه‌کن کنند ولی در برخی از کشورها مانند ایران این باکتری بومی بوده و علیرغم تلاش‌های فراوان سازمان دامپزشکی، خسارات زیادی مانند: سقط، ضعف دام‌ها و حذف دام آلوده را به صنعت دامداری ایران وارد می‌کند (۹-۱۱). گونه‌های شایع بروسلای در ایران در درجه اول ملی تنسیس بیووارهای ۱ و ۳ و سپس آبورتوس بیووار ۱ می‌باشد (۱۲). هر چند واکسیناسیون در کشور با همت سازمان دامپزشکی و به‌صورت رایگان انجام می‌گیرد ولی عواملی مانند عدم نظارت کافی در واردات دام‌ها و وجود مرزهای فراوان قاچاق دام در کشور، وجود دامداری‌های سنتی و آگاهی ناکافی دامداران، جمعیت زیاد عشایری کشور، توزیع محصولات لبنی به‌صورت مستقیم از دامداری‌ها و بدون پاستوریزاسیون، نبود واکسیناسیون منظم در کل کشور و عدم اجرای آزمون و کشتار در مورد دامداری‌ها، از موارد گسترش این بیماری در ایران می‌باشد (۱۳، ۱۲).

ریشه‌کنی این بیماری در بین جامعه انسانی و دامی مستلزم یک بررسی و پژوهش همه‌جانبه دارد و اساساً در درجه اول بر پایه آزمون‌های سرولوژیکی از قبیل: رزینگال، رایت و 2ME می‌باشد. این آزمون‌ها در جهت شناسایی اولیه دام‌های آلوده و حذف آن‌ها و واکسیناسیون دام‌های سالم دیگر است. چون این آزمون‌ها دارای نتایج منفی کاذب به جهت واکنش‌های متقاطع با باکتری‌های دیگر و سویه واکسن بوده چندان مورد پذیرش و اطمینان دامداران نبوده و باعث مقاومت آن‌ها در جهت حذف دام آلوده می‌شود (۱۴، ۸). از طرف دیگر در آزمون کشت هم که به‌عنوان یک روش استاندارد طلایی معرفی شده است دوره انکوباسیون طولانی، داخل سلولی بودن باکتری و عدم جداسازی در موارد مزمن بیماری باعث شده این روش هم حساسیت کمتری داشته باشد هر چند این روش، نیاز به آزمایشگاه‌های با حفاظت بالا را نیز دارد (۱).

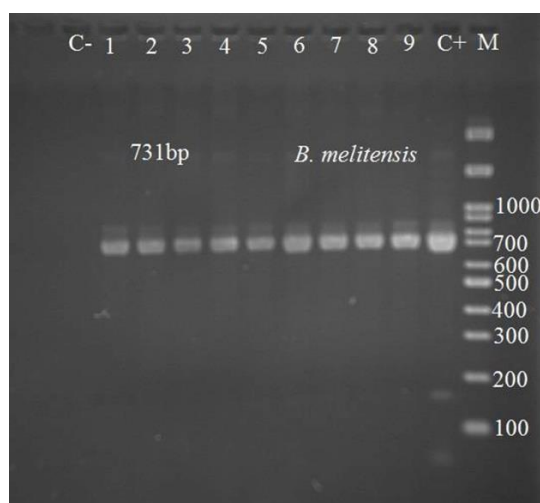
استفاده از یک روش مناسب در جهت تشخیص سریع باکتری بروسلای از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. یکی از روش‌های مناسب و سریع، روش مولکولی PCR است. این روش علاوه بر سرعت، دقت و بی‌خطر بودن دارای حساسیت و ویژگی بالایی نسبت به آزمون‌های سرولوژیکی و کشت دارد و بروسلای در حد گونه شناسایی می‌شود (۱۸-۱۵). هدف از مطالعه حاضر، بررسی وضعیت شیر بزهای سانن از نظر بروسلای و همچنین پیشنهاد یک روش مطمئن و سریع در شناسایی بروسلای در حد گونه می‌باشد.



