مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۲، ۱۴۰۱، ۱۱۵-۱۰۷
مقاله پژوهشی

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

حافظ صادقی[۱]، ایرج اشرافی‌تمای[۲]، مهدی وجگانی[۱]، فرامرز قراگوزلو[۱]، تقی زهرائی‌صالحی[۲]

[۱] *گروه آموزشی مامایی و بیماری‌های تولیدمثل دام، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۲] *گروه میکروبیولوژی ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران*

تاریخ دریافت: ۱۸ اسفند ماه ۱۴۰۰، **تاریخ پذیرش:** ۲۸ اردیبهشت ماه ۱۴۰۱
10.22059/jvr.2021.318798.3133 20.1001.1.20082525.1401.77.2.5.2

چکیده

زمینهٔ 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.

روش‌کار: در مطالعه حاضر مقطعی- توصیفی نمونه‌های خون و شیر از ۱۲۲ بز سانن مربوط به یک دامداری صنعتی بزرگ در استان البرز به‌صورت جداگانه جمع‌آوری‌شد و پس از کشت، آزمون‌های سرولوژی رزبنگال، رایت و ۲مرکاپتواتانول برای نمونه‌های خون و آزمون تست حلقه‌ای شیر برای نمونه‌های شیر انجام گرفت. سپس DNA استخراج‌شده 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 درروش مولکولی، ۹ نمونه (۷/۴ درصد) مثبت مشاهده شد. با استفاده از پرایمرهای گونه به روش مولتی‌پلکس، 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 © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: ایرج اشرافی‌تمای، گروه میکروبیولوژی ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: Iashrafi@ut.ac.ir

مقدمه

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، اویس، نئوتومه، ستی، پینی پیدیالیس و پاپیونیس و ۳ گونه غیر تیپیک: میکروتی، اینوپیناتا و ولپیس طبقه‌بندی‌شده 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

و به داخل شیر منتقل می‌شود و ایجاد بیماری می‌کند (۸-۶). هرچند 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 (۱۱-۹). گونه‌های شایع بروسلا در ایران در درجه اول ملی تنسیس بیووارهای ۱ و ۳ و سپس آبورتوس بیووار ۱ می‌باشد (۱۲). هرچند واکسیناسیون درکشور 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 مستیم 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 (۱۲،۱۳).

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: رزبنگال، 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 (۸،۱۴). از طرف دیگر در آزمون کشت هم که به‌عنوان یک روش استاندارد طلایی معرفی‌شده است دوره انکوباسیون طولانی، داخل سلولی بودن باکتری و عدم جداسازی در موارد مزمن بیماری باعث شده این روش هم حساسیت کمتری داشته باشد هرچند این روش، نیاز به آزمایشگاه‌های با حفاظت بالا را نیز دارد (۱).

استفاده از یک روش مناسب در جهت تشخیص سریع باکتری بروسلا 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 بروسلا در حد گونه شناسایی می‌شود (۱۸-۱۵). هدف از مطالعه حاضر، بررسی وضعیت شیر بزهای سانن ازنظر بروسلا و همچنین پیشنهاد یک روش مطمئن و سریع در شناسایی بروسلا در حد گونه می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری: نمونه‌گیری از ۱۲۲رأس بز سانن یک دامداری بزرگ در استان البرز و در زمستان ۱۳۹۸ باسابقه 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 کارتیه ها 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 بروسلا براث همراه با مکمل رشد با آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌میکسین‌ب (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 ۱۰درصد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس به محیط انتخابی بروسلا آگار انتقال داده شد و به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دی‌اکسید کربن ۱۰درصد نگهداری شد. پرگنه های رشد کرده ازنظر آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، اوره، نیترات، H2S، گلوکز و لاکتوز بررسی شدند (۲۰). بیوتایپینگ کلاسیک طبق روشی که توسط Alton و همکاران در سال ۱۹۹۸ توصیف شده است انجام شد. آنتی سرم‌های اختصاصی A و M و فاژ مرجع بروسلا تفلیس (Tb) تهیه شده از موسسه رازی برای تشخیص و تجزیه‌وتحلیل استفاده گردید. برخی از آزمایش‌های بیوتیپ مانند وابستگی به CO2، تولید H2S، آگلوتیناسیون با آنتی سرم A و M، رشد در محیط حاوی تیونین و فوشین، آگلوتیناسیون توسط آکریفلاوین و لیز توسط فاژهای خاص انجام شد و نتایج با توجه به داده‌های مستند تفسیر شد (۲۲-۲۰).

