

Evaluation and Diagnosis of Species and Biovars of *Brucella* among cattles by Multiplex Polymerase Chain Reaction

Farzad Alizadehmofrad, Maryam Parvini Kohneh Shahri

Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia ,Iran

Article Information

Article history:

Received: 2016/12/25

Accepted: 2017/09/19

Available online: 2017/11/20

Article Subject:

Zoonoses Research

IJMM 2017; 11(5): 107-114

Corresponding author:

Maryam Parvini Kohneh Shahri

Department of Biology, Urmia
Branch, Islamic Azad
University, Urmia ,Iran

Tel: 09167091075

Email:

m.parvini@iaurmia.ac.ir

Abstract

Background and Aims: Brucellosis is an infectious zoonotic disease responsible for reproductive disorders among animals and significant economic losses to the meat and milk supplychain. The purpose of this study was therefore to evaluate and diagnose the species and strains of *Brucella* isolates among cattles via multiplex polymerase chain reaction.

Materials and Methods: In this study, blood samples were taken from 22 cows diagnosed as having brucellosis by PCR test. Blood samples were cultured in BACTEC vials and incubated at 37 degrees Celsius for 5 days following which each sample was cultured on Brucella agar and kept for 3 days under CO₂ condition. The 16SrRNA gene was used as the target for the detection of *Brucella* genus and the bcp31 gene was used for the detection of *Brucella* biovars. The PCR products were electrophoresed on 1% agarose and compared with standard strains.

Results: The PCR results showed a total of 22 positive samples for *Brucella* among cattles. Out of the 22 cattle positive samples, 19 were identified as *B.abortus* (biovars 1, 2, 3, 4, 5) and 3 as *B. melitensis* (biovars 1, 2, 3).

Conclusions: *Brucella abortus* biovars 1 and 3 and *B. melitensis* biovar 1 are the most prevalent biovars among cattles in Lorestan province, Iran. Moreover, multiplex PCR method could be used to improve the qualitative level and the *Brucella* diagnosis speed in laboratories.

KeyWords: Brucellosis, PCR, *Brucella species*

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Alizadehmofrad F, Parvini Kohneh Shahri M. Evaluation and Diagnosis of Species and Biovars of *Brucella* among cattles by Multiplex Polymerase Chain Reaction . Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (5) :107-114

بررسی و شناسایی گونه‌ها و بیووارهای بروسلا در گاوها با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمران چندگانه

فرزاد عالی‌زاده مفرد، مریم پروینی کهنه شهری

گروه زیست‌شناسی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: بروسلوزیس یک بیماری عفونی زئونوتیک است که مسئول اختلالات در باروری جانوران و زیان‌های اقتصادی قابل توجهی در زنجیره گوشت و شیر می‌شود و به دلیل اینکه یک بیماری آنتروپوزونوز مزمن است، اختلالاتی را در باروری جانوران به وجود می‌آورد؛ بنابراین هدف از انجام این پژوهش، بررسی و تشخیص گونه‌ها و تعیین سویه‌های مولد عفونت در گاوه‌های مبتلا با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمران چندگانه است.

مواد و روش کار: در مطالعه پیش رو از ۲۲ گاو مبتلا به بروسلوزیس که دارای تست های PCR مثبت بودند، نمونه گیری خون انجام شد و سپس نمونه‌ها در محیط کشت خون BACTEC و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز انکوبه و پس از آن هر نمونه روی یک پلت حاوی بروسلا آگار کشت داده شد. در تست PCR برای تشخیص بروسلا از پرایمر 16SrRNA مخصوص جنس و برای تشخیص گونه و بیووارها از پرایمر bcsp31 استفاده شد. محصول PCR با ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و با سویه‌های استاندارد مقایسه شد.

یافته‌ها: با انجام PCR برای تشخیص جنس بروسلا از نمونه‌های جمع‌آوری شده گاوها، ۲۲ مورد مثبت بود. از ۲۲ نمونه مثبت ۱۹ نمونه به‌عنوان بروسلا آبورتوس بیووار (۱، ۲، ۳، ۴، ۵) و ۳ نمونه به‌عنوان بروسلا ملی تنسیس بیووار (۱، ۲، ۳) شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: بیووارهای ۱ و ۳ بروسلا آبورتوس و بیووارهای ۱ بروسلا ملی تنسیس، بیووارهای شایع در بین گاوه‌های استان لرستان هستند. استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمران چندگانه در آزمایشگاه‌های تشخیصی موجب ارتقای سطح کیفی می‌شود و سرعت تشخیص را افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: بروسلوزیس، PCR، گونه‌های بروسلا

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۵

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۸

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۸/۲۹

موضوع:

بیماری‌های مشترک انسان - دام

IJMM 1396;11(5): 107-114

نویسنده مسئول:

مریم پروینی کهنه شهری

گروه زیست‌شناسی، واحد ارومیه،

دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

تلفن: ۰۹۱۶۷۰۹۱۰۷۵

پست الکترونیک:

m.parvini@iaurmia.ac.ir

مقدمه

شایع ترین آزمون‌ها در تشخیص عفونت بروسلا هستند، در بیشتر موارد تشخیص بروسلوزیس دشوار است و دلیل این دشواری نه‌تنها به خاطر شباهت بالینی این بیماری با بسیاری از بیماری‌های عفونی و غیرعفونی دیگر است، بلکه در بیشتر موارد روش‌های تشخیصی قادر به جداسازی ارگانسیم‌ها نیستند. معایب برجسته روش کشت همچون زمان طولانی، نیاز به کارکنان کارآزموده، محیط‌های انتخابی و حساسیت و اختصاصیت پایین، و از سوی دیگر استفاده از روش‌های سرولوژیکی با اختصاصیت کم، وجود نتایج کاذب، وقت‌گیر بودن و خطر بالای آلودگی کادر آزمایشگاه باعث شده که کار مداوم با این ارگانسیم در آزمایشگاه مخاطره‌آمیز و نامطمئن باشد.

از عواملی که باعث برتری روش مولکولی نسبت به روش‌های سرولوژی رایج و کشت شده است، می‌توان به کاهش چشمگیر زمان، کاهش احتمال دچار آلودگی شدن کادر

باکتری جنس بروسلا یکی از عوامل اصلی بیماری‌های مشترک میان انسان و دام است. تشخیص گونه‌های بیماری‌زا در کشورهای گوناگون بسیار پراهمیت است. باکتری بروسلا به‌عنوان عامل مؤثر بروسلوزیس، باکتری‌های کوکوباسیل گرم منفی و درون سلولی است که به جنس بروسلا تعلق دارد (۱، ۲). باکتری‌های بروسلا هوازی اجباری هستند و دارای متابولیسم تنفسی هستند و قدرت تخمیری ندارند. کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت، اوره آز و نیترات مثبت، VP و MR و اندل منفی هستند (۳، ۴). بروسلوزیس، طیف وسیعی از پستانداران اهلی و وحشی را مبتلا می‌سازد. این بیماری به علت ایجاد سقط‌جنین در دام، کاهش تولید شیر، عقیمی و نازایی در دام‌های مبتلا و همچنین به علت مبتلا کردن انسان به بیماری تب مالت، همواره از دو بُعد اقتصادی و بهداشتی مورد توجه قرار می‌گیرد (۵، ۶، ۷). در روش‌های کشت باکتریولوژیکی و تست‌های سرولوژیکی که

لیتر از محیط کشت به میکروتیوب‌ها انتقال یافتند و در ادامه با سانتریفیوژ رسوب حاوی باکتری‌ها در آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری در ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس میکروتیوب‌ها در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی که حاوی DNA باکتریایی بود، جدا شد. بررسی خلوص DNA با استفاده از دستگاه نانو دراپ (Thermo، آمریکا) انجام شد. با تزریق ۲ میکرولیتر محلول DNA در صفحه چشمی مخصوص، اسپیکروفوتومتر نمونه با اشعه UV انجام شد که در دستگاه میزان جذب نور را در فاصله ۲۲۰ تا ۳۵۰ نانومتر برای DNA به صورت نمودار و نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۳۰ (نشان‌دهنده میزان خلوص و آلودگی DNA) و در نهایت غلظت DNA را به $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ گزارش کرد.

واکنش PCR برای تعیین جنس

برای تشخیص جنس بروسلا، از پرایمرهای مربوط به سکانس ژن 16SrRNA بروسلا (جدول ۱) پس از مرحله blast قرار دادن، استفاده شد. انجام PCR در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر استریل و با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، در دستگاه ترموسایکلر (SENSOQUEST، آلمان) انجام شد. برای تکثیر ژن هدف، بهینه‌سازی برنامه دمایی توسط دستگاه Rotogene (Giagen، آلمان) به صورت 95°C در ۵ دقیقه، 94°C در ۶۰ ثانیه، 55°C در ۶۰ ثانیه، 65°C در ۶۰ ثانیه و 72°C در ۳ دقیقه در ۳۵ سیکل انجام گرفت. پس از پایان مراحل دمایی و تکثیر احتمال ژن مورد هدف، محصول PCR در کنار DNA ladder (100 bp) در ژل آگارز ۱ درصد (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داکيومنت (سبز، ایران) با نور UV باندهای تشکیل‌شده، دیده شد. در صورت دیده شدن باند مورد نظر (۹۰۵ bp) جدایه مورد نظر بروسلا در نظر گرفته می‌شد.