بیماری‌های مشترک بین انسان و دام می‌باشد که اهمیت جهانی دارد و بر اساس یک معیار جهانی، میزان تب مالت در جمعیت انسانی یک کشور رابطه مستقیمی با میزان شیوع بروسلوز در جمعیت دامی آن کشور دارد (۲۸). صدمات اقتصادی فراوان به صنعت دامداری‌ها مانند کاهش شیر، کاهش باروری، اختلال در برنامه‌های تولیدمثلی، سقط جنین و حذف دام و همچنین صدمه به اقتصاد کشور در جلوگیری از تجارت بین‌المللی، منع فروش و صادرات فراورده‌های آلوده دامی، توجه به این بیماری را آشکار می‌سازد (۲۹). در مطالعه حاضر، علل سقط یکی از دامداری‌های بزرگ صنعتی بزهای سانن از نظر بیماری بروسلوز با چندین روش مورد بررسی قرار گرفته است.



تصویر ۱. نتایج واکنش زنجیره‌ای PCR برای شناسایی جنس بروسلا.



تصویر ۲. نتایج مولتی‌پلکس PCR برای تشخیص بروسلای تنسیس و آبورتوس.

**جدول ۲.** نتایج آزمون‌های مورد استفاده برای تشخیص بروسلا از نمونه‌های خون بزهای سانن.

نمونه	کشت	رزبنگال	رایت	۲مرکاپتواناتول	PCR
۱	-	++++	۱/۱۲۸۰	۱/۶۴۰	+
۲	-	++++	۱/۱۲۸۰	۱/۶۴۰	+
۳	-	+++	۱/۶۴۰	۱/۳۲۰	+
۴	-	+++	۱/۶۴۰	۱/۳۲۰	+
۵	-	+++	۱/۶۴۰	۱/۳۲۰	+
۶	-	+++	۱/۶۴۰	۱/۳۲۰	+
۷	-	++	۱/۳۲۰	۱/۳۲۰	+
۸	-	++	۱/۳۲۰	۱/۱۶۰	+
۹	-	+(-)	۱/۸۰	۱/۸۰	+

**جدول ۳.** نتایج آزمون‌های مورد استفاده برای تشخیص بروسلا از نمونه‌های شیر بزهای سانن.

نمونه	تست حلقه ای شیر	کشت	PCR
۱	+	+	+
۲	+	+	+
۳	+	+	+
۴	+	-	+
۵	+	-	+
۶	+	-	+
۷	+	-	+
۸	+	-	+
۹	+	-	+
۱۰	+	-	-
۱۱	+	-	-
۱۲	+	-	-

**نتایج آزمون PCR:** نتایج به‌دست‌آمده از آزمون PCR با

استفاده از پرایمرهای B4 و B5 نشان داد که از ۱۲۲ نمونه شیر بزهای سانن، ۹ نمونه (۷/۴ درصد) واجد باند ۲۲۳bp بوده که نشان‌دهنده جنس بروسلا می‌باشد که در نمونه‌های خون هم همین ۹ نمونه، مثبت مشاهده شد (تصویر ۱). در آزمون دوگانه PCR هم هر ۹ نمونه مثبت واجد باند ۷۳۱bp بودند که نشان‌دهنده بروسلای تنسیس می‌باشند (تصویر ۲). هیچ‌کدام از نمونه‌ها باند ۴۹۸bp را نشان ندادند. نتیجه تعیین توالی یکی از نمونه‌ها، در جهت تأیید نهایی بروسلای تنسیس بود که این نمونه در بانک ژنی با کد MT355497 ثبت گردید.

## بحث

در سال‌های اخیر مصرف شیر به لحاظ ارزش غذایی بالارو به افزایش بوده و بررسی آلودگی‌های میکروبی آن به‌ویژه باکتری بروسلا بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۲۷). بروسلوز یکی از مهم‌ترین

رایج می باشند (۲۰،۳۱). هر چند بیووارهای دیگر نیز در ایران گزارش شده است (۳۲،۳۳).

