Archive of SID

مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۴، ۴۰۱-۳۹۵
Original Article
Journal of Veterinary Research. 70,4: 395-401, 2015

جستجوی ژنومی بروسلا در گاوهای سرم مثبت استان چهارمحال و بختیاری

محمدرضا محزونیه[۱] حمیدرضا مهری[۲] حسن صیدی سامانی[۳*] امیر مؤمنی[۳] علی شکوهی[۳] خدیجه خاکسار[۲] محمد اسدی[۲] مرضیه صفر پور[۴]
فاطمه یکتنه[۴] پیام نیک پور[۲]

۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهر کرد، شهر کرد- ایران
۲) اداره کل دامپزشکی استان چهار محال و بختیاری، شهر کرد- ایران
۳) دانش‌آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهر کرد، شهر کرد- ایران
۴) پژوهشکده بیماریهای مشترک انسان و دام، دانشگاه شهر کرد، شهر کرد- ایران

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

چکیده

زمینه مطالعه: بروسلوز یکی از مهمترین بیماریهای مشترک انسان ودام در خاورمیانه و ایران می‌باشد. **هدف:** هدف از انجام این مطالعه جستجوی ژنومی بروسلا در گاوان سروپوزیتیو بود. **روش کار:** برای انجام این تحقیق در طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۲، از ۲۸۵۱۹ رأس گاو خونگیری انجام شد. سپس نمونه‌ها توسط تست‌های رز بنگال، رایت و ۲ - مرکاپتو اتانول از نظر حضور آنتی‌بادی ضد بروسلا، غربالگری شدند. نمونه‌های با تیتر آنتی بادی برابر یا بیشتر از ۸۰ و۴۰ به ترتیب در تست‌های رایت و ۲ - مرکاپتو اتانول به عنوان نمونه مثبت تلقی و کشتار شدند. بافت‌های عقده‌های لنفی، کبد و کلیه از ۱۲۲ مورد از گاوهای کشتار شده جمع‌آوری شد. بیضه حیوانات نر نیز گرفته شد. نمونه‌های سروپوزیتیو با مجموعه‌ای از پرایمرهای اختصاصی برای بروسلا آبورتوس، بروسلا ملی‌تنسیس و سویه‌های واکسن Rev۱ و RB۵۱ توسط آزمون PCR تست شدند. **نتایج:** نتایج تست‌های سرولوژی نشان داد که ۴۵۰ نمونه در تست رزبنگال مثبت هستند و ۴۴۷ نمونه در تست رایت دارای تیتر آنتی بادی ≤۱:۸۰ هستند و ۳۸۹ نمونه، در تست ۲ME مثبت می‌باشند. نتایج PCR نشان داد که ۴۶ مورد (۳۷/۷٪) از ۱۲۲ نمونه از نظر حضور توالی نوکلئوتیدی خاص بروسلا مثبت‌اند یا به عبارتی عفونت فعال داشته و به باکتری جنس بروسلا آلوده بودند، در حالی که ۶۲/۳ ٪ از نمونه‌ها منفی بودند. از بین موارد مثبت، ۲ مورد (۴/۳۵٪) به بروسلا ملی‌تنسیس، ۲ مورد (۴/۳۵٪) به سویه واکسن Rev۱ و ۴۲ مورد (۹۱/۳٪) به بروسلا آبورتوس آلوده بودند. **نتیجه گیری نهایی:** همان طور که انتظار می‌رود اکثر گاوها با گونه آبورتوس آلوده هستند. موارد آلوده با سویه‌های واکسن Rev۱ و *B.melitensis* احتمالاً به دلیل پرورش گوسفند و بز در محیط نگهداری گاوها می‌باشد. اما ۶۲/۳ ٪ از دام‌های سروپوزیتیو در آزمون PCR به بروسلا آلوده نبودند که می‌تواند به دلیل بروز واکنش متقاطع در تست‌های سرولوژی و یا برانگیخته شدن سیستم ایمنی و حذف باکتری از اندام‌های داخلی باشد.

واژه‌های کلیدی: گاو، بروسلا، PCR، سرولوژی

مقدمه

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

با توجه به این که باکتری برای مدت زمان کوتاهی در خون حضور دارد و پس از باکتریمی کوتاه در بافت‌ها لوکالیزه می‌شود، در این مطالعه جهت جستجوی باکتری در دام‌های سرم مثبت از بافت‌هایی نظیر غدد لمفاوی، کبد و کلیه استفاده شد (۱۲،۲۰).

