Archive of SID

شماره ۱۱۶ پاییز ۱۳۹۶
DOI: 10.22092/vj.2017.109888
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی فراوانی *بروسلا آبورتوس* در گاوهای هلشتاین شمال غرب ایران با استفاده از روش‌های سرولوژی و PCR

• **علی سلیمان زاده (نویسنده مسئول)**
گروه مامایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• **قادر جلیل زاده امین**
گروه بیماری‌های درونی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• **علی وقار**
دانش آموخته دکتری دامپزشکی، گروه مامایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۷-۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۹-۱۷
Email: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

چکیده

بروسلوزیس یک بیماری مشترک با گسترش جهانی است که سبب سقط‌جنین و کاهش باروری در گاو می‌شود. بروسلوزیس همواره در ایران بروز بالایی دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع آلودگی به *بروسلا آبورتوس* در گاوهای هلشتاین شمال غرب ایران با استفاده از روش‌های سرولوژی و PCR بود. در این مطالعه نمونه خون از ۱۶۹۲ راس از گاوهای شیری استان‌های آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی و اردبیل (شمال غرب ایران) جمع‌آوری و سرم آن‌ها توسط سانتریفیوژ جدا گردید. نمونه‌های سرمی برای انجام آزمایش رزبنگال (RBT)، آزمایش ME-2 و روش PCR مورد استفاده قرار گرفت. از تعداد ۱۶۹۲ نمونه جمع آوری شده، ۱۴/۶۵ درصد آزمایش رزبنگال، ۱۳/۲۳ درصد آزمایش ME-2 و ۲۱/۹۸ درصد در آزمایش PCR مثبت بودند. این‌طور می‌توان نتیجه گرفت که شیوع بیماری بروسلوز در گاوهای شیری این منطقه پایین بوده و از بین تمام تست‌های کمک تشخیصی، روش‌های مولکولی نظیر PCR برای تشخیص سویه‌های بروسلا در گاوهایی که در معرض سقط‌جنین هستند استفاده شود.

کلمات کلیدی: *بروسلا آبورتوس*، سرولوژی، PCR، گاو

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 85-91

Prevalence of ***Brucella abortus*** in Holstein dairy cows in north west of Iran by using serological and PCR assays

By: Soleimanzadeh, A., (Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Jalilzadeh-Amin, Gh., Assistant Professor, Department of Internal Medicine and Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. and Vaghar, A., DVM graduate, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: 2016-10-18 Accepted: 2016-12-07

Email: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

Bovine brucellosis is a zoonotic disease distributed worldwide and characterized by abortion and reduced fertility in cows. The aim of this study was to determine prevalence of *Brucella abortus* in Holstein dairy cows in north west of Iran by using serological and PCR assays. In this study, blood samples were drawn from 1692 cows at the dairy farms of west Azerbaijan, east Azerbaijan and Ardabil provinces (North-West of Iran) and their sera separated by centrifugation. The serum samples were analyzed by Rose Bengal Test (RBT), 2-ME and multiplex PCR assays. From 1692 samples collected, 14.65% showed positive RBT and 13.23% showed positive 2-ME and 21.98% showed a positive reaction to the PCR test. In conclusion, all serological and particularly PCR tests are recommended for diagnosis of Brucella strains in cows subjected to abortion. It was concluded from the results that prevalence of brucellosis in cattle was low in this region.

Key words: *Brucella abortus*, Serological, PCR, cow

مقدمه

بروسلوز یکی از بیماری‌های مهم عفونی و مشترک بین انسان و دام است که در اثر آلودگی با باکتری‌های جنس بروسلا به‌وجود می‌آید. این بیماری سلامت عمومی و بهداشت دامی در بسیاری از کشورها از جمله ایران را به خطر انداخته است (۱۴). هر کدام از گونه‌های بروسلا در میزبان خاصی بیماری‌زایی بیشتری دارند و با وجودی که بروسلا برای میزبان خود اختصاصی است، ولی این ویژگی خصوصا در مواردی‌که دام‌های اهلی مختلف در ارتباط نزدیک با یکدیگر نگهداری شوند، قطعی نخواهد بود. بنابراین شناسایی دقیق گونه‌های بروسلا جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی در انسان و حیوانات اهلی، به منظور بکارگیری راه‌های کنترلی مناسب، اهمیت پیدا می‌کند (۱۸). تعیین میزان شیوع بیماری بروسلوز بدلیل عدم گزارش کامل موارد بیماری مشکل است ولی با وجود سیستم مراقبت، گزارشات جاری می‌تواند مبین روند میزان بروز واقعی بیماری باشد (۴).