روش‌های سرولوژی از قدیم مورد توجه دامپزشکان و پزشکان بوده است. روش‌هایی مانند رزبنگال، رایت و ۲مرکاپتواتانول. این روش‌ها هرچند ساده و کم‌هزینه هستند ولی نتایج قطعی ندارند و موارد منفی یا مثبت کاذب در آن‌ها مشاهده می‌شود. وجود آنتی ژن‌های مشترک برخی از باکتری‌ها با بروسلا مانند *پرسینیا انتروکولیتیکا*، *سالمونلا*، *کمپیلوباکتر فتوس*، *ویبریو کلرا* و *بردتلا برونشیسپتیکا* باعث ایجاد آگلوتیناسیون و جواب مثبت کاذب می‌شوند (۱۴،۲۲). در مواردی هم مانند اوایل بیماری، زمان زایمان، فرم مزمن بیماری، نقص ایمنی‌ها، آنتی بیوتیک‌تراپی‌ها و عدم شناسایی برخی از آنتی‌بادی‌ها مانند IgG1 در آزمون رایت، نتایج منفی کاذب مشاهده می‌شود (۸). از طرف دیگر مشکوک بودن برخی از آزمون‌ها و نیاز به تکرار آزمایش در روزهای آینده، تردید دامدار از پرداخت غرامت، ضعف در سیستم قرنطینه و عدم تامین دام جایگزین باعث تمایل دامدار به فروش دام آلوده و خروج آن از دامداری شده و شیوع بیماری را باعث می‌شود (۳۴-۳۶).

بررسی آلودگی شیر بزها از نظر بروسلا بسیار اهمیت دارد چراکه از شیر بز در تهیه پنیرهای سنتی استفاده شده و یکی از پنیرهای محبوب در برخی از کشورها مانند ترکیه و ایران به حساب می‌آید (۲۲). آزمون حلقه‌ای شیر یکی از روش‌های غربالگری پرکاربرد خصوصا در گاوهای شیری می‌باشد. منتها نتایج مثبت بالا به دلیل عدم اختصاصی بودن این روش در شیرهای بز، از معایب این آزمون می‌باشد. عوامل موثر دیگر بر روی نتایج این آزمون، ورم پستان، آغوز و شیرهای پایان دوره شیرواری می‌باشد (۲۲). در مطالعه حاضر ۱۲ نمونه شیر با روش آزمون حلقه‌ای شیر مثبت گزارش گردید که با بررسی روش‌های دیگر از جمله روش مولکولی، سه نمونه (۲۵ درصد) آن مثبت کاذب تشخیص داده شد (جدول ۲،۳). در مطالعه Ilhan و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز از ۱۰۲ نمونه شیر ۲۸ نمونه از نظر آزمون حلقه‌ای شیر مثبت مشاهده شد در حالی‌که در روش مولکولی ۲۴ نمونه مثبت تشخیص داده شد (۲۲). در مطالعه Eitahir و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی ۳۲۴ نمونه شیر و خون در بز، ۳۸ نمونه (۱۱/۷ درصد) در آزمون رزبنگال، ۶۲ نمونه (۱۹/۱ درصد) در آزمون الیزا و ۲۷ نمونه (۸/۳ درصد) در آزمون CFT موارد مثبت گزارش شده است. این در حالی است که در روش کشت دو نمونه مثبت از شیر و یک نمونه مثبت از خون

