Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 5 (November - December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

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.com

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 Co_2 condition.The 16SrRNA gene was used as the target for the detection of *Brucella* genus and the bcsp31 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

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۵ – اذر-دی ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

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

فرزاد عالی‌زاده مفرد، مریم پروینی کهنه شهری

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

اطلاعات مقاله

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.com

چکیده

زمینه و اهداف: بروسلوزیس یک بیماری عفونی زئونوتیک است که مسئول اختلالات در باروری جانوران و زیان‌های اقتصادی قابل‌توجهی در زنجیرهٔ گوشت و شیر می‌شود و به دلیل اینکه یک بیماری آنتروپوزئونوز مزمن است، اختلالاتی را در باروری جانوران به وجود می‌آورد؛ بنابراین هدف از انجام این پژوهش، بررسی و تشخیص گونه‌ها و تعیین سویه‌های مولّدِ عفونت در گاوهای مبتلا با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرازِ 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 درجهٔ سلیسیوس به مدت ۵ روز انکوبه و پس از آن هر نمونه روی یک پیلت 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 جمع‌آوری‌شدهٔ گاوها، ۲۲ مورد مثبت بود. از ۲۲ نمونهٔ 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 گاوهای استان لرستان هستند. استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

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 درون‌سلولی 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، اکثراً 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 دام های 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 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 غیرعفونیِ دیگر است، بلکه در بیشتر موارد روش‌های تشخیصی قادر به جداسازی ارگانیسم‌ها نیستند. معایب برجستهٔ 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 ارگانیسم در آزمایشگاه مخاطره‌آمیز و نامطمئن باشد.

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

آزمایشگاهی و از همه مهم‌تر ویژگی و حساسیت بالا اشاره کرد. مطالعات انجام‌شده در چند سال اخیر در ایران، متأسفانه تنها دربرگیرندهٔ 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 بروسلوزیس (۸-۱۲) بوده و پژوهشی فراگیر درزمینهٔ عوامل عفونی شایع بروسلوزیس در دام‌های مبتلا انجام نشده است. با توجه به اینکه بروسلوزیس 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 بروسلوزیس بر اقتصاد و سلامت انسان، شناسایی گونه و بیوارهای این باکتری در دام ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ بنابراین هدف از انجام این پژوهش، شناسایی گونه و بیووارهای جنس *بروسلا* در گاوهای مبتلا با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع توصیفی _تحلیلی است که در سال ۱۳۹۵ در شهرستان خرم آباد انجام گرفت. در آغاز، ۸ تا ۱۰ میلی‌لیتر خون همراه با مادهٔ ضد انعقاد EDTA (با غلظت ۰/۵ مولار) از ۱۰۰ رأس گاو از روستاهایی که تعداد زیادی موارد ابتلا به بروسلوزیس 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 (Mercaptoethanol (2ME) Brucella Agglutination Test-2) و کومبس رایت (Coombs Wright) آزمایش شدند. عیار۱:۱۶۰ تا ۱:۱۸۰ که در تست‌ها نمایانگر عفونت فعال است، برای شناسایی نمونه‌های بروسلوزیس مثبت در نظر گرفته شد. همهٔ نمونه‌های سرولوژی مثبت تا زمان انجام آزمایش، در دمای ۲۰ درجهٔ 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^{0}C ۳۵ انکوبه و سپس هر نمونه بر روی محیط کشت *بروسلا* آگار (Merck، آلمان) به مدت ۷۲ ساعت در^{0}C ۳۶ کشت داده شد. استخراج DNA به روش مرسومِ جوشاندن (Boiling) انجام گرفت (۱۳،۱۴). در این روش پس از جمع‌آوری همهٔ نمونه‌ها، آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۸ درجه قرار گرفتند و سپس ۱/۵ میلی لیتر از محیط کشت به میکروتیوب‌ها انتقال یافتند و در ادامه با سانتریفوژ رسوب حاوی باکتری‌ها در آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری در ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. سپس میکروتیوب‌ها در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ 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 صفحهٔ چشمی مخصوص، اسپیکروفوتومتری نمونه با اشعهٔ UV انجام شد که در دستگاه میزان جذب نور را در فاصلهٔ ۲۲۰ تا ۳۵۰ نانومتر برای DNA به‌صورت نمودار و نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۳۰ (نشان‌دهندهٔ میزان خلوص و آلودگی DNA) و در نهایت غلظت DNA را به ۱ng/µL گزارش کرد.