Multiplex PCR برای تعیین گونه

برای تشخیص گونه‌های بروسلا، از پرایمرهای مربوط به سکانس ژن BCSP31 بروسلا استفاده شد (جدول ۱). چرخه دمایی به صورت یک سیکل در 95°C درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، اتصال در ۱ دقیقه به مدت ۶۳ درجه سلسیوس، گسترش به مدت ۱ دقیقه در 72°C درجه سلسیوس و گسترش نهایی در 72°C درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت، حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر و سایر شرایط PCR به جز پرایمرهای مورد استفاده دقیقاً مشابه شرایط PCR تشخیص جنس بروسلا

آزمایشگاهی و از همه مهم‌تر ویژگی و حساسیت بالا اشاره کرد. مطالعات انجام‌شده در چند سال اخیر در ایران، متأسفانه تنها دربرگیرنده پژوهش‌هایی در راستای شناسایی جنس بروسلا در دام‌ها، حساسیت و ویژگی روش‌های مولکولی در شناسایی بروسلا و برتری روش‌های مولکولی نسبت به روش‌های شناسایی رایج بروسلوژیس (۸-۱۲) بوده و پژوهشی فراگیر در زمینه عوامل عفونی شایع بروسلوژیس در دام‌های مبتلا انجام نشده است. با توجه به اینکه بروسلوژیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک میان انسان و دام است و طیف گسترده‌ای از پستانداران اهلی و وحشی را مبتلا می‌سازد، و نیز با توجه به تأثیرات سوء بروسلوژیس بر اقتصاد و سلامت انسان، شناسایی گونه و بیوارهای این باکتری در دام‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ بنابراین هدف از انجام این پژوهش، شناسایی گونه و بیوارهای جنس بروسلا در گاوهای مبتلا با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع توصیفی-تحلیلی است که در سال ۱۳۹۵ در شهرستان خرم‌آباد انجام گرفت. در آغاز، ۸ تا ۱۰ میلی‌لیتر خون همراه با ماده ضد انعقاد EDTA (با غلظت ۰/۵ مولار) از ۱۰۰ رأس گاو از روستاهایی که تعداد زیادی موارد ابتلا به بروسلوژیس در میان دام‌های آن‌ها گزارش شده بود، گرفته شد. تمام نمونه‌های خونی به طور جداگانه به ترتیب با استفاده از تست‌های سرولوژی رزبنگال (Rose Bengal Plat test)، مرکاپتواتانول (2ME) Brucella (Mercaptoethanol) و کومیس رایت (Coombs Wright) (Agglutination Test-2) و کومیس رایت (Coombs Wright) آزمایش شدند. عیار $1:160$ تا $1:180$ که در تست‌ها نمایانگر عفونت فعال است، برای شناسایی نمونه‌های بروسلوژیس مثبت در نظر گرفته شد. همه نمونه‌های سرولوژی مثبت تا زمان انجام آزمایش، در دمای 20°C درجه سلسیوس نگهداری شدند.

کشت نمونه‌های مثبت

شش میلی‌لیتر خون از نمونه‌های مثبت برای سیستم محیط کشت BACTEC (Merck، آلمان) استفاده شد. محیط‌های BACTEC پس از مدت ۷ تا ۳۰ روز در دمای 35°C انکوبه و سپس هر نمونه بر روی محیط کشت بروسلا آگار (Merck، آلمان) به مدت ۷۲ ساعت در 36°C کشت داده شد. استخراج DNA به روش مرسوم جوشاندن (Boiling) انجام گرفت (۱۴،۱۳). در این روش پس از جمع‌آوری همه نمونه‌ها، آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در 38°C درجه قرار گرفتند و سپس $1/5$ میلی

تشخیص گونه بروسلا بود. در این مرحله محصول PCR در کنار DNA ladder (۱۰۰ bp) در ژل آگارز ۱ درصد (سیناژن، ایران) و در کنار سویه‌های استاندارد که به‌عنوان کنترل مثبت تهیه شده بود، برای شناسایی سویه‌ها، توسط دستگاه ژل داکيومنت (سبز، ایران) با نور UV ارزیابی شدند.

انجام گرفت. وجود باندهای ۴۸۰ bp و ۷۳۱ bp به ترتیب بیانگر گونه بروسلا/بورتوس و بروسلا ملی تنسیس است.