جنس بروسلا، براساس تفاوت آنتی‌ژنیک، میزبان اصلی، کشت باکتری در محیط‌ها و شرایط فیزیکی و شیمیایی مختلف، واکنش با آنتی‌سرم‌های اختصاصی و تشابه DNA به انواع مختلف تقسیم می‌گردند که عبارتند از *بروسلا آبورتوس* (در گاو)، *بروسلا ملی تنسیس* (در گوسفند و بز)، *بروسلا سوئیس* (درخوک)، *بروسلا کنیس* (در سگ)، *بروسلا اویس* (در قوچ‌ها)، *بروسلا نئوتومه* (در موش صحرایی) و *بروسلا ماریس* (در پستانداران). در *بروسلا آبورتوس* هفت بیووار، در *بروسلا ملی تنسیس* سه بیووار، در *بروسلا سوئیس* پنج بیووار شناسایی شده و در گونه‌های دیگر تاکنون هیچ بیوواری شناسایی نشده است (۱۵، ۲۲). بروسلوزیس سبب سقط‌جنین، جفت‌ماندگی، اختلال باوري، کاهش تولید شیر در میزبان اصلي مي‌شود. مبارزه با این بیماري و کنترل و ریشه کني آن به دلیل کثرت گونه‌اي عوامل بیماریزا، حیوانات میزبان، دوام نسبتاً قابل توجه باکتري در محیط، عدم کفایت برنامه‌ریزي و واکسیناسیون براي ریشه کني بیماري و لزوم هزینه شدن سرمایه سنگین اقتصادي در بسیاري از کشورهاي جهان با دشواریها و مشکلات عمده‌اي مواجه است (۲). روش‌های سرولوژیک تشخیص بروسلوز شامل آزمایش‌های رزبنگال (RBT) سروآگلوتیناسیون، رایت، ۲-مرکاپتواتانول (۲-ME)، ثبوت عناصر مکمل(CFT) و آنتی‌گلوبولین کومبس صورت می‌گیرد. معمولاً آزمایش‌های رزبنگال و رایت به‌جهت آنکه هر دو ایمنوگلوبولین G و M در آن‌ها دخالت دارند زودتر از دیگر آزمایش‌ها واکنش نشان می‌دهند. آنتی‌ژن‌های بروسلا، آنتی‌ژن‌های A و M هستند که به لیپوپلی‌ساکارید دیواره سلول باکتری مربوط می‌باشد (۳). از جمله مشکلات موجود در انجام این آزمایش‌ها می‌توان به این موارد اشاره کرد که: این آزمایشات وقت گیر بوده و فاقد حساسیت لازم در تشخیص موارد مزمن می‌باشد و حساسیت این نتایج در مواردی که هدف شناسایی گونه‌های *بروسلا آبورتوس* باشد، کاهش می‌یابد (۲۲). همچنین، آزمایش‌های سرولوژیکی به‌دلیل حضور موارد منفی کاذب حاصل از آنتی‌بادی‌های بلوکان و حضور موارد مثبت کاذب به‌دلیل تشابه آنتی‌ژنی با دیگر باکتری‌های گرم‌منفی (*یرسینیا آنتروکولیتیکا*، *سالمونلا اوربانا* و

www.SID.ir

Archive of SID

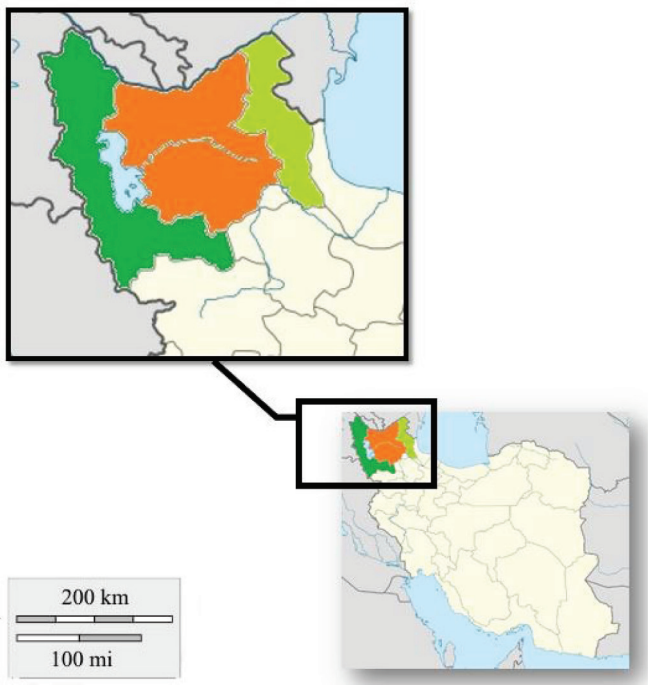
ویبریو کلرا) از حساسیت و اختصاصیت کافی برخوردار نمی‌باشند و به‌تنهایی قادر به‌تشخیص مرحله حاد و مزمن بیماری نیستند (۲۲). امروزه یکی از به روزترین روش‌ها استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) می‌باشد که روشی است، سریع و دقیق که حساس‌تر از روش کشت بوده و دارای اختصاصیت بیشتری نسبت به تست‌های سرولوژیکی برای تشخیص بروسلوز می‌باشد (۱۸). تکنیک PCR برای تشخیص بروسلا بطور فراوان مورد استفاده قرار گرفته است (۲، ۲۱).