روش‌هایی از جمله سرولوژی، کشت و جداسازی و تعیین خواص بیوشیمیایی و مولکولی باکتری جهت تشخیص بیماری در دام مورد استفاده قرار می‌گیرد. رایج ترین روش جهت تعیین آلودگی در دام‌ها، آزمون‌های سرولوژی است که با محدودیت‌هایی در تعیین سویه‌های مختلف عامل بیماری همراه است (۱). همچنین آزمون‌های سرولوژیک به دلیل حضور موارد منفی کاذب حاصل از آنتی بادی‌های بلوکان و وجود موارد مثبت کاذب به دلیل تشابه آنتی‌ژنی با سایر باکتری‌های گرم منفی (از جمله یرسینیا انترو کولیتیکا، شریشیا کلی O:۱۵۷، سالمونلا اوربانا و ویبریو کلرا) از حساسیت و اختصاصیت کافی برخوردار نمی‌باشند و به تنهایی قادر به تشخیص مرحله حاد و مزمن بیماری نیستند (۱۵،۱۸).

قبل از انجام این مطالعه، نمونه‌های ارسالی از کشتارگاه توسط کارشناسان اداره دامپزشکی استان، در شرایط مناسب از نظر انکوباسیون، به

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۳۸-۴۴۲۴۴۲۷ نمابر: ۰۳۸-۴۴۲۴۴۲۷ Email: samani.hassan@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

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

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

مواد و روش کار

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

آزمایش رزبنگال: آنتی ژن رزبنگال، تولید مؤسسه تحقیقات، سرم و واکسن سازی رازی، ایران، طبق پروتکل مراحل آزمایش انجام شد.

آزمایش رایت و آزمایش ۲ME: این دو آزمون طبق پروتکل کیت آزمون رایت انجام شد (شرکت بهینه پرور پارسیان).

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

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

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

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

پرایمر شماره ۲ در تمامی گونه‌ها به جز در *B.ovis* و سویه RB51 باند تشکیل می‌دهد.

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

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

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

سپس نمونه‌های مثبت توسط پرایمر شماره ۳ بررسی شدند. با توجه به این که این پرایمر فقط در حضور سویه Rev1 در محدوده ۲۱۸bp باند تشکیل می‌دهد، بنابراین مواردی که توسط این پرایمر مثبت اعلام می‌شود، در نتیجه آلودگی با سویه Rev1 می‌باشد. در مرحله بعد نمونه‌های مثبت باقی مانده توسط پرایمرهای شماره ۲ و ۴ به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این دو آزمون به صورت زیر تفسیر می‌شدند: اگر نمونه‌ای در آزمون توسط پرایمر شماره ۲ و ۴ مثبت شود، یعنی هم در محدوده ۱۶۸۲bp و هم در محدوده ۱۰۷۱bp تشکیل باند دهد، به عنوان آلودگی با *B.melitensis* در نظر گرفته می‌شود. اما اگر نمونه‌ای توسط پرایمر شماره ۲ مثبت شود (باند در محدوده ۱۰۷۱bp) ولی توسط پرایمر شماره ۴ منفی باشد، آلودگی با *B.abortus* در نظر گرفته می‌شود.

آزمون PCR در حجم ۲۵µL انجام شد. مواد و مقدار لازم جهت انجام آزمون عبارت بودند از:

www.SID.ir

Archive of SID

مستر میکس رد (Cat. No.: 180301 Amplicon, Denmark) ۱۲/۵µL، پرایمرهای F و R هرکدام به مقدار ۱µL از غلظت۱۰pmol، آب ۸/۵µL و DNA استخراج شده ۲ µL.

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

دناتوراسیون اولیه ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۵°C به مدت یک دقیقه، مرحله‌ی پلی مریزاسیون در دمای۷۲°C به مدت یک دقیقه و در انتهای سیکل، واکنش در دمای ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه پایان یافت.

ارزیابی محصول PCR: محصول PCR به مقدار ۵µL بر روی ژل آگارز ۱٪ به درون چاهک‌ها انتقال یافت. سپس الکتروفورز در بافر TAE با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۵۰ دقیقه انجام شد. سپس نتایج بر روی دستگاه ایلومینیتور (UVitec, UK) مشاهده و ثبت شدند.