Multiplex PCR برای تعیین سویه

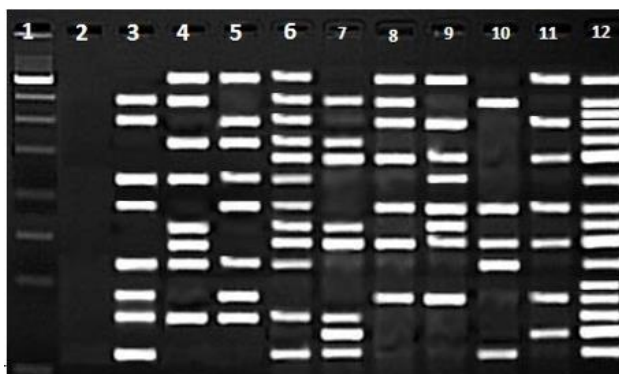
برای تشخیص سویه‌های بروسلا، از پرایمرهای مربوط به سکانس ژن BCSP31 بروسلا استفاده شد (جدول ۱). شرایط PCR به‌جز پرایمرهای مورداستفاده دقیقاً مشابه شرایط PCR

جدول ۱. پرایمرهای استفاده‌شده در این پژوهش

NO	Species	Strain	Sequences	Size	Biovars
۰	16srRNA F4. R2		TCGAGCGCCCAGGGG AACCATAGTGCTCCACTAA	905 bp	۱،۲،۳،۵
۱	<i>B. abortus</i>		GACGAACGGAATTTTCCAATCCC GCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	498 bp	۱،۲،۳
۲	<i>B. melitensis</i>		AAATCGCGTCTTGCTGGTCTGA TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	731 bp	۲،۱
۳	<i>B. abortus</i>	B3196	GCTCGGTTGCCAATATCAATG GGGTAAGCGTCGCCAGAA	150 bp	۵
۴	<i>B. abortus</i>	C68	AACTATAACCGTTGGCTCGGT GTCTGGACTTTCCGTTCCGCGC	275 bp	۹
۵	<i>B. abortus</i>	292	AGTGTTCGGCTGAATAATC ACCGGAACAGCAAATGAC	252 bp	۴
۶	<i>B. abortus</i>	870	CCGGATATGAATCTAACC TGTACAGGAACGCCATCA	630 bp	۶
۷	<i>B. abortus</i>	86/8/59	GGTTGGCGATCTGGTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	621 bp	۲
۸	<i>B. abortus</i>	544	TTGACATCCCGGTCGCGGTTA TTGACATTCGGGGTTTGGGCA	928 bp	۱
۹	<i>B. abortus</i>	45/20	TTAGGATCCATTTCAGAGCCTTCTCC AACAAAGCTTCAACGCTCTGATTAGAA	520 bp	۱
۱۰	<i>B. abortus</i>	S99	GTCGACAATGCAGCTGCGTTG ACCAAATACCATGGCCGCCAG	294 bp	۳
۱۱	<i>B. abortus</i>	M103	CGGGTCTTCTAGAGAGACAGAACC CCTGCCGTTGGTTCAGTTTCGTTAA	347 bp	۳
۱۲	<i>B. abortus</i>	S19	GCGCCGCGAGAACTTATCAA CGCCATGTAGCGGCGGTGA	400 bp	۱
۱۳	<i>B. abortus</i>	RB51	GCGCCGCGAGAACTTATCAA CGCCATGTAGCGGCGGTGA	494 bp	۱
۱۴	<i>B. abortus</i>	2380	GCCAACCAACAAATGCTCACAA TTAAGCGCTGACCATTTCCTTAC	675 bp	۱
۱۵	<i>B. abortus</i>	Tulya	AATGAGCTGAAATCGTAATTTGGCG ACAAAGCTTTTAGTGTAGTTCAGACCG	723 bp	۳
۱۶	<i>B. melitensis</i>	16M	TGGCTCGGTGCCAATATCAA CGCGCTTGCCCTCAGGCTCTG	193 bp	۱
۱۷	<i>B. melitensis</i>	Rev-1	GGCATAACCTGAGGAGCACT ATTACATCGGCTCAACTCG	211 bp	۱
۱۸	<i>B. melitensis</i>	Ether	AAATCGCGTCCGCTGGTCTGA TGCCGATCACTGGGCCTTCAT	669 bp	۳