بروسلوز بیماري مشترك انسان و دام است که ضررهاي اقتصادي زيادي به بار مي‌آورد و به عنوان يكي از معضلات مهم بهداشتي محسوب مي‌شود (۶). بروسلوز مشکل مهمی در کشورهای ناحیه مدیترانه، غرب آسیا و بخش‌هایی از آفریقا و آمریکای لاتین است (۱۵). از آنجایی که در مناطق تحت بررسی این خطر بالقوه وجود دارد که بروسلوز باعث بروز سقط و مشکلات باروری در گاوها بشود، بنابراین هدف مطالعه حاضر تعیین فراوانی آلودگی *بروسلا آبورتوس* در گاوهای شیری در سطح سه استان شمال‌غرب ایران از طریق روشهای سرولوژیک و PCR می‌باشد.

مواد و روش کار

این مطالعه در گاوهای منطقه شمال‌غرب کشور (شهرستان‌های استان آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی و اردبیل) صورت گرفت (شکل ۱). از اردیبهشت ماه ۱۳۹۴ تا اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۵، تعداد ۱۶۹۲ نمونه خون به صورت کاملا تصادفي از گاوهای شهرستان‌های واقع در استان‌های آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی و اردبیل (۶۵۶ گاو در استان آذربایجان غربی، ۵۴۸ گاو استان اردبیل و ۴۸۸ گاو استان آذربایجان شرقی) جمع‌آوري گرديد.

با استفاده از لوله‌های ونوجکت، نمونه خون از ورید وداج هر حیوان اخذ شد و در دو لوله آزمایش بطور مجزا ریخته شد (یک لوله آزمایش همراه با هپارین جهت PCR و لوله دیگر بدون هپارین برای جداسازی سرم جهت آزمایشات سرولوژیک) و بلافاصله بعد از اخذ سرم براي ادامه آزمایشات مولكولي و سرولوژیکی نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی منتقل گردید. در آزمایشگاه تست‌های سرولوژی رزبنگال و ۲-مرکاپتواتانول انجام شد و جهت انجام تست PCR نمونه‌ها در ۲۰- درجه تا زمان آزمایش نگهداری شدند. برای انجام تستهای سرولوژی، پس از لخته‌شدن خون، لوله‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت پنج دقیقه قرار داده شد تا سرم آن جدا شود. آزمایش رزبنگال به عنوان آزمون سریع اولیه تشخیصی، بر روی تمام نمونه‌های سرمی انجام گردید. آنتی‌ژن رزبنگال مورد استفاده در همه نمونه‌ها محصول موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی حاوی هشت درصد جرم میکروبی بروسلا بود که به مقدار هم حجم سرم در یک میکروپلیت به مدت چهار دقیقه تکان داده شد و مواردی که دانه‌های آگلوتینه به طور مشخص در آن‌ها دیده شد، مثبت گرفته شد (۱۶). در ادامه جهت



شکل ۱- منطقه مورد مطالعه در این بررسی (www.maps.com)