واکنش PCR برای تعیین جنس

برای تشخیص جنس *بروسلا*، از پرایمرهای مربوط به سکانس ژن 16SrRNA بروسلا (جدول۱) پس از مرحلهٔ blast قرار دادن، استفاده شد. انجام PCR در میکروتیوب های ۰/۲ میلی‌لیتر استریل و با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، در دستگاه ترموسایکلر (SENSOQUEST، آلمان) انجام شد. برای تکثیر ژن هدف، بهینه‌سازی برنامهٔ دمایی توسط دستگاه Rotogene (Giagen، آلمان) به‌صورت ۹۵°C در ۵ دقیقه، ۹۴°C در ۶۰ ثانیه، ۵۵°C در ۶۰ ثانیه، ۶۵°Cدر ۶۰ ثانیه و ۷۲°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 داکیومنت (سبز، ایران) با نور UV باندهای تشکیل‌شده، دیده شد. در صورت دیده شدن باند مورد نظر (۹۰۵ bp) جدایهٔ موردنظر 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). چرخهٔ دمایی به‌صورت یک سیکل در ۹۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، اتصال در ۱ دقیقه به مدت ۶۳ درجهٔ سلسیوس ، گسترش به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجهٔ سلسیوس و گسترش نهایی در ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت، حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر و سایر شرایط PCR به جز پرایمرهای مورد استفاده دقیقا مشابه شرایط PCR تشخیص جنس *بروسلا*

انجام گرفت. وجود باندهای ۴۸۰ bp و ۷۳۱ bp به ترتیب بیانگر گونهٔ *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* است.

Multiplex PCR برای تعیین سویه

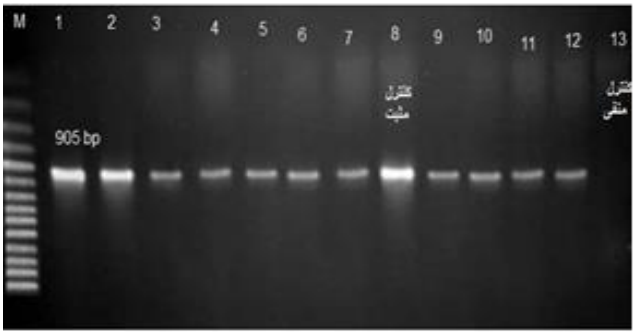
برای تشخیص سویه‌های *بروسلا*، از پرایمرهای مربوط به سکانس ژن BCSP31 *بروسلا* استفاده شد (جدول ۱). شرایط PCR به‌جز پرایمرهای مورداستفاده دقیقا مشابه شرایط PCR تشخیص گونهٔ *بروسلا* بود. در این مرحله محصول PCR در کنار DNA ladder (۱۰۰bp) در ژل آگارز ۱ درصد (سیناژن، ایران) و در کنار سویه‌های استاندارد که به‌عنوان کنترل مثبت تهیه شده بود، برای شناسایی سویه‌ها، توسط دستگاه ژل داکیومنت (سبز، ایران) با نور UV ارزیابی شدند.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده‌شده در این پژوهش

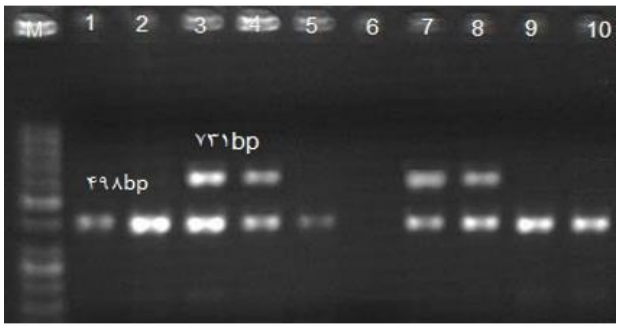
NO	Species	Strain	Sequences	Size	Biovars
۰	16srRNA F4. R2		TCGAGCGCCCGCAAGGGG AACCATAGTGTCTCCACTAA	905 bp	۱،۲،۳،۵
۱	*B. abortus*		GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC GCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	498 bp	۱،۲،۳
۲	*B.melitensis*		AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	731 bp	۲،۱
۳	*B. abortus*	B3196	GCTCGGTTGCCAATATCAATG GGGTAAAGCGTCGCCAGAA	150 bp	۵
۴	*B. abortus*	C68	AACTATAACCGTTGGCTCGGT GTCTGGACTTTCCGTTCGCGC	275 bp	۹
۵	*B. abortus*	292	AGTGTTTCGGCTGAATAATC ACCGGAACAGCAAATGAC	252 bp	۴
۶	*B. abortus*	870	CCGGATATGAATCTAACC TGTACAGGAACGCCATCA	630 bp	۶
۷	*B. abortus*	86/8/59	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	621 bp	۲
۸	*B. abortus*	544	TTGACATCCCGGTCGCGGTTA TTGACATTCGGGGTTTGGGCA	928 bp	۱
۹	*B. abortus*	45/20	TTAGGATCCATTCAGAGCCTTCTCC AACAAGCTTCAACGTCTGATTAGAA	520 bp	۱
۱۰	*B. abortus*	S99	GTCGACAATGCAGCTGCGTTG ACCAAATACCATGGCCGCCAG	294 bp	۳
۱۱	*B. abortus*	M103	CGGGTCTTCCTAGAGAGACAGAACC CCTGCCGTTGGTCAGTTTCGTTAA	347 bp	۳
۱۲	*B. abortus*	S19	GCGCCGCGAGAACTTATCAA CGCCATGTAGCGGCGGTGA	400 bp	۱
۱۳	*B. abortus*	RB51	GCGCCGCGAGAACTTATCAA CGCCATGTAGCGGCGGTGA	494 bp	۱
۱۴	*B.a bortus*	2380	GCCAACCAACAAATGCTCACAA TTAAGCGCTGACCATTTCCTTCAC	675 bp	۱
۱۵	*B. abortus*	Tulya	AATGAGCTGAAATCGTAATTTTGGCG ACAAAGCTTTTAGTGTAGTTCAGACCG	723 bp	۳
۱۶	*B. melitensis*	16M	TGGCTCGGTGCCAATATCAA CGCGCTTGCCTTCAGGTCTG	193 bp	۱
۱۷	*B. melitensis*	Rev-1	GGCATAACCTGAGGAGCACT ATTACATCGGCTCAACTCG	211 bp	۱
۱۸	*B. melitensis*	Ether	AAATCGCGTCCGCTGGTCTGA TGCCGATCACTTGGGCCTTCAT	669 bp	۳