نتایج

نتایج حاصل از آزمون‌های سرولوژی نشان داد که ۱/۵۸٪ از نمونه‌ها در آزمون رزبنگال، ۱/۵۷٪ از نمونه‌ها در آزمون رایت و ۱/۳۶٪ از نمونه‌ها در آزمون ۲ME مثبت هستند. نتایج آزمون‌های سرولوژی در جدول ۳ خلاصه شده است.

همچنین نتایج حاکی از آن هستند که مناطقی وجود دارند که از نظر بروسلوز شیوع بالایی دارند (منطقه شماره ۱). نتایج حاصل از جستجوی ژنومی بروسلا به تفکیک فصل و منطقه در جدول ۴ نشان داده می‌شود.

نتایج حاصل از آزمون PCR که روی ۱۲۲ مورد از دام‌های راکتور انجام شد، نشان داد که ۴۶ مورد (۳۷/۷٪) از دام‌ها، از نظر حضور باکتری مثبت هستند. در حالی که ژنوم باکتری در تعداد ۷۶ مورد (۶۲/۳٪) از دام‌هایی که توسط آزمون‌های سرولوژی به عنوان راکتور شناخته شده بودند، یافت نشد.

در بین موارد مثبت، تعداد ۴۲ مورد از دام‌ها به بروسلا ابورتوس (۹۱/۳٪)، ۲ مورد به بروسلا ملی تنسیس (۴/۳۵ ٪) و ۲مورد (۴/۳۵ ٪) به سویه واکسن۱Rev آلوده بودند.

بحث

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

جدول ۱. تفسیر نتایج سرولوژی.

رزبنگال	رایت	۲ مرکاپتواتانول	تفسیر نتایج
مثبت	۱/۱۶۰ و بالاتر	هر تیتری	مثبت (راکتور)
مثبت	۱/۸۰ تا ۴/۸۰	۴/۴۰ و بالاتر	
مثبت	۱/۸۰	۳/۴۰ و پایین‌تر	مشکوک
مثبت	۲/۲۰ تا ۴/۴۰	۴/۴۰ و پایین‌تر	
مثبت	۱/۲۰ و پایین‌تر	۱/۲۰ و پایین‌تر	منفی

که طی مطالعه Mostafavi و همکاران در سال ۲۰۱۲ روند بیماری در کشور از سال ۱۳۷۰ تا ۱۳۸۷ در گاو رو به کاهش بوده است (۱۷). طبق دستورالعمل سازمان دامپزشکی کشور، شناسایی موارد آلوده توسط آزمون‌های سرولوژی رزبنگال، رایت و ۲ME انجام می‌شود (۱۵،۱۸). لیکن این آزمایش‌ها به دلیل حساسیت و ویژگی پایین، قادر به تشخیص صحیح موارد آلوده نمی‌باشند و گاه با نتایج منفی و مثبت کاذب همراهند. نتایج منفی کاذب به معنی عدم تشخیص گاو آلوده و باقی ماندن منبع عفونت در بین دام‌های گله است که خود تا زمان آزمایش بعدی که حداقل ۶ ماه طول می‌کشد موجب انتشار باکتری در بین دام‌ها و خطر آلودگی انسان از طریق مستقیم یا غیر مستقیم را به دنبال خواهد داشت و مثبت کاذب یعنی حذف دامی که علی رغم تولید در گله و عدم خطر انتشار عفونت با پرداخت غرامت توسط دولت و وارد کردن خسارت به دامدار به کشتارگاه اعزام می‌شود. باید اذعان نمود که آزمون‌های سرولوژی ویژگی کافی جهت تعیین موارد منفی کاذب را ندارند و با عنایت به ارزش گاو شیری در حال حاضر ضروری است روش‌های تشخیصی را مورد ارزیابی قرار داده و تلاش شود تا از روش‌های جایگزین با حساسیت و ویژگی بالاتر یا از آزمون‌های تکمیلی برای شناسایی موارد سرو-راکتیو استفاده نمود، زیرا در مجموع خسارت زیادی را به اقتصاد ملی وارد می‌نماید، مضافاً بر این که دامداری که به عنوان مثبت گزارش می‌شود دچار بحران‌های جدی می‌شود. روش‌های سرولوژی جدید از جمله الایزا، کشت میکروبی و تکنیک‌های تشخیص مولکولی در زمره روش‌های تکمیلی به حساب می‌آیند که محققین مختلف آنرا مورد ارزیابی قرار داده‌اند. نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز تنها توانست حدود ۳۸٪ از موارد سروپوزیتیو رادر آزمون PCR با ۴ زوج پرایمر تأیید نماید یعنی اگر این عدد را تنها در استان چهار محال و بختیاری روی همه گاوهای سروپوزیتیو (۳۸۹ رأس) تعمیم دهیم، خسارتی بالغ بر ۲۰ میلیارد ریال را در سال مورد مطالعه ایجاد کرده است. البته باید بر این خسارت، هزینه‌های مبارزه را نیز افزود.