www.SID.ir

Archive of SID

تشخیص نوع پادتن و تعیین حالت فعال و یا غیرفعال بیماری، بر روی تمامی سرم‌های اخذشده آزمایش تکمیلی ۲-مرکاپتواتانول انجام شد (۱۶). در این آزمایش می‌بایست قبل از تهیه رقت، پس از ریختن سرم فیزیولوژی و سرم مشکوک و ۰/۲ مولکول گرم در لیتر مرکاپتواتانول (۰/۶۸ میلي‌لیتر مرکاپتواتانول در ۵۰ میلي لیتر آب مقطر) به لوله اول، لوله‌ها به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از زمان مذکور، رقت‌های ۱/۱۰ تا ۱/۳۲۰ از سرم‌ها بدین صورت تهیه شد که از محتوي لوله اول ۰/۵ میلي لیتر به لوله دوم و پس از مخلوط کردن از لوله دوم ۰/۵ میلي‌لیتر به لوله سوم انتقال داده شد، این عمل را تا لوله ماقبل آخر ادامه داده و از این لوله ۰/۵ میلي لیتر دور ریخته شد (لوله آخر به‌عنوان کنترل بود که فقط حاوي سرم فیزیولوژي و آنتي‌ژن بود). سپس مجددا رقت‌های تهیه شده به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نتیجه آزمایش براساس شفافیت مایع‌رویی در آخرین رقت دارای آگلوتیناسیون، قرائت گردید (۴). در تفسیر نتایج آزمایش، آنهایی که عیار ۲-مرکاپتواتانول آن‌ها ۱/۴۰ و بیشتر بود، به عنوان دام حامل تفسیر شدند (۱۶).

روش PCR

به منظور تأیید تشخیص آزمایشات سرولوژیکی، از روش PCR استفاده گردید. استخراج DNA توسط کیت سیناکلون (DNP TM Kit) با شماره کاتالوگ DN۸۱۱۵C انجام گردید. در ادامه برای انجام PCR پرایمرهای JPR براساس مقاله Leal-Klevezas و همکاران (۱۱) از شرکت سینا ژن سفارش داده و ساخته شد.

Forward: 5' GCG CTC AGG CTG CCG ACG CAA 3'

Reverse: 5' ACC AGC CAT TGC GGT CGG TA 3'

برای انجام PCR در کل حجم ۲۵µl به قرار زیر تهیه شد: ۲۰۰ ng از DNA هر نمونه، ۵۰ pmol از هر پرایمر، ۵۰ mM از KCL، ۱۰ mM از Tris-HCL، ۰/۱ درصد از Triton X-۱۰۰، ۳ mM از MgCl۲، ۲۰۰ µM از dNTPs و ۲/۵ واحد از Taq polymerase (شرکت SinaClon، کشور ایران) و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (شرکت Eppendorf ، کشور آلمان) انجام گرفت. براي هر مرحله يك كنترل منفي و يك كنترل مثبت هم تهیه گردید. آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد و برای کنترل مثبت نمونه مثبت بروسلا از آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شد. سپس میکروتیوب‌هاي مخصوص PCR حدوداً ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شده تا اگر محلول در دیواره لوله باشد در ته لوله جمع شود و به دستگاه PCR منتقل شد. تکثیرقطعه ژنی مورد نظر طبق الگوی دمایی زیر انجام شد. به این صورت که ابتدا یک چرخه‌ی واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتي‌گراد به مدت هفت دقیقه، ۳۰ چرخه که هر سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتي‌گراد برای واسرشت سازی، ۶۰ ثانیه در ۶۴ درجه سانتي‌گراد برای مرحله اتصال پرایمرها و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتي‌گراد برای توسعه یافتن. توسعه نهایی به مدت شش دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید تا عمل پلیمریزاسیون تکمیل شود، و در نهایت از ژل آگارز ۱/۵ درصد درالکتروفورزیس محصول نهایی PCR استفاده شد و بعد با تابش اشعه ماوراء بنفش در دستگاه ژل داک (شرکت میهن‌آزما، کشور ایران) قطعات DNA مشخص‌گردید که مقایسه باندهاي موجود در مارکر، اندازه قطعه‌های مورد انتظار ۱۹۳ جفت باز رؤیت شد(۱۱).

آنالیز آماری

داده‌هاي حاصل از نمونه‌هاي مورد مطالعه، با کمک برنامه آماري SPSS نسخه ۱۸ تحت ویندوز (Inc., Chicago, IL, USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و روش آماری ANOVA و Chi-Square برای آنالیز داده‌ها استفاده گردید و سطح معني‌دار، P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

میزان شیوع آلودگی به *بروسلا آبورتوس* بر اساس محل اخذ نمونه‌گیری: نمونه‌گیری بصورت کاملا تصادفی از شهرستان‌های سه استان در شمال غرب ایران صورت گرفت که از ۱۶۹۲ نمونه اخذ شده، ۶۵۶ نمونه از گاوهای شهرستان‌های استان آذربایجان غربی، ۵۴۸ نمونه از شهرستان‌های استان اردبیل و ۴۸۸ نمونه از شهرستان‌های استان آذربایجان شرقی اخذ گردید (جدول ۱).