یافته‌ها

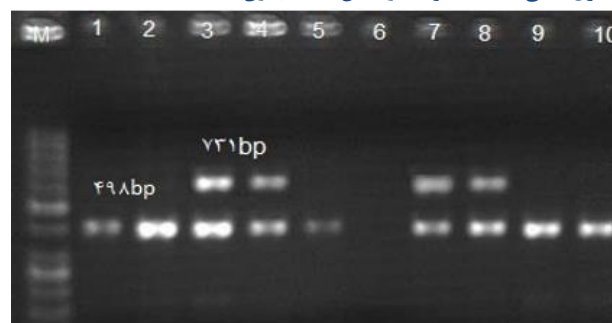
آلودگی به باکتری جنس بروسلا در تمام ۲۲ نمونه بررسی شده مورد استفاده در این پژوهش با کشت بر روی بروسلا آگار و انجام تست‌های سرولوژی مورد تأیید و تعیین جنس بروسلا قرار گرفتند (شکل ۱). با توجه به نتایج حاصل از تست Multiplex PCR، مشخص شد که ۱۹ نمونه (۸۶/۳ درصد) از جدایه‌های جنس بروسلا متعلق به گونه بروسلا آبورتوس و ۳ نمونه (۱۳/۶ درصد) متعلق به گونه بروسلا ملی تنسیس بودند (شکل ۲). همچنین یافته‌های حاصل از تشخیص سویه‌ها، بیانگر تشخیص ۱۱ سویه متعلق به بیووارهای A1, A2, A3, A4, A5 بروسلا آبورتوس بودند که بیووارهای ۱ و ۳ سویه‌ها به مراتب شیوع بیشتری در دام‌های آلوده داشتند. ۳ سویه دیگر متعلق به سویه‌های بروسلا ملی تنسیس شامل بیووارهای M1, M2, M3 بودند که سویه‌های بیووار ۱ بروسلا ملی تنسیس شیوع بیشتری نسبت به بیووارها M2 و M3 داشتند (شکل ۳). همچنین هیچ‌گونه بیواری که متعلق به بیووارهای ۶ و ۹ باشد، شناسایی نشد.



شکل ۳. یافته‌های حاصل از سویه بروسلا در نمونه‌های PCR مثبت چاهک ۱ مارکر ۱۰۰bp؛ ستون‌های ۳، ۶، ۷، ۱۰ باندهای ۱۵۰ bp سویه B2196 بروسلا آبورتوس بیووار ۵؛ ستون‌های ۷ و ۱۱ وجود باند ۱۹۲bp که نشان‌دهنده سویه 16 M بروسلا ملی تنسیس بیووار ۱ است؛ ستون‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ وجود باند ۲۱۱bp که نشان‌دهنده سویه REV-1 بروسلا ملی تنسیس بیووار ۱ است؛ ستون‌های ۳، ۵، ۸، ۹، ۱۱ وجود باند ۲۵۲bp که نشان‌دهنده سویه ۲۹۲ بروسلا آبورتوس بیووار ۴ است؛ ستون‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۰ وجود باندهای ۲۹۴ bp که نشان‌دهنده سویه‌های S99 بروسلا آبورتوس بیووار ۳ است؛ ستون‌های ۳، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ وجود باندهای ۳۴۷bp که نشان‌دهنده سویه M103 بروسلا آبورتوس بیووار ۳ است؛ ستون‌های ۴، ۶، ۷، ۹ وجود باندهای ۴۰۰bp که نشان‌دهنده سویه S19 بروسلا آبورتوس بیووار ۱ است؛ ستون‌های ۳، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ وجود باندهای ۴۹۴ bp که نشان‌دهنده سویه RB51 بروسلا آبورتوس بیووار ۱ است؛ ستون‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۹ وجود باندهای ۵۲۰ bp که نشان‌دهنده سویه ۴۵/۲۰ بروسلا آبورتوس بیووار ۱ است؛ ستون‌های ۳، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۱ وجود باندهای ۶۲۱ bp که نشان‌دهنده سویه ۵۹/۸/۸۶ بروسلا آبورتوس بیووار ۲ است؛ ستون‌های ۴، ۵، ۶، ۷ وجود باندهای ۶۶۹ bp که نشان‌دهنده سویه Ether بروسلا ملی تنسیس بیووار ۳ است؛ ستون‌های ۳، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۱ وجود باندهای ۶۷۵ bp که نشان‌دهنده سویه ۲۳۸۰ بروسلا آبورتوس بیووار ۱ است؛ ستون‌های ۳، ۴، ۶، ۷، ۸، ۱۰ وجود باندهای ۷۲۲ bp که نشان‌دهنده سویه Tulya بروسلا آبورتوس بیووار ۳ است؛ ستون‌های ۴، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۱ وجود باندهای ۹۲۸ bp که نشان‌دهنده سویه ۵۴۴ بروسلا آبورتوس بیووار ۱ است؛ ستون ۱۲ سویه‌های استاندارد و ستون ۶ به‌عنوان کنترل منفی (همه محتویات واکنش PCR بدون DNA).