هر چند استاندارد طلایی برای تشخیص بروسلا روش کشت می‌باشد ولی وقت‌گیر بودن و خطرناک بودن این روش، همچنین وجود نتایج منفی در کشت به دلایل مختلف مانند نیاز به محیط‌های کاملاً اختصاصی مانند محیط‌های دی‌فازیک و کاستاندا، سخت رشد بودن باکتری، آلودگی‌های ثانویه در نمونه‌ها، استفاده از محیط‌ها و روش‌های نامناسب، تغلیظ گلبول‌های سفید به روش سانتریفیوژ کردن و شکستن گلبول‌ها، مقدار کم باکتری در خون و شیر، زنده نبودن باکتری و نمونه‌گیری از محل نامناسب برای تشخیص، از معایب این روش می‌باشد (۲۲). در مطالعه Sharma و همکاران در سال ۲۰۱۸ از ۲۸ نمونه مثبت سوپ واژن و محتویات جنینی در نمونه‌های بز و گوسفند، فقط سه نمونه در محیط کشت جداسازی شده بود که دو نمونه مربوط به سوپ واژن و یک نمونه هم مربوط به محتویات جنین سقط شده بود. در این مطالعه اشاره شده که نمونه‌های واژینال و ترشحات رحمی در زمان سقط بهترین نمونه برای کشت محسوب می‌شوند (۱۹). در مطالعه Ilhan و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز از ۱۰۲ نمونه شیر مورد مطالعه، فقط ۸ نمونه (۷/۸ درصد) در محیط‌های کشت جداسازی شده در حالی‌که با روش مولکولی ۲۴ نمونه مثبت تشخیص داده شد (۲۲). در مطالعه حاضر با توجه به این‌که سقط در ماه‌های قبل صورت گرفته بود از نمونه‌های خون و شیر برای بررسی بروسلا، استفاده گردید. در نتایج کشت از نمونه‌های خون و شیر مورد مطالعه، فقط سه نمونه مثبت (۲/۵ درصد) از شیر مشاهده شد و نمونه‌های خون از نظر رشد منفی گزارش شدند که میزان پایین بودن مقدار باکتری در نمونه، زنده نبودن ارگانیسیم و میل به داخل سلولی بودن باکتری بروسلا و نیاز به محیط‌ها و روش‌های اختصاصی می‌تواند از دلایل جداسازی پایین باکتری در این مطالعه به روش کشت باشد که همسو با مطالعات دیگران بود. در تحقیقی دیگر از ۵۴ نمونه از شیر بزهای با سابقه سقط به روش سرولوژی، ۳۲ نمونه (۵۹ درصد) مثبت دیده شد که در روش مولکولی ۴۸ نمونه (۸۸/۸ درصد) مثبت گزارش گردید. در این مطالعه سخت رشد بودن باکتری بروسلا از معایب روش کشت اشاره شده است. همچنین روش مولکولی ابزاری ارزشمند در جهت شناسایی باکتری بروسلا در شیر بز اشاره شده است (۳۰).

شناسایی بیووارهای بروسلا از نظر اپیدمیولوژی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در نتایج بیوتایپینگ این مطالعه، هر سه نمونه جدا شده از کشت، بروسلا ملی تنسیس بیووار ۱ تشخیص داده شد. در مطالعات دیگران نشان داده شده است که بیووار ۱ و ۳ ملی تنسیس در برخی از کشورها مانند ایران، ترکیه و آسیای مرکزی

بروسلا وجود دارد. علاوه بر این آنتی‌بادی‌های ترشحی مربوط به واکسیناسیون می‌تواند اختلال در کارهای تشخیصی با روش‌های سرولوژی ایجاد نماید که با انتخاب پرایمرهای مناسب می‌توان گونه‌های واکسیناسیون را از گونه‌های وحشی تفریق داد (۳۹). در یک مطالعه‌ای که در این مورد صورت گرفته بود از ۷۰ نمونه سقطی در گاو، ۵۰ مورد بروسلای شناسایی شده که با روش مولکولی، دو مورد آن بروسلای ملی تنسیس واکسن Rev1 تشخیص داده شده بود (۱۸). در مطالعه Dadar و همکاران در سال ۲۰۱۸ به روش RFLP-PCR علاوه بر تشخیص بروسلای، گونه‌های آن و سویه‌های مربوط به واکسن Rev1 نیز شناسایی شده‌است و روش‌های مولکولی به عنوان یک روش تشخیصی مناسب پیشنهاد شده است (۲۰).

**نتیجه‌گیری نهایی:** در مطالعه حاضر مشاهده شد که علیرغم تمام تلاش‌های سازمان دامپزشکی کشور، بیماری بروسلوز حتی در دامداری‌های صنعتی کشور هم دیده می‌شود. بهبود سیستم تشخیصی با یک روش مناسب مانند روش مولکولی PCR در کنار عواملی مانند پوشش‌دهی مناسب واکسیناسیون گوسفندان و بزها، استفاده از تجارب برخی از کشورها در جهت سیر نزولی یا ریشه‌کنی این بیماری و آگاهی و دانش مناسب به دامداران، می‌تواند در کنترل و ریشه‌کنی این بیماری مشترک بسیار مهم باشد.

## سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از اعضای محترم گروه میکروبیولوژی-ایمونولوژی و گروه بیماری‌های داخلی دام‌های بزرگ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در کلیه مراحل انجام این مطالعه یاری رساندند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

جداسازی شده است. در این مطالعه نیز به اهمیت روش مولکولی به عنوان یک روش قطعی در تشخیص اشاره شده است (۲۳). نتایج به‌دست آمده در مطالعات فوق همسو با مطالعه حاضر می‌باشد.

در مطالعه حاضر از روش مولکولی PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه‌های آبورتوس و ملی تنسیس در مورد نمونه‌های شیر و خون انجام گرفت. در آزمون PCR تمام موارد مثبت و مشکوک سرولوژی از خون و ۹ مورد از ۱۲ مورد مثبت آزمون حلقه‌های شیر، از نظر باکتری بروسلای مثبت مشاهده شد و از نظر گونه نیز، ملی تنسیس تشخیص داده شدند و تعیین توالی یکی از نمونه‌های مثبت قطعی بودن این روش را تأیید نمود. حساسیت و ویژگی پرایمر تشخیص جنس مورد استفاده در این مطالعه، ۱۰۰ درصد گزارش شده است که همسو با مطالعه Al-Mariri و همکاران در سال ۲۰۱۰ می‌باشد (۳۷). Renukaradhyia و همکاران در سال ۲۰۰۲ اهمیت روش مولکولی را در تشخیص بزهایی که عفونت را دارند ولی سقط نمی‌کنند و در زمان زایمان انتشار باکتری را در دامداری باعث می‌شوند و همچنین در مورد بزهای آلوده‌ای که به دامداری اضافه می‌شوند اشاره کرده است (۳۸). در مطالعه Ilhan و همکاران در سال ۲۰۰۸، روش مولکولی به عنوان یک روش سریع، قطعی و حساس عنوان شده و یک روش مفید برای تشخیص پیشنهاد شده است (۲۲). در مطالعه Ghorbani و همکاران در سال ۲۰۱۳ نیز، روش مولکولی به عنوان یک روش مناسب با قدرت بالای تشخیصی اشاره شده است. در این مطالعه یک نمونه منفی در آزمایش‌های سرولوژی، با روش PCR مثبت تشخیص داده شد که می‌تواند به عنوان یک منبع عفونت، بسیار اهمیت داشته باشد (۲۴).

در استفاده از روش‌های مولکولی علاوه بر سرعت و دقت بالا و استفاده مقدار ناچیزی از نمونه، توان تشخیص گونه‌های بروسلای در گونه‌های غیراختصاصی میزبانی نیز وجود دارد. در برخی از دامداری‌ها که گاو، گوسفند و بز به صورت یک‌جا نگهداری می‌شوند احتمال آلودگی گاو، گوسفند و بز با گونه‌های غیراختصاصی

## References

1. Haque N, Bari MS, Hossain MA, Muhammad N, Ahmed S, Rahman A, Hoque SM, Islam A. An overview of Brucellosis. *Mymensingh Med J.* 2011; 20(4): 742- 747. PMID: [22081201](#)
2. Hoffman T, Rock K, Mugizi DR, Muradrasoli S. Molecular detection and characterization of *Brucella species* in raw in formally marketed milk from Uganda. *Infect Ecol Epidemiol.* 2016; 6(1): 1-4. doi: [10.3402/iee.v6.32442](#) PMID: [27839533](#)
3. Luna L, Mejia L, Barragan VA, Trueba G. Molecular detection of *Brucella species* in Ecuador. *Intern J APPL Res Vet Med.* 2016; 14(2): 185-189.
4. Mandell G, Bennett J, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Disease. 7<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, USA; 2009.
5. Whatmore AM, Davison N, Cloeckaert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, Perrett II, Koylass MS, Vergnaud G,