نتایج حاصل از تست رزبنگال

با انجام آزمایش رزبنگال بر روی ۱۶۹۲ سرم خون اخذ شده از گاوها،

جدول ۱- میزان شیوع آلودگی به بروسلا آبورتوس بر پایه محل اخذ نمونه‌گیری

استان	تعداد کل نمونه‌ها	شیوع با تست رزبنگال (٪)	شیوع با تست ۲-Me (٪)	شیوع با تست PCR (٪)
آذربایجان غربی	۶۵۶	۱۵/۲۴ a	۱۴/۰۲ a	۲۱/۳۴ b
اردبیل	۵۴۸	۱۳/۸۶ a	۱۳/۱۳ a	۱۸/۹۷b
آذربایجان شرقی	۴۸۸	۱۴/۷۵ a	۱۲/۲۹ a	۱۸/۰۳ b

حروف مختلف نشانگر اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین داده ها در یک ردیف می‌باشد

www.SID.ir

Archive of SID

تعداد ۲۴۸ نمونه (۱۴/۶۵ درصد) مثبت گردید (جدول ۲). بعد از بررسی سرم خون گاوها، در استان‌های مختلف درصد شیوع نمونه‌های مثبت در استان‌های آذربایجان غربی، اردبیل و آذربایجان شرقی به ترتیب ۱۵/۲۴ درصد، ۱۳/۸۶ درصد و ۱۴/۷۵ درصد بود که بین آنها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید($P > ۰/۰۵$)، که این مسئله نشان می دهد که این سه استان از لحاظ شیوع بیماری بروسلوز وضعیت مشابهی دارند (جدول ۱).

نتایج بررسی توسط تست ME-۲

در این مطالعه در تست ME-۲ تیتر ۱/۴۰ به بالا مثبت در نظر گرفته شد. بعد از تهیه رقت‌های مختلف از تعداد کل نمونه‌های سرم اخذ شده تعداد ۲۲۴ نمونه (۱۳/۲۳ درصد) از آن‌ها با تیتر ۱/۴۰ به بالا مثبت بودند (جدول ۲). این تعداد نسبت به بررسی از طریق تست رزبنگال کمتر بوده که شاید نشان از حساس‌تر بودن این تست نسبت به رزبنگال دارد و این نکته را نشان می‌دهد که احتمال مثبت کاذب در تست رزبنگال وجود دارد، اما بطور کلی براساس نتایج بدست آمده این اختلاف معنی‌دار نبود ($P > ۰/۰۵$). در این بررسی تست ME-۲ در سه استان مشخص کرد که میزان شیوع آلودگی به *بروسلا آبورتوس* در این ۳ استان با هم اختلاف معنی‌داری ($P > ۰/۰۵$) ندارند (جدول ۱).

نتایج حاصل از آزمایش PCR به منظور تشخیص بروسلا

DNA با موفقیت از تمامی نمونه‌های مثبت جداسازی شد. هنگامی که در PCR مورد استفاده قرار گرفتند با ایجاد باند ۱۹۳ bp آلودگی با بروسلا مشخص گردید (شکل ۲). با انجام آزمایش PCR بر روی ۱۶۹۲ نمونه خون اخذ شده از سه استان مورد مطالعه، مشخص گردید که حساسیت آزمون PCR نسبت به دو تست قبلی بطور معنی‌داری بالاتر می‌باشد ($P < ۰/۰۵$). نتایج حاصله نشان داد که از مجموع تعداد کل نمونه‌ها میزان شیوع آلودگی به *بروسلا آبورتوس* ۲۱/۹۸ درصد می‌باشد (جدول۲). همانطور که در تست‌های قبلی سه استان مدنظر اشاره گردید (جدول ۱) استان آذربایجان غربی با ۲۱/۳۴ درصد، استان اردبیل با ۱۸/۹۷ درصد و استان آذربایجان شرقی با ۱۸/۰۳ درصد از لحاظ میزان شیوع آلودگی اختلاف معنی‌داری با هم نشان ندادند ($P > ۰/۰۵$).