شکل ۱. یافته‌های حاصل از واکنش PCR مثبت M چاهک مارکر، چاهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ جدایه‌های متعلق به جنس بروسلا (باندهای ۹۰۵bp)؛ چاهک ۷ کنترل مثبت (بروسلا ملی تنسیس استاندارد)؛ چاهک ۸ کنترل منفی (همه محتویات واکنش PCR بدون DNA).



شکل ۲. یافته‌های حاصل از گونه بروسلا در نمونه‌های PCR مثبت؛ M چاهک مارکر، چاهک‌های ۱، ۳، ۴، ۵، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ باندهای ۴۹۸bp بروسلا آبورتوس بیووارهای ۱، ۲، ۴ و چاهک‌های ۳، ۴ باندهای ۷۳۱ bp بروسلا ملی تنسیس بیووارهای ۱ و ۳؛ سویه ۵۱ RB به‌عنوان کنترل مثبت بروسلا آبورتوس و سویه REV-1 به‌عنوان کنترل مثبت بروسلا ملی تنسیس (ستون ۷) و ستون ۶ کنترل منفی (همه محتویات واکنش PCR بدون DNA).

جدول ۲. مقادیر مواد گوناگون در واکنش PCR

ماده	مقدار	غلظت نهایی	ماده
۰/۳۵mM	۰/۳۵mM	۰/۷μl	dNTP (۱۰mM)
۰/۸pmol	۱pmol	۰/۸μl	پرایمر رفت
۰/۸pmol	۱pmol	۰/۸μl	پرایمر برگشت
۲mM	۲mM	۰/۸μl	MgCl ₂ (۵۰mM)
-	۱μl	۰/۸μl	الگو (ژنوم)
۱/۷۵U	۱/۷۵U	۰/۷μl	تک DNA پلیمرز (۵۰۰U)
۰/۸x	۰/۸x	۱/۶μl	Buffer (10x)
	۰/۳۵mM	۱۱/۷۵μl	D.W
	۲۰μl		جمع

بحث

روش‌های سرولوژیک ویژگی کمی دارند و تیتراژ آنتی‌بادی برای مدت‌زمانی طولانی پس از درمان حتی در موارد بهبودی کامل مثبت باقی می‌ماند. در ایران به دلیل اندمیک بودن بروسلوزیس و شیوع بالای بروسلوزیس و همچنین غیراختصاصی بودن علائم بالینی آن، اهمیت روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی آشکار می‌شود (۱۶،۱۵). ابداع روش‌های شناسایی نوین، شناسایی دقیق جنس بروسلا را امکان‌پذیر ساخته است که در این میان راه‌اندازی روش Multiplex PCR که بتواند حداقل تعداد باکتری‌های شایع را پوشش دهد، مورد توجه قرار گرفته است (۱۸،۱۷). استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به سکانس‌های 16SrRNA و bcsp31 به‌عنوان ابزارهای مناسبی برای ردیابی باکتری‌ها در نمونه‌های بالینی و دامی به‌ویژه شناسایی جنس بروسلا تأیید شده‌اند (۲۰،۱۹). در سال ۲۰۰۸ Zowgi و همکاران، با استفاده از روش‌های سرولوژی رایج، بیووارهای M1 و M2 بروسلا ملی تنسیس و بیووارهای A1، A2، A3 گونه بروسلا آبورتوس جدا شده از دام‌ها را در ایران گزارش کردند (۲۱). در مطالعه Doosti و همکاران (۲۰۱۱) نیز از ۸۳ نمونه سرمی گاوهای مثبت در PCR، ۹ مورد به بروسلا ملی تنسیس، ۶۹ مورد به بروسلا آبورتوس و ۵ مورد هم‌زمان به بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس آلوده بودند (۲۲). در پژوهش پیش رو، مشخص شد که ۱۹ نمونه (۸۶/۳ درصد) از جدایه‌های تأیید شده جنس بروسلا متعلق به گونه بروسلا آبورتوس و ۳ نمونه (۱۳/۷ درصد) متعلق به گونه بروسلا ملی تنسیس بودند که این نتایج با نتایج پژوهش ذکر شده همخوانی دارد.