یافته‌ها

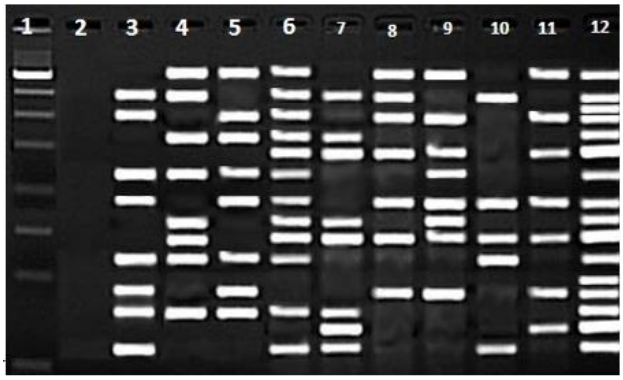
آلودگی به باکتری جنس بروسلا در تمام ۲۲ نمونهٔ بررسی‌شدهٔ مورداستفاده در این پژوهش با کشت بر روی بروسلا آگار و انجام تست‌های سرولوژی مورد تأیید و تعیین جنس *بروسلا* قرار گرفتند (شکل ۱). با توجه به نتایج حاصل از تست Multiplix PCR، مشخص شد که ۱۹ نمونه (۸۶/۳ درصد) از جدایه‌های جنس *بروسلا* متعلق به گونهٔ *بروسلا آبورتوس* و ۳ نمونه (۱۳/۶ درصد) متعلق به گونهٔ *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 سویهٔ 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 M3 و M2 داشتند (شکل ۳). همچنین هیچ‌گونه بیووارى که متعلق به بیووارهای ۶ و ۹ باشد، شناسایی نشد.



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 (همهٔ محتویات واکنش PCR بدون DNA).



شکل ۲. یافته‌های حاصل از گونه *بروسلا* در نمونه‌های PCR مثبت؛ M چاهک مارکر، چاهک‌های ۱۱،۱۰،۹،۸،۵،۴،۳،۲۱ باندهای ۴۹۸bp *بروسلا آبورتوس* بیووار های ۱، ۲، ۴ و چاهک‌های ۳، ۴،۸ باندهای ۷۳۱ bp *بروسلا ملی تنسیس* بیووار های ۳ و ۱؛ سویهٔ RB ۵۱ به‌عنوان کنترل مثبت *بروسلا آبورتوس* و سویهٔ REV-1 به‌عنوان کنترل مثبت *بروسلا ملی تنسیس* (ستون ۷) و ستون ۶ کنترل منفی (همهٔ محتویات واکنش PCR بدون DNA).