- Quance C, Scholz HC, Dick EJ, Hubbar G, Schlabritz Loutsevitch NE. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio spp.*). Int J Syst Evol Microbiol. 2014; 64(12): 4120-41128. doi: [10.1099/ijs.0.065482-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.065482-0) PMID: [25242540](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25242540/)
6. Ibrahim AK, Abeer A, Abdelall, Amin AS. Long-Term diagnostic studies for detection of *Brucella spp.* in milk samples. Glob Vet. 2012; 8(1): 54-61.
  7. Moradi G, Esmail Nasab N, Ghaderi E, Sofi Majidpour M, Salimzadeh H. Brucellosis in Kurdistan province from 1997 to 2003. Ann Alq Med, 2006; 2: 32-7.
  8. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley Blackwell publication. Hoboken, USA; 2011.
  9. Haran M, Agarwal A, Kupfer Y, Seneviratne C, Chawla K, Tessler S. *Brucellosis presenting as septic shock*. BMJ Case Rep. 2011. doi: [10.1136/bcr.12.2010.3586](https://doi.org/10.1136/bcr.12.2010.3586) PMID: [22701076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22701076/)
  10. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis. 2006; 6(2): 91-9. doi: [10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6) PMID: [16439329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16439329/)
  11. Ramin B, MacPherson P. Human brucellosis. BMJ. 2010; 341. doi: [10.1136/bmj.c4545](https://doi.org/10.1136/bmj.c4545) PMID: [26221498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26221498/)
  12. Makarem E, Karjoo R, Omid A. Frequency of *Brucella melitensis* in southern Iran. J tropediatr. 1982; 28: 97. doi: [10.1093/tropej/28.2.97](https://doi.org/10.1093/tropej/28.2.97) PMID: [7183780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7183780/)
  13. Sofian M, Aghakhani A, Velayati AA, Banifazl M, Eslamifar A, Ramezani A. Risk factors for human brucellosis in Iran: a case-control study. Int J Infect Dis. 2008; 12(2): 157-61. doi: [10.1016/j.ijid.2007.04.019](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2007.04.019) PMID: [17698385](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17698385/)
  14. Gall D, Nielsen K. Serological diagnosis of bovine brucellosis. A review of test performance and cost comparison. Rev Sci Tech. 2004; 23(3): 989-1002. PMID: [15861895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15861895/)
  15. Doosti A, Ghasemidehkordi P. Application of real-time PCR for identification and differentiation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in cattle. Bulg j vet med. 2011; 14(2): 109-115.
  16. Ochoi RA, Kwaga JK, Ajogi I, Bale JO. Phenotypic characterization of *Brucella* strains isolated from livestock in Nigeria. Vet Microbiol. 2004; 103(1-2): 47-53. doi: [10.1016/j.vetmic.2004.06.012](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.06.012) PMID: [15381265](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15381265/)
  17. O'Leary S, Sheahan M, Sweeney T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. Res Vet Sci. 2006; 81(2): 170-6. doi: [10.1016/j.rvsc.2005.12.001](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.12.001) PMID: [16545848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16545848/)
  18. Pishva E, Salehi M. First report of isolation of *Brucella melitensis*, Vaccine strain Rev.1 as a source of cattle infection in Iran. J Sci, I R Iran. 2008; 9(1): 19-23. ISSN 1016-1104
  19. Sharma DK, Bhardwaj B, Chouhan HC, Chandel BS, Joseph B, Barolia SK. Isolation and Molecular Characterization of *Brucella melitensis* from Abortion Storms in Sheep with its Zoonotic Implication. Int J Curr Microbiol App Sci. 2018; 7(10): 1348-1356. doi: [10.20546/ijemas.2018.710.150](https://doi.org/10.20546/ijemas.2018.710.150)
  20. Dadar M, Alamian S, Behrozikhah AM, Yazdani F, Kalantari A, Etemadi A, Whatmore AM. Molecular identification of *Brucella species* and biovars associated with animal and human infection in Iran. Vet Res Forum. 2019; 10(4): 315-321. doi: [10.30466/VRF.2018.89680.2171](https://doi.org/10.30466/VRF.2018.89680.2171) PMID: [32206227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32206227/)
  21. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the Brucellosis laboratory. 1st ed. Institute National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris, France; 1998. p. 90.