نتایج حاصل از Multiplex PCR برای شناسایی سویه‌ها نشان داد که بیووارهای جدا شده بروسلا آبورتوس شامل

بیووارهای A5، A4، A3، A2، A1 بودند که شمار بیووارهای ۱ و ۳ بروسلا آبورتوس به‌مراتب بیشتر از شمار دیگر بیووارها بود. همچنین بیووارهای شناسایی‌شده بروسلا ملی تنسیس شامل بیووارهای M3، M1، M2 بودند که سویه‌های بیووار ۱ به مراتب بیشتر از دیگر بیووارها بودند. در سال ۲۰۱۴، Esmaeili بیووارهای M3، M1، M2 متعلق به گونه بروسلا ملی تنسیس و بیووارهای A5، A4، A3، A2، A1 متعلق به گونه بروسلا آبورتوس جدا شده از دام‌ها را در ایران گزارش کرد. نتایج پژوهش او نشان‌دهنده شیوع بیشتر سویه‌های بیووار ۱ در بروسلا ملی تنسیس و بیووارهای ۱ و ۳ بروسلا آبورتوس در دام‌های آلوده کشور بود (۲۳). همچنین Zowghi و همکاران (۲۰۰۸) سویه‌های A1 و A3 را بیووارهای غالب در ایران گزارش کردند (۲۱). Betsy و همکاران (۲۰۱۳) نیز در آمریکا، شیوع بیشتر سویه‌های متعلق به بیووار ۱ بروسلا ملی تنسیس را در پژوهش خود گزارش کردند (۲۴) که این نتایج با نتایج پژوهش پیش رو همخوانی دارند. همچنین حضور سویه‌های متعلق به بیووارهای ۴ و ۹ و عدم حضور بیووارهای ۶ در این پژوهش نسبت به پژوهش‌های ذکر شده (۲۱، ۲۳) می‌تواند به علت تفاوت در روش‌های جداسازی و تشخیصی (کشت و سرولوژی با روش‌های مولکولی)، موقعیت جغرافیایی، گسترش بیووارها در دام‌ها و ناقلین گوناگون که به‌عنوان میزبانان این میکروارگانیسم‌ها هستند، باشد. نیز جز اینها، می‌تواند به دلیل ظهور کلنی‌های مقاوم باکتریایی و مولد بتالاکتامازهای گسترده در دام‌های یک ناحیه و استفاده بی‌رویه و مدیریت نشده آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های گوناگون عفونی در دام‌های بررسی شده باشد. همچنین باید در نظر داشت که حضور سویه‌های متفاوت و جدید به‌عنوان عوامل عفونی می‌تواند به احتمال فراوان با قدرت

بسیار بالایی در تشخیص بروسلا برخوردار است و می‌تواند موجب ارتقای سطح کیفی و سرعت تشخیصی بروسلا شود.

تقدیر و تشکر

با سپاس فراوان از همکاری دکتر مراد بیرانوند، دکتر محمد پروانه و خانم طاهره بیرانوند و هادی یگانه جم که در این پژوهش ما را یاری کردند. این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد فرزاد عالی زاده مفرد به شماره تحقیقاتی ۱۰۳۳۰۵۱۳۹۲۲۰۳۰ می‌باشد.

تعارض منافع

میان نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

بیماری‌زایی سویه‌ها در ارتباط باشد که این امر، کنترل بروسلوزیس در کشور را پیچیده می‌کند؛ بنابراین استفاده از روش PCR را می‌توان یک استراتژی کارآمد و مناسب برای شناسایی سویه‌های بروسلا مولد عفونت و اجتناب از معایب روش‌های سرولوژی سنتی دانست.

یکی از نقاط قوت این پژوهش، شناسایی عوامل عفونی بروسلوزیس با روش PCR است که در درمان بروسلوزیس اهمیت دارد و از نقاط ضعف این پژوهش، یکی عدم استخراج DNA از شیر دام‌ها است؛ زیرا استخراج DNA از شیر دام‌ها می‌توانست در شناسایی بیشتر و دقیق‌تر گونه و بیووارها کمک شایانی کند.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های این پژوهش می‌توان بیان کرد که روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه از حساسیت و دقت