بحث

بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های تولیدمثل نشخوارکنندگان است (۲۳). بروسلوز می‌تواند سبب سقط‌جنین شود، که تاثیر بسیار منفی بر بازده تولیدمثلی دارد و درنتیجه زیان اقتصادی قابل توجهی بر صنعت دامپروری وارد می‌نماید (۲۰). به‌دلیل اهمیت بهداشتی بروسلوزیس بین انسان و دام، بررسی‌های زیادی در این خصوص صورت گرفته است. در حال حاضر کنترل این بیماری در بسیاری از کشورهای منطقه براساس تست‌های سرولوژی و نظارت بر حیوانات و به‌دنبال آن شناسایی و کشتار حیوان مثبت و واکسیناسیون تلیسه با دوز کامل یا کاهش یافته *بروسلا آبورتوس* می‌باشد که براساس نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده شد که اگر در کنار تست‌های سرولوژی از تست‌های مولکولی (PCR) استفاده شود شناسایی و ریشه‌کنی بهتری می‌تواند صورت بگیرد (۱۹). از سوی دیگر Ilhan و همکاران (۱۰) بر اهمیت استفاده از بیش از یک نوع روش تشخیصی برای تشخیص حیوانات مثبت بروسلوز به‌خصوص با اهداف اپیدمیولوژیک، تاکید کرده‌اند.

روش‌های سرولوژی، یک روش استاندارد برای نظارت اپیدمیولوژیک بروسلوز است (۱۲). نتایج حاصل از این بررسی نیز نشان داد بعد از بررسی آزمون رزبنگال ۱۴/۶۵ درصد و نتایج حاصل از آزمایش ME-۲ ۱۳/۲۳ درصد از کل نمونه‌های گاوها مثبت بودند، علت تفاوت نتایج بین رزبنگال و ۲-مرکاپتواتانول را می‌توان بدین صورت توجیه نمود که، آزمایش رزبنگال جز آزمایش‌های آگلوتیناسیون بر روی لام بوده که ساده، سریع و قابل اطمینان است و به‌عنوان غربالگری در سطح گله استفاده می‌شوند و معمولا واکنش‌های منفی کاذب در اوایل دوره کمون بیماری و بلافاصله بعد از سقط جنین مشاهده می‌شود (۸). همچنین در این بررسی نشان داده شد که در استان‌های مختلف درصد شیوع نمونه‌های مثبت آزمون رزبنگال، در استان‌های آذربایجان غربی، اردبیل و آذربایجان شرقی به ترتیب ۱۵/۲۴ درصد، ۱۳/۸۶ درصد و ۱۴/۷۵ درصد بود. همچنین میزان شیوع بروسلا توسط تست ME-۲در سه استان آذربایجان غربی، اردبیل و آذربایجان شرقی به ترتیب ۲۱/۳۴ درصد، ۱۸/۹۷ درصد و ۱۸/۰۳ درصد بود. در بررسی سرواپیدمیولوژیکی دیگر، اکبر مهر و قیامی راد (۱) که در شهرستان سراب انجام دادند میزان شیوع

جدول ۲- میزان شیوع آلودگی به *بروسلا آبورتوس* بر پایه تست‌های رزبنگال، 2-ME و PCR

تست مورد ارزیابی	تعداد کل نمونه‌ها	نمونه‌های مثبت	میزان شیوع (٪)
رزبنگال	۱۶۹۲	۲۴۸a	۱۴/۶۵
ME-۲	۱۶۹۲	۲۲۴a	۱۳/۲۳
PCR	۱۶۹۲	۳۷۲b	۲۱/۹۸

حروف مختلف نشانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین داده ها در یک ستون می‌باشد

www.SID.ir

Archive of SID

بروسلوزیس را در گاوهای نر ۱/۵۳ درصد و در گاوهای ماده ۳/۹۲ درصد نشان دادند. بر اساس مطالعه سرواپیدمیولوژیکی دیگر که در شهرستان خوی در استان آذربایجان غربی صورت گرفته است نشان داده شد که، میزان بروسلوزیس در گاو به میزان ۳۹۱ در ۱۰۰ هزار و در گوسفند و بز ۱۰۵ در ۱۰۰ هزار بود و همچنین نشان دادند که در بین شیوع آلودگی گاو وگوسفند همبستگی مثبت وجود داشت ($p < ۰/۰۵$). در بررسی سرواپیدمیولوژیکی که در شهرستان ارومیه بر روی ۳۳۸ نمونه شیر صورت گرفته است میزان شیوع *بروسلا آبورتوس* در فصل بهار ۱/۲۲ درصد و در فصل پاییز ۱/۱۷ درصد بوده است (۱۳). همچنین در مطالعه‌ای قلی‌زاده و همکاران (۷) در ارومیه نشان دادند که از ۱۱۱۷ نمونه شیر گاو ۱/۵۵ درصد از شیرهای جمع‌آوری شده در فصل بهار، ۲/۴۲ درصد از شیرهای فصل تابستان و ۰/۶۴ درصد از شیرهای جمع‌آوری شده در فصل پاییز به *بروسلا آبورتوس* آلوده هستند.