  22. Ilhan Z, Solmaz H, Aksakal A, Gulhan T, Ekin IH, Boynukara B. Detection of *Brucella melitensis* DNA in the milk of sheep after abortion by PCR assay. Arch Med Vet. 2008; 40: 141-146. doi: [10.4067/S0301-732X2008000200005](https://doi.org/10.4067/S0301-732X2008000200005)
  23. ElTahirY, Al Toobi G, Al-Marzooqi W, Mahgoub O, Jay M, Corde Y, Al Lawati H, Bose Sh, Al Hamrashdi A, Al Kharousi K, Al-Saqri N, Al Busaidi R, Johnson EH. Serological, cultural and molecular evidence of *Brucella melitensis* infection in goats in Al Jabal Al Akhdar, Sultanate of Oman. Vet Med Sci. 2018; 4: 190-205. doi: [10.14202/vetworld.2020.1495-1509](https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1495-1509)
  24. Ghorbani A, Khorasgani MR, Zarkesh-Esfahani H, Sharifyazdi H, Kashani AD, Emami H. Comparison of serology, culture, and PCR for detection of brucellosis in slaughtered camels in Iran. Comp Clin Pathol. 2013; 22: 913-917. doi: [10.1007/s00580-012-1499-1](https://doi.org/10.1007/s00580-012-1499-1)
  25. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. Am J Trop Med Hyg. 1992; 95(4): 271-5. PMID: [1495123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1495123/)
  26. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol. 1994; 32 (11): 2660-6. PMID: [7852552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7852552/). doi: [0095-1137/94/\\$04.00+0](https://doi.org/0095-1137/94/$04.00+0) PMID: [7852552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7852552/)
  27. Dhanashekar R, Akkinapalli S, Nellutla A. Milk borne infection. An analysis of their potential effect on the milk industry. GERMS. 2012; 2(3): 101-109. doi: [10.11599/germs.2012.1020](https://doi.org/10.11599/germs.2012.1020) PMID: [24432270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24432270/)
  28. Shirima GM, Fitzpatrick J, Kunda JS, Mfinanga GS, Kazwala RR, Kambarage DM, Cleaveland S. The role of livestock keeping in human brucellosis trends in livestock keeping communities in Tanzania. Tanzan J Health Res. 2010; 12(3): 203-7. doi: [10.4314/thrb.v12i3.51261](https://doi.org/10.4314/thrb.v12i3.51261)
  29. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet Microbiol. 2002; 90(1-4): 81-110. doi: [10.1016/s0378-1135\(02\)00248-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00248-1) PMID: [12414137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12414137/)
  30. Gupta VK, Deepak kV, Rout PK, Singh SV, Vihan VS. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Brucella melitensis* in goat milk. Small Rumin Res. 2006; 65: 79-84. doi: [10.1016/j.smallrumres.2005.05.024](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.05.024)
  31. Erdenlig S, Sen A. Isolation and biotyping of *Brucella species* from aborted sheep fetuses. Pendik Vet Microbiol Derg. 2000; 31(2): 31-42. doi: [10.3906/vet-0802-30](https://doi.org/10.3906/vet-0802-30)
  32. Ashrafganjooyi SH, Saedadeli N, Alamian S, Khalili M, Shirazi Z. Isolation and biotyping of *Brucella spp.* from sheep and goats raw milk in southeastern Iran. Trop Biomed. 2017; 34(3): 507-511. PMID: [33592918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33592918/)
  33. Behroozikhah AM, Bagheri Nejad R, Amiri K, Bahonar AR. Identification at biovar level of *Brucella* isolates causing abortion in small ruminants of Iran. J Pathog. 2012; 357235. doi: [10.1155/2012/357235](https://doi.org/10.1155/2012/357235)
  34. Nicoletti P. The eradication of brucellosis in animals. Saudi. Med J. 1993; 14: 288-292. doi: [10.1111/j.1471-0307.1967.tb02029.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1967.tb02029.x)
  35. Odontsetseg N, Mweene AS, Kida H. Viral and bacterial diseases in livestock in Mongolia. Jpn J Vet Res. 2005; 52 (4): 151-162. doi: [10.14943/jivr.52.4.151](https://doi.org/10.14943/jivr.52.4.151)
  36. Seric-Haracic S, Salman M, Fejzic N, Cavaljuga S. Brucellosis of ruminants in Bosnia and Herzegovina: disease status, past experiences and initiation of a new surveillance strategy. Bosn J Basic Med Sci. 2008; 8(1): 27-33. doi: [10.17305/bjbm.2008.2991](https://doi.org/10.17305/bjbm.2008.2991) PMID: [18318668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18318668/)
  37. Al-Mariri A, Haj-Mahmoud N. Detection of *Brucella abortus* in bovine milk by Polymerase chain reaction. Acta Vet Brno. 2010; 79(2): 277-80. doi: [10.2754/avb201079020277](https://doi.org/10.2754/avb201079020277)