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

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده.

Number	Gene	Primer sequences 5′→3′	Amplicon size (bp)	Source of genetic differences
1	BMI0535f BMI0536r	F:GCGCATTCTTCGGTTATGAA R:CGCAGGCGAAAACAGCTATAA	450	IS711 insertion in BMEI0535– BMEI0536 in *Brucella strains* isolated from marine mammals
2	BMEI0998f BMEI0997r	F:ATCCTATTGCCCCGATAAGG R:GCTTCGCATTTTCACTGTAGC	1682	IS711 insertion in BMEI0998 in *B. abortus* RB51 and deletion of 15,079 bp in BMEI0993–BMEI1012 in *B. ovis*
3	BMEI0752f BMEI0752r	F:CAGGCAAACCCTCAGAAGC R:CATGTGTAACGCACACCAA	218	Point mutation in BMEI0752 in *B. melitensis* Rev.1
4	BMEII0843f BMEII0844r	F:TTTACACAGGCAATCCAGCA R:GCGTCCAGTTGTTGTTGATG	1071	Deletion of 25,061 bp in BMEII826–BMEII0850 in *B. abortus*

جدول ۳. نتایج تست‌های سرولوژی.

عنوان	زمستان۹۰	بهار ۹۱	تابستان۹۱	پاییز۹۱	زمستان۹۱	بهار۹۲	کل
تعداد نمونه خون	۶۵۲۰	۶۶۰۳	۴۸۸۸	۳۸۰۵	۱۹۳۵	۴۷۶۸	۲۸۵۱۹
رزبنگال+	۱۷۵ (٪۲/۶۸)	۴۵ (٪../۶۸)	۹۹ (٪۲/۰۲)	۶۸ (٪۱/۷۹)	۴۶ (٪۲/۳۸)	۱۷ (٪../۳۶)	۴۵۰ (٪۱/۵۸)
رایت+	۱۷۵ (٪۲/۶۸)	۴۵ (٪../۶۸)	۹۸ (٪۲)	۶۷ (٪۱/۷۶)	۴۵ (٪۲/۳۲)	۱۷ (٪../۳۶)	۴۴۷ (٪۱/۵۷)
+۲ME	۱۲۳ (٪۱/۸۷)	۴۳ (٪../۶۵)	۹۷ (٪۱/۹۸)	۶۷ (٪۱/۷۶)	۴۴ (٪۲/۲۷)	۱۵ (٪../۳۱)	۳۸۹ (٪۱/۳۶)

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

فصل شماره منطقه	زمستان ۹۰	بهار ۹۱	تابستان ۹۱	پاییز ۹۱	زمستان ۹۱	۴ ماه اول ۹۲	کل
۱	۱۶	۱۱	۲	۱	۳	-	۳۳ ٪۷۱/۷۴
۲	-	-	۳	۱	۱	۱	۶ ٪۱۳/۰۴
۳	۳		-	-	-	-	۴ ٪۸/۷
۴	۲	-	-	-	-	-	۲ ٪۴/۳۵
۵	۱	-	-	-	-	-	۱ ٪۲/۱۷
کل	۲۲ ٪۴۷/۸۳	۱۲ ٪۲۶/۰۹	۵ ٪۱۰/۸۷	۲ ٪۴/۳۵	۴ ٪۸/۷	۱ ٪۲/۱۷	۴۶