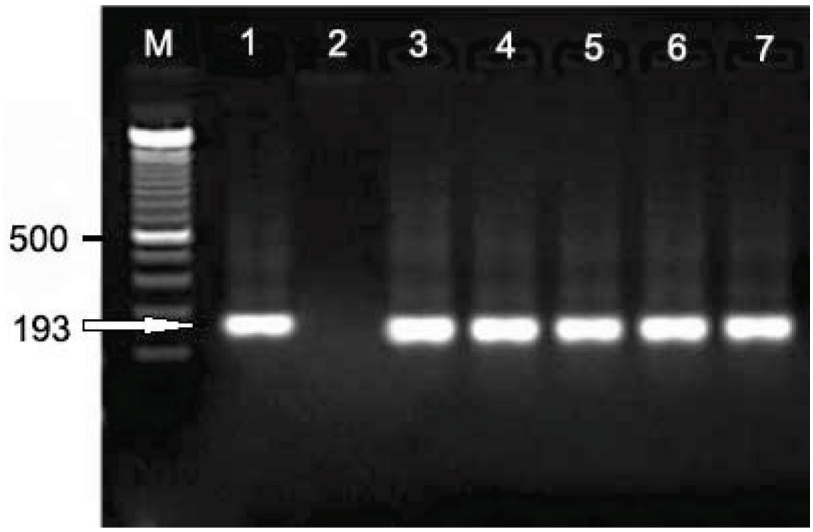
جداسازی باکتری با PCR بسیار کاربردی و قابل اعتمادتر است همچنین از سوی دیگر، تشخیص سریع و تمایز از گونه‌های مختلف باکتری، به ویژه آن‌هایی که رشد آهسته دارند، با استفاده از روش PCR امکان‌پذیر است. بنابراین، مطالعات فراوانی برای تشخیص *بروسلا آبورتوس* از طریق ترکیبی PCR طراحی شده است (۳، ۲۱). نتایج بررسی PCR در این مطالعه نشان داد که میزان شیوع آلودگی در این نمونه‌ها ۲۱/۹۸ درصد است. همچنین نشان داده شد که میزان شیوع در استان آذربایجان غربی ۲۱/۳۴ درصد، در استان اردبیل ۱۸/۹۷ درصد و در استان آذربایجان شرقی ۱۸/۰۳ درصد بود. این بررسی نشان داد، همانند مطالعات دیگر PCR یک روش حساس و مناسب برای تشخیص بروسلا می‌باشد (۲، ۹). در مطالعه‌ای، زمانیان و همکاران (۲۴) گزارش دادند که از تعداد ۳۰ نمونه خونی ۷۰ درصد آن‌ها توسط آزمون PCR به آلودگی با *بروسلا آبورتوس* مثبت هستند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر، دوستی و قاسمی دهکردی (۵) در بررسی که در جنوب غربی ایران با استفاده از روش‌های PCR و Real-time PCR انجام دادند، نشان دادند که از ۴۲۵ نمونه خونی، ۲۹/۸۸ درصد آن‌ها به گونه‌های بروسلا آلوده هستند که از این مقدار ۶۹ مورد به *بروسلا آبورتوس* آلوده بودند. همچنین در این مطالعه حساسیت روش PCR برای تشخیص بروسلا بسیار کاربردی بوده است.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق تشخیص عوامل عفونی ایجادکننده سقط جنین در گاو توسط انجام آزمایش PCR در مقایسه با روش‌های سنتی می‌تواند یک روش سریع و قابل اطمینان‌تری به شمار آید.

تشکر و قدرداني

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR (JPR) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. چاهک M مارکر (100 bp)، چاهک شماره ۱ کنترل مثبت، چاهک شماره ۲ کنترل منفی، چاهک شماره های ۷-۳ نمونه‌های مثبت

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده

1. Akbarmehr, J. and M. Ghiyamirad. 2011. Serological survey of brucellosis in livestock animals in Sarab City (East Azarbayjan province), Iran. *African Journal of Microbiology Research* 5(10):1220-1223.

2. Bricker, B.J., Ewalt, D.R., MacMillan, A.P., Foster, G. and S. Brew. 2000. Molecular characterization of Brucella strains isolated from marine mammals. *Journal of clinical microbiology.* 38(3):1258-1262.