آزمون سرولوژی: نمونه‌های سرم به روش غربالگری رزبنگال (RBPT) بر روی پلیت (یک قطره سرم و یک قطره آنتی‌ژنA و M) با بررسی ازنظر آگلوتیناسیون انجام گرفت (۲۲). نمونه‌های شیر نیز به روش آزمون حلقه‌ای شیر (MRT) با استفاده از آنتی‌ژن *بروسلا*

آبورتوس تهیه‌شده از موسسه رازی ایران انجام و تفسیر نتایج بر اساس رنگ ایجاد شده در لایه خامه نسبت به لایه زیرین مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون تکمیلی رایت به روش لوله‌ای و بر مبنای شفافیت مایع فوقانی لوله‌ها در مقایسه با لوله شاهد و آگلوتیناسیون ایجادشده قرائت گردید. شفافیت دلیل بر آگلوتیناسیون مثبت و عدم شفافیت نشان‌دهنده‌ی عدم آگلونیناسیون می‌باشد. همچنین آزمایش ۲ مرکاپتواتانول (2ME) به همان روش آگلوتیناسیون رایت لوله ای با بافر 2ME به‌جای سرم فیزیولوژی برای نمونه‌های مثبت و مشکوک سرم ها انجام گرفت و نتایج ثبت گردید (۲۴-۲۱،۱۴).

استخراج DNA از نمونه‌های شیر و خون: نمونه‌های شیر را به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ کرده که سه لایه تشکیل می‌شود. جهت آزمون PCR قسمت رویی که همان چربی و قسمت زیرین که رسوبات شیر هست مورد نیاز می‌باشد. بنابراین قسمت میانی به کمک سمپلر خارج شد (۳۹،۲۲،۱۷،۲). برای استخراج DNA در نمونه‌های شیر و خون، از کیت استخراج DNA شرکت انتقال سامانه‌های زیست مولکولی (MBST) ساخت ایران استفاده گردید و DNA استخراج شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمون PCR برای تشخیص جنس و گونه‌ی بروسلا: مسترمیکس این آزمون از شرکت ویراژن (آمپلیکون، دانمارک) به‌صورت آماده تهیه شد. آزمون در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتری و با استفاده از ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس آماده، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۳ میکرولیتر از DNA و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر، آماده گردید (۲۶،۲۵). پرایمرها و مراحل PCR در جدول ۱ نشان داده شده است. از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی و از سویه‌های مثبت *بروسلا ملی تنسیس* (Strain 16M) و *بروسلا آبورتوس* (Strain 544) تهیه‌شده از کلکسیون میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مراحل PCR در دستگاه ترموسیکلر TC- 512 (Techne- England) انجام گردید. برای قرائت نتایج PCR، ژل آگارز دو درصد با ولتاژ ۹۰ به مدت ۷۰ دقیقه در بافر TBE 1X الکتروفورز شد. از مارکر ۱۰۰ جفت باز (سیناکلون Cat. No. (PR901644) (SL7031 هم‌جهت تأیید اندازه باندهای اختصاصی استفاده شد. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (MR7721C) با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، به‌صورت باند فلورسنت در دستگاه ترانس ایلومیناتور (بیورد، آلمان) مشاهده و ذخیره گردید. جهت تأیید نهایی یکی از موارد مثبت تعیین توالی شده و در بانک ژنی ثبت گردید.

نتایج

نتایج کشت: محیط‌های انتخابی بروسلا آگار، پس از یک هفته موردبررسی قرار گرفتند. تمام نمونه‌های خون ازنظر کشت منفی بودند اما در سه نمونه از شیر، پرگنه های خاکستری‌رنگ بدون همولیز در محیط بلاد آگار مشاهده شد ولی محیط مک کانکی ازنظر رشد منفی بود. در نتایج بیوشیمیایی آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، احیاء نیترات، و هیدرولیز اوره مثبت مشاهده شد. رشد باکتری در محیط‌های حاوی رنگ فوشین و تیونین بدون نیاز به گاز CO2، عدم تولید گاز H2S در محیط TSI، فاژ Tb منفی و آگلوتیناسیون مثبت با آنتی سرم M بیووار ۱ *بروسلا ملی تنسیس*، تشخیص داده شد.