حساسیت و ۴۸٪ با نتایج آزمایش رایت همخوانی دارد در حالی که این مقادیر برای آزمایش PCR، ۵۸٪ حساسیت و ۶۵٪ همخوانی بود و از اینرو پیشنهاد نمودند که روش PCR می‌تواند به عنوان یک روش سریع و مناسب در تشخیص بروسلا مورد استفاده قرار گیرد (۸). در گوسفند نیز نتایج تقریباً مشابه است. در مطالعه Ilhan و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه روی بافت‌های ۱۶۲ رأس گوسفند، شامل ۴۵ مورد سروپوزیتیو و ۱۱۷ مورد سرونگاتیو با روش کشت و PCR، باکتری بروسلا ملی تنسیس، از ۱/۲٪ موارد خون و ۱۷/۲٪ موارد عقده‌های لمفی جدا شد. در حالی که ۲۷/۷٪ از نمونه‌های خون و ۲۹٪ از اندام‌های لمفاوی آنها در آزمون PCR نتیجه مثبت نشان دادند (۱۱) که با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر در گاو تقریباً همخوانی دارد. در شتر نیز گزارش شده است که موفقیت PCR در شناسایی موارد مثبت بیشتر از آزمایش سرولوژی بوده است. در مطالعه Ghorbani و همکاران در سال ۲۰۱۲ نتایج بررسی سرولوژی، کشت و nested-PCR روی ۳۱۰ نمونه سرم شتر نشان داد که حساسیت PCR در شناسایی موارد از روش سرولوژی و کشت بیشتر است. هیچ یک از نمونه‌های عقده لمفاوی در کشت نتیجه مثبت به همراه نداشت در حالی که ۶ نمونه‌ی خون و ۹ نمونه سرم در بین ۱۰۰ نمونه در روش nested-PCR مثبت بودند (۱۰). در مطالعه حاضر نیز روش کشت نتیجه مثبتی به همراه نداشت ولی حدود ۳۸٪ اندام‌های لمفاوی در PCR مثبت بودند.

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

www.SID.ir

Archive of SID

که احتمال حضور باکتری وجود دارد انجام شد. بنابراین اگر باکتری در این اندام‌ها لوکالیزه شده باشد می‌توان باکتری را توسط این تکنیک ردیابی کرد. در این مطالعه ۳۷/۷٪ موارد PCR شـده آلوده به باکتری متعلق به جنس بروسـلا بودند و به عبارتی عفونت فعال را داشتند در حالی که در۶۲/۳٪ از نمونه‌های سروپوزیتیو، باکتری ردیابی نشد که می‌تواند به دلیل برانگیخته شـدن سیسـتم ایمنی میزبان و حذف باکتری و یا بـه دلیل واکنش‌های متقاطعی باشـد که توسط سـایر باکتری‌ها نظیر یرسینیا انتروکولیتیکا به خصوص سویه O۹ ایجاد شده است. البته باید خاطر نشان کرد که در روش مولکولی PCR، موارد مثبت کاذب به دلیل آلودگی نمونه‌ها در مراحل انجام کار و مـوارد منفی کاذب به دلیل حذف عامل بیمـاری از بدن به هر دلیل (استفاده از داروها و یا برانگیخته شدن سیستم ایمنی میزبان)، نیز وجود دارد.

همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که مناطقی که به عنوان کانون برای بیماری مطرح می‌باشند تعداد موارد مثبت واقعی در آنها بیشـتر می‌باشـد و مناطقی که به صورت تک گیر آلودگی در آنها مشاهده می‌شود، موارد مثبت کاذب در آنها بیشتر می‌باشد (جدول ۴).

یافته‌ها بیانگر آن اسـت که ۴/۳۵٪ از موارد آلوده، به علت آلودگی با بروسـلا ملی‌تنسیس سویه Rev۱ در گاو می‌باشد که ممکن است به دلیل پرورش گوسـفند و بز در کنار گاوها باشـد که با نتایـج مطالعه Pishva و همکاران در سـال ۲۰۰۸ همخوانی دارد (۱۹). توجه بیشتر به گوسفند و بز از نظر اهمیت این گونه‌ها در انتشار بروسلا ملی تنسیس که عامل اصلی عفونت در موارد بالینی انسان است و می‌تواند مخزن آلودگی برای گاو هم باشد نیز قویا توصیه می‌گردد.