38. Renukaradhya GJ, Isloor S. Rajasekhar M. Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. Vet Microbiol. 2002; 90: 183–195. doi: [10.1016/s0378-1135\(02\)00253-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00253-5) PMID: [12414143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12414143/)

39. Hamdy ME, Amin AS. Detection of *Brucella species* in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. Vet J. 2002; 163(3): 299-305. doi: [10.1053/tvj.2001.0681](https://doi.org/10.1053/tvj.2001.0681)





## Isolation and Identification of *Brucella Melitensis* Biovar 1 using Bacteriological, Serological, and Molecular Tools from Saanen Goats (*Capra aegagrus hircus*) in Alborz, Iran

Hafez Sadeghi<sup>1</sup>, Iradj Ashrafi Tamai<sup>2</sup>, Mehdi Vodjgani Gharagozlou<sup>1</sup>, Faramarz Gharagozloo<sup>1</sup>, Taghi Zahraei Salehi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

doi [10.22059/jvr.2021.318798.3133](https://doi.org/10.22059/jvr.2021.318798.3133)

Received: 9 March 2022, Accepted: 18 May 2022

### Abstract

**BACKGROUND:** Brucellosis or Malta fever is one of the most prevalent zoonotic diseases considered as a health and economic concern.

**OBJECTIVES:** The current study aimed to employ several methods to detect *Brucella* in blood and milk samples of saanen goat and use a safe and definitive method to diagnose this disease.

**METHODS:** In this study, 122 blood samples and 122 milk samples were collected from saanen goats. After culture and serological-based isolation methods (RBPT, Wright, 2ME, and Ring test), DNA was extracted from all the blood and milk samples. PCR was carried out using B4 and B5 primers on all the extracted DNAs in order to detect the *B. abortus* and *B. melitensis*; PCR was carried out with Br.a and Br.m primers.

**RESULTS:** The results of all the blood samples were negative, but bacterial growth was observed in three milk samples, which was detected in biotyping, biovar 1 melitenensis. The PCR results for detection of *Brucella spp.* of nine blood samples and nine milk samples were positive. Using mPCR primers, *B. melitensis* were identified through all the nine milk and blood samples.

**CONCLUSIONS:** Herein, we found that better bacterial diagnostic system and choosing an appropriate technique for rapid detection, such as PCR and Real Time PCR, in addition to popular awareness and other functions of national veterinary medicine institute could control the diseases and decrease their incidence successfully.

**Keywords:** *Brucella melitensis*, Saanen goat, Brucellosis, Serologic analysis, PCR

Copyright © 2022. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: [Iashrafi@ut.ac.ir](mailto:Iashrafi@ut.ac.ir) Tel/Fax: 021-61117134/021-66933222

### How to cite this article:

Sadeghi H, Ashrafi Tamai I, Vodjgani M, Gharagozlou F, Zahraei Salehi T. Isolation and Identification of *Brucella Melitensis* Biovar 1 using Bacteriological, Serological, and Molecular Tools from Saanen Goats (*Capra aegagrus hircus*) in Alborz, Iran. J Vet Res, 2022; 77(2): 107-115. doi: 10.22059/jvr.2021.318798.3133

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Oligonucleotide primer sequences and PCR conditions.

**Table 2.** Results of the blood samples.

**Table 3.** Results of the milk samples.

**Figure 1.** PCR results for identification of *Brucella spp.*

**Figure 2.** Multiplex PCR results for detection of *B. melitensis* and *abortus*.