نتایج آزمون‌های سرولوژی: از ۱۲۲ سرم جداسازی شده برای آزمون غربالگری رزبنگال، شش نمونه با آگلوتیناسیون شدت بالا (+۴) و دو نمونه با آگلوتیناسیون شدت کمتر (+۲) و یک مورد هم مشکوک مشاهده شد. در آزمون حلقه‌ای شیر، در ۱۲ نمونه شیر، حلقه بنفش رنگ در بالای لوله‌های آزمایش تشکیل شد. در آزمون رایت لوله‌ای نیز دو نمونه با تیتر ۱/۱۲۸۰، چهار نمونه با تیتر ۱/۶۴۰، دو نمونه با تیتر ۱/۳۲۰ و یک نمونه هم با تیتر ۱/۸۰ مشاهده شد. در آزمون 2ME هم دو نمونه با تیتر ۱/۶۴۰، پنج نمونه با تیتر ۱/۳۲۰، یک نمونه با تیتر ۱/۱۶۰ و یک نمونه هم با تیتر ۱/۸۰ گزارش گردید. نتایج کلی در جدول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول ۱. برنامه زمانی و دمایی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر (۴،۶).

نام پرایمر	توالی	وزن مولکولی	منابع
B4 B5	F: TGGCTCGGTTGCCAATATCAA R: CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG	۲۲۳bp	۲۵
Br.a	F: GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC R: TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	۴۹۸bp	۲۶
Br.m	F: AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA R: TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	۷۳۱bp	۲۶

[1] 94 °C (5 m); 39 cycles; 94 °C (60 s); 58 °C (45 s); 72 °C (60 s); 72 °C (10 m)
[2] 94 °C (5 m); 34 cycles; 94 °C (60 s); 56 °C (45 s); 72 °C (60 s); 72 °C (2 m).

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

نمونه	کشت	رزبنگال	رایت	۲مرکاپتواتانول	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	+

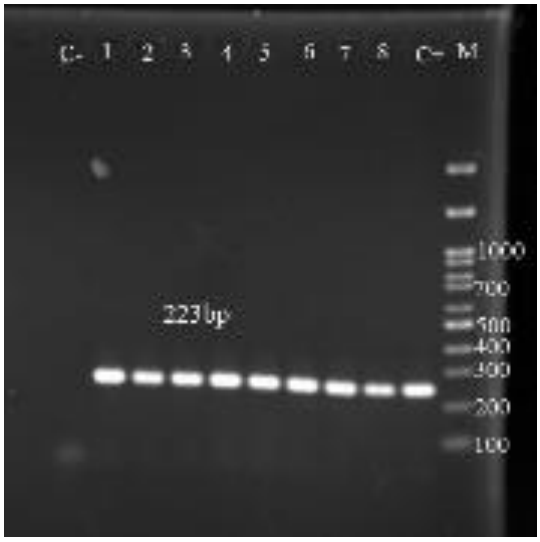
جدول ۳. نتایج آزمون‌های مورد استفاده برای تشخیص بروسلا از نمونه‌های شیر بزهای سانن.

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

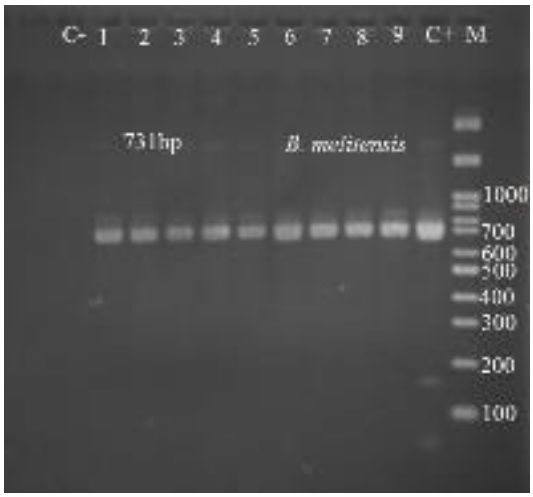
نتایج آزمون PCR: نتایج به‌دست‌آمده از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای B4 و B5 نشان داد که از ۱۲۲ نمونه شیر بزهای سانن، ۹ نمونه (۷/۴ درصد) واجد باند ۲۲۳bp بوده که نشان‌دهنده جنس بروسلا می‌باشد که در نمونه‌های خون هم همین ۹ نمونه، مثبت مشاهده شد (تصویر ۱). در آزمون دوگانه PCR هم هر ۹ نمونه مثبت واجد باند ۷۳۱bp بودند که نشان‌دهنده *بروسلا ملی تنسیس* می‌باشند (تصویر ۲). هیچ‌کدام از نمونه‌ها باند ۴۹۸bp را نشان ندادند. نتیجه تعیین توالی یکی از نمونه‌ها، در جهت تأیید نهایی *بروسلا ملی تنسیس* بود که این نمونه در بانک ژنی با کدMT355497 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 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، سقط‌جنین 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 ازنظر 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 بروسلا ملی تنسیس و آبورتوس.