References

1. Molina-Flores B. Field experience with the control of *Brucella melitensis* from selected countries. In: *Brucella melitensis in Eurasia and The Middle East*. 2010;(10):2- 9.
2. Gupta VK, Nayakwadi S, Kumar A, Gururaj K, Kumar A & Pawaiya RS. Markers for the molecular diagnosis of brucellosis in animals [Approaches in diagnosis and management of diseases of livestock and poultry]. *Adv. Anim* 2014;2(3):31-39.
3. Büyük F, Şahin M. Investigation of *Brucella* species from various samples of aborted cattle in Turkey by cultural and molecular methods and epidemiological analysis of cases. *vetdergi. kafkas.edu* 2011;17(5): 809-816.
4. Gülhan T, Aksakal A, Ekin İH, Boynukara B. Retrospective Evaluation of Examined Materials for Diagnosis in University Yuzuncu Yil Faculty of Veterinary Medicine Microbiology Department Laboratory. *vfdergi.yyu* 2011;22(2):127-132.
5. Pacheco WA, Genovez ME, Pozzi CR, Silva L.M.P, Azevedo SS, Did C. et al. Excretion of *Brucella abortus* vaccine B19 strain during a reproductive cycle in dairy cows. *Braz. J. Microbiol* 2012;43:594-601.
6. Silva J, Carina M, Cleyzer L, Gustavo A, Lara B, Paulo C.M. et al. *Brucella abortus* detected in cheese from the Amazon region: differentiation of a vaccine strain (B19) from the field strain in the states of Pará, Amapá and Rondônia, Brazil. *Pesq. Vet. Bras* 2016;36(8):705-710.
7. Silva CL, Sales GA, Santos Neto JG, Silva J.S, De Lara APSS, Lima SCG. et al. Detecção de fraude em amostras comerciais de queijo bubalino por adição de leite bovino por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex [Fraud detection in commercial samples of buffalo cheese by addition of bovine milk using multiplex polymerase chain reaction(PCR)]. *Revta Inst* 2015;74:21-29.
8. Shahbazi Y, Afshari Safavi E, Shavisi N. The epidemiological survey of animal brucellosis in Kermanshah province. *IJVCS* 2015;10(1):73-97.
9. Mirnejad R, Hosseini Doust R, Kachuei R, Mojtaba Mortazavi S, Khoobdel M, Ahamadi A. Simultaneous detection and differentiates of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* by combinatorial PCR. *Elsevier* 2012;5(1): 24-28.
10. Haghghi M, Ahadi AM, Madani M, Mahzoonieh MR. Design and optimization of single reaction Multiplex Nested PCR for enrichment of PCR product in detection of *Brucella*. *IJVCS* 2012;7(1): 33-39.
11. Pakzad I, Bahmani S, Ghafouryan S, Hosainzadegan H. Diagnosis of human brucellosis by PCR using 17/112 and 16srRNA genes compared with common serological tests. *AMUJ* 2012; 14(3):31-39.
12. Peeri Dogah H, Valinejad Z, Pourfarzi F. Evaluation of three DNA extraction methods for detection of *brucella* DNA in human serum samples. *AMUJ* 2012;14(3): 40-48.

13. Matrone M, Keid L B, Rocha V.C.M, Vejarano M.P. et al; Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308; *sciel* 2009;14(40): 480-489.
14. Aras Z, Taspinar M, Aydin I, Novel A. Polymerase Chain Reaction to Detect *Brucella canis* in Dogs. *Vetdergikafkas* 2015;21(2):169-172.
15. Saberi M, Hamali H, Jafari Joozani R, Nofouzi K, Noorsaadat GH. A serological and molecular (PCR) survey on abortions caused by *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine strain in sheep herds of Tabriz-Iran. *Jnasci* 2013;2:(9)340-343.
16. Mohamed G, Khoudair M, Ramadan, Abdel Mon,em H, Amos PCR as a Rapid Screening Method for Differentiation of Infected and Vaccinated Cattle and Sheep with Brucellosis. *Global Veterinaria* 10.2013; (6): 748-756.
17. Arasoğlu T, Güllüce M, Özkan H, Adigüzel A, Şahin F. PCR detection of *Brucella abortus* in cow milk samples collected from Erzurum, Turkey. *Turkish J. Med. Sci* 2013;43:501-508.
18. Marei A, Boghdadi G, Abdel-Hamed N, Hessin R, Abdoel T, Smits H, et al. Laboratory diagnosis of human brucellosis in Egypt and persistence of the pathogen following treatment. *J Infect Dev Ctries* 2011;5(11): 86-91.
19. Wang T, Wang Z, Zhang Y, Bai L, Zhao Y, Liu, Ma A, Yu H. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of human brucellosis. *ann-clinmicrob. Biomed centra.* 2014;13(11)13-31.
20. Mohamed G, Khoudair M, Ramadan, Abdel Mon,em H, Amos PCR as a Rapid Screening Method for Differentiation of Infected and Vaccinated Cattle and Sheep with Brucellosis. *Global Veterinaria* 10 2013;(6):748-756.
21. Zowghi E, Ebadi A, Yarahmadi M. Isolation and identification of *Brucella* organisms in Iran. *SBMU* 2008;3(4):185-188.
22. Doosti A, Ghasemidehkordi P. Application of real-time PCR for identification and differentiation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in cattle. *tru.uni-sz* 2011;4:29-35.
23. Esmaili H. Brucellosis in Islamic republic of Iran. *ISMB* 2014;3(3):47-57.
24. Betsy J, Darla R, Steven C, Olsen, Allen E. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle, *J Vet Diagn Invest* 2003;15:374-378.