3. Bricker, B.J. 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary microbiology.* 90(1): 435-446.

4. Doomari, H. 2009. A serological survey on cow brucellosis in Jiroft city. *Journal of Veterinary Research.* 64(3): 233-236. (In Farsi).

5. Doosti, A. and P.G. Dehkordi. 2011. Application of real-time PCR for identification and differentiation of *Brucella abortus* and Brucella melitensis in cattle. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 14(2): pp.109-115.

6. Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I. and A. Cloeckaert. 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for Brucella strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 57(11): 2688-2693.

7. Gholizadeh, S. S., Zali, M. H., Hashempour, A. and E. M. Ahmadi. 2013. Investigation of brucellosis in cattle and sheep in Urmia-Iran. *Yüzüncü yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 24(3): 133-134.

8. Hasani Tabatabaie, A.M and Firozi, R. 2016. Bacterial diseases of animals. 4th ed. pp. 310-520, Publication: Tehran University press, Iran. (In Farsi)

9. Huber, B., Scholz, H.C., Lucero, N. and H. J. Busse. 2009. Development of a PCR assay for typing and subtyping of Brucella species. *International Journal of Medical Microbiology*. 299(8): 563-573.

10. Ilhan, Z., Aksakal, A., Ekin, I.H., Gülhan, T., Solmaz, H. and S. Erdenlig. 2008. Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Letters in applied microbiology*. 46(3): 301-306.

11. Leal-Klevezas, D. S., Lopez-Merino, A. and J. P. Martinez-Soriano. 1994. Molecular detection of Brucella spp.: rapid identification of *B. abortus* biovar I using PCR. *Archives of medical research*. 26(3): 263-267.

12. Leuenberger, R., Boujon, P., Thür, B., Miserez, R., Garin-Bastuji, B., Rüfenacht, J. and K.D.C. Stärk. 2007. Prevalence of classical swine fever, Aujeszky's disease and brucellosis in a population of wild boar in Switzerland. Veterinary Record: J*ournal of the British Veterinary Association.* 160(11).

13. Maadi, H., Moharamnejad, M. and M. Haghi. 2011. Prevalence of brucellosis in cattle in Urmia, Iran. *Pakistan Veterinary Journal*. 31(1): 81-82.

14. Moradi, G., Esmaiel Nasab, N., Ghaderi, E., Sofi Majidpour, M. and H. Salimzadeh. 2006. Brucellosis in Kurdistan Province from 1997 to 2003. *Annals of Alquds Medicine*. 2(1): 32-37.

15. Moreno, E., Cloeckaert, A. and I. Moriyón. 2002. Brucella evolution and taxonomy. *Veterinary microbiology.* 90(1): 209-227.

16. Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary microbiology*. 90(1): 447-459.

17. O'Leary, S., Sheahan, M. and T. Sweeney. 2006. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Research in veterinary science.* 81(2): 170-176.

18. Ocholi, R.A., Kwaga, J.K.P., Ajogi, I. and J.O.O. Bale. 2004. Phenotypic characterization of Brucella strains isolated from livestock in Nigeria. *Veterinary Microbiology.* 103(1):47-53.

19. Samaha, H., Mohamed, T.R., Khoudair, R.M. and H.M. Ashour. 2009. Serodiagnosis of brucellosis in cattle and humans in Egypt. *Immunobiology.* 214(3): 223-226.

20. Silva, T.M.A.D., Oliveira, R.G.D., Mol, J.P.D.S., Xavier, M.N., Paixão, T.A.D., Cortez, A., Heinemann, M.B., Richtzenhain, L.J., Lage, A.P. and R.D.L. Santos. 2009. Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. *Ciência Rural.* 39(9): 2563-2570.

21. Verger, J.M., Grayon, M., Cloeckaert, A., Lefèvre, M., Ageron, E. and F. Grimont. 2000. Classification of Brucella strains isolated from marine mammalsusing DNA–DNA hybridization and ribotyping. *Research in microbiology*. 151(9): 797-799.

22. Yagupsky, P. and E.J. Baron. 2005. Laboratory exposures to Brucella and implications for bioterrorism. *Emerging Infectious Disease Journal.* 11(8): 1180-1185.

23. Youngquist, R. S and W. R. Threlfall. 2007. Current Therapy in Larg Animal Theriogenology. 2rd ed. Philadelphia: Saunders Company.

24. Zamanian, M., Hashemi Tabar, G.R., Rad, M. and A. Haghparast. 2015. Evaluation of different primers for detection of Brucella in human and animal serum samples by using PCR method. *Archives of Iranian Medicine (AIM).* 18(1): 44-50.

www.SID.ir