شیوع بالای بیماری در منطقه شماره ۱ می‌تواند به این دلیل باشد که ایـن منطقه از نظر پرورش دام به صورت یک مجتمع دامپروری می‌باشـد که با توجه به این که ضوابط بهداشتی در رفت‌وآمد به این مجتمع و حتی در ورود بـه محوطه هر گاوداری رعایت نمی‌شـود، و از طرفی فاصله بین مزرعه‌ها بسـیار کوتاه بوده که این موضوع می‌تواند بر شیوع بیش از پیش بیماری در منتطقه بیافزاید. علاوه بر این برخی افراد در این مجتمع با شغل دامپروری فعالیت نکرده و با خرید دام‌های مشکل دار (مثلاً خرید دام سقطی و...) با قیمت مناسب تر باعث شیوع بیماری در منطقه می‌شوند.

در پایان پیشنهاد می‌گردد با توجه به این که نتایج کشت اکثر نمونه‌ها منفی و ۶۲/۳٪ از نمونه‌های سـرم مثبـت در PCR منفی بودند، مطالعات بیشتری برای یافتن روش آزمایشگاهی مناسب جهت تفکیک واکنش‌های مثبت کاذب و احیاناً بروز واکنش متقاطع صورت گیرد. همچنین مطالعات جدیدی برای یافتن عواملی که موجب بروز این گونه واکنش‌های کاذب در آزمون‌های سرولوژی بروسلوز می‌گردند انجام شود.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله بدین وسیله از همکاری آقای مهدی سلیمی و پرسنل محترم اداره کل دامپزشکی استان چهار محال و بختیاری و اعضای پژوهشکده بیماریهای مشترک انسان و دام دانشگاه شهرکرد تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

1. Al-Jam'a, AH., Elbashir, A.M., Al-Faris, S.S. (1993) Brucella pneumonia: A case report. Ann Saudi Med. 13: 74-77.
2. Budras, K.D., McCarthy Al Dahouk, S., Nockler, K., Scholz, H.C., Pfeffer, M., Neubauer, H., Tomaso, H. (2007) Evaluation of genus-specific and species-specific real- time PCR assays for the identification of *Brucella* spp. Clin Chem Lab Med. 45: 1464-1470.
3. Bogdanovich, T., Skurnik, M., Lubeclek, P.S., Ahrens, P., Hoorfar, J. (2004) Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus Brucella. J Clin Microbiol. 42: 2261-2263.
4. Bounaadja, L., Albert, D., Chenais, B., Henault, S., Zygmunt, M., Poliak, S., Garin-Bastuji, B. (2009) Real-time PCR for identification of Brucella spp: A comparative study of Is711, bcsp31 and per target genes. Vet Microbiol. 137: 156-164.
5. Cloeckaert, A., Grayon, M., Grepinet, O. (2000) An IS711 element downstream of the bp 26 gene is a specific of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. Clin Diagn Lab Immunol. 7: 835-839.
6. Cloeckaert, A., Grayon, M., Grepinet, O. (2002) Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene. Vaccine. 20: 2546–2550.
7. Esmaili, H., Tajic, P., Ekhtiarzadeh, H., Bolorchi, M., Hamedi, M., Khalaj, M., Amiri, K. (2012) Evaluation of bovine brucellosis control and eradication program in Iran: An epidemiological survey. J Vet Res (In Persian). 67: 211-221.
8. Ghosian Moghaddam, M.H., Keyvani Amineh, H., Zahraei Salehi, T., Khazraei Nia, P., Fallah, N. (2008) A comparison of culture and PCR methods with wrights test for diagnosis of Brucellosis. J Shahed University (In Persian). 74: 51-58.
9. Gross, A., Bertholet, S., Mauel, J., Dornand, J. (2004) Impairment of Brucella growth in human macrophagic cells that produce nitric oxide. Microb Pathog. 36: 75-82.

www.SID.ir

Archive of SID

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

[1]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord-Iran
[2]Veterinary directorate general of Chaharmahal and Bakhtiyari, Shahrekord- Iran
[3]Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran
[4]Research Institute of Zoonotic Diseases, University of Shahrekord, Shahrekord- Iran
(Received 11 August 2015, Accepted 31 October 2015)

Abstract:

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

Keyword: bovine, Brucella, PCR, serology

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Interpretation of serological results.

Table 2. Specifications of the primer.

Table 3. Serological test results.

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

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

www.SID.ir