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 دی فازیک 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 سواپ واژن و محتویات جنینی در نمونه‌های بز و گوسفند، فقط سه نمونه در محیط کشت جداسازی شده بود که دو نمونه مربوط به سواپ 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 (۷/۸درصد) 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 ارگانیسم 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 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 *یرسینیا انتروکولیتیکا*، *سالمونلا*، *کمپیلوباکتر فتوس*، *ویبریو کلرا* و *بردتلا برونشیسپتیکا* باعث ایجاد آگلوتیناسیون و جواب مثبت کاذب می شوند (۱۴،۲۲). در مواردی هم مانند اوایل بیماری، زمان زایمان، فرم مزمن بیماری، نقص ایمنی‌ها، آنتی بیوتیک تراپی‌ها و عدم شناسایی برخی از آنتی بادی‌ها 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 (۳۶-۳۴).

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 ElTahir 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

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 حلقه‌ای شیر، از نظر باکتری بروسلا 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). Renukaradhya 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 مفیدبرای 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 بروسلا در گونه‌های غیراختصاصی میزبانی نیز وجود دارد. در برخی از دامداری‌ها که گاو، گوسفند و بز به صورت یک‌جا نگهداری می شوند احتمال آلودگی گاو، گوسفند و بز با گونه‌های غیراختصاصی 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 بروسلا شناسایی شده که با روش مولکولی، دو مورد آن *بروسلا ملی تنسیس* واکسن Rev1 تشخیص داده شده بود (۱۸). در مطالعه Dadar و همکاران در سال ۲۰۱۸ به روش RFLP-PCR علاوه بر تشخیص بروسلا، 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.

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. 7th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, USA; 2009.
5. Whatmore AM, Davison N, Cloeckaert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, Perrett ll, 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 PMID: 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, Esmaiel 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.*** 2nd 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 PMID: 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 PMID: 16439329
11. Ramin B, MacPherson P. Human brucellosis. BMJ. 2010; 341. doi: 10.1136/bmj.c4545 PMID: 26221498
12. Makarem E, Karjoo R, Omidi A. Frequency of *Brucella melitensis* in southern Iran. J trop pediatr. 1982; 28: 97. doi: 10.1093/tropej/28.2.97 PMID: 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 PMID: 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
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. Ocholi 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 PMID: 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 PMID: 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/ijcmas.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 PMID: 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
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
24. Ghorbani A. Khorasgani MR. Zarkesh-Esfahani H. Sharifiyazdi 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
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
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. doi: 0095-1137/94/$04.00+0 PMID: 7852552
27. Dhanashekar R, Akkinepalli 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 PMID: 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
29. Refai M. Incidence and control of brucellosisin the Near East region. Vet Microbiol. 2002; 90(1-4): 81-110. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00248-1 PMID: 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
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
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
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
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
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/jjvr.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/bjbms.2008.2991 PMID: 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

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 PMID: 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/tvjl.2001.0681

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 2, 2022
Original Article

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[1], Iradj Ashrafi Tamai[2], Mehdi Vodjgani Gharagozlou[1], Faramarz Gharagozloo[1], Taghi Zahraei Salehi[2]

[1] *Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

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*, Sannen goat, Brucellosis, Serologic analysis, PCR

Copyright © 2020. 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 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.*
Firure 2. Multiplex PCR results for detection of *B. melitensis* and *abortus.*