شکل ۳. یافته‌های حاصل از سویه بروسلا در نمونه‌های PCR مثبت چاهک 1 مارکر ۱۰۰bp؛ ستون‌های ۳، ۶، ۷، ۱۰ باندهای ۱۵۰ bp سویهٔ B۲۱۹۶ *بروسلا آبورتوس* بیووار ۵؛ ستون‌های ۷ و ۱۱ وجود باند ۱۹۳bp که نشان‌دهندهٔ سویهٔ 16 M *بروسلا ملی تنسیس* بیووار ۱ است؛ ستون‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ وجود باند ۲۱۱bp که نشان‌دهندهٔ سویهٔ REV-1 *بروسلا ملی تنسیس* بیووار ۱ است؛ ستون‌های ۳، ۵، ۸، ۹، ۱۱ وجود باند ۲۵۲bp که نشان‌دهندهٔ سویهٔ ۲۹۲ *بروسلا آبورتوس* بیووار ۴ است؛ ستون‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۰ وجود باندهای ۲۹۴ bp که نشان‌دهندهٔ سویه‌های S۹۹ *بروسلا آبورتوس* بیووار ۳ است؛ ستون‌های ۳، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ وجود باندهای ۳۴۷bp که نشان‌دهندهٔ سویهٔ M۱۰۳ بروسلا آبورتوس بیووار ۳ است؛ ستون‌های ۴، ۶، ۷، ۹ وجود باندهای ۴۰۰bp که نشان‌دهندهٔ سویهٔ S19 *بروسلا آبورتوس* بیووار ۱ است؛ ستون‌های ۳، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ وجود باندهای ۴۹۴ bp که نشان‌دهندهٔ سویهٔ RB51 *بروسلا آبورتوس* بیووار ۱ است؛ ستون‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۹ وجود باندهای ۵۲۰ bp که نشان‌دهندهٔ سویهٔ ۴۵/۲۰ *بروسلا آبورتوس* بیووار ۱ است؛ ستون‌های ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۱ وجود باندهای ۶۲۱ bp که نشان‌دهندهٔ سویهٔ ۵۹/۸/۸۶ بروسلا آبورتوس بیووار ۲ است؛ ستون‌های ۴، ۵، ۶، ۷ وجود باندهای ۶۶۹ bp که نشان‌دهندهٔ سویهٔ Ether *بروسلا ملی تنسیس* بیووار ۳ است؛ ستون‌های ۳، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۱ وجود باندهای ۶۷۵ bp که نشان‌دهندهٔ سویهٔ ۲۳۸۰ بروسلا آبورتوس بیووار ۱ است؛ ستون‌های ۳، ۴، ۶، ۷، ۸، ۱۰ وجود باندهای ۷۲۲ bp که نشان‌دهندهٔ سویهٔ Tulya *بروسلا آبورتوس* بیووار ۳ است؛ ستون‌های ۴، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۱ وجود باندهای ۹۲۸ bp که نشان‌دهندهٔ سویهٔ ۵۴۴ بروسلا آبورتوس بیووار ۱ است؛ ستون ۱۲ سویه‌های استاندارد و ستون ۶ به‌عنوان کنترل منفی (همهٔ محتویات واکنش PCR بدون DNA).

جدول ۲. مقادیر مواد گوناگون در واکنش PCR

ماده	غلظت نهایی	مقدار	ماده
dNTP (۱۰mM)	۰/ ۷µl	۰/ ۳۵mM	**۰/ ۳۵mM**
پرایمر رفت	۰/ ۸µl	۱pmol	**۰/ ۸pmol**
پرایمر برگشت	۰/ ۸µl	۱pmol	**۰/ ۸pmol**
$MgCl_۲$ (۵۰mM)	۰/ ۸µl	۲mM	**۲mM**
الگو (ژنوم)	۰/ ۸µl	۱µl	_
تک DNA پلیمراز (۵۰۰U)	۰/ ۷µl	۱/ ۷۵U	**۱/ ۷۵U**
Buffer (10x)	۱/ ۶µl	۰/ ۸x	**۰/ ۸x**
D.W	۱۱/ ۷۵µl	۰/ ۳۵mM	
جمع		۲۰µl	

بحث

روش‌های سرولوژیک ویژگی کمی دارند و تیتر 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، موردتوجه 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 A3,A2,A1 گونهٔ *بروسلا آبورتوس* جداشده از دام‌ها را در ایران گزارش کردند (۲۱). در مطالعه Doosti و همکاران (۲۰۱۱) نیز از ۸۳ نمونهٔ 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 شدهٔ جنس *بروسلا* متعلق به گونهٔ *بروسلا آبورتوس* و ۳ نمونه (۱۳/۷ درصد) متعلق به گونهٔ *بروسلا ملی تنسیس* بودند که این نتایج با نتایج پژوهش ذکرشده همخوانی دارد.

نتایج حاصل از Multiplex PCR برای شناسایی سویه‌ها نشان داد که بیووارهای جدا شدهٔ *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 شناسایی‌شدهٔ *بروسلا ملی تنسیس* شامل بیووارهای M1,M2, M3 بودند که سویه‌های بیووار ۱ به مراتب بیشتر از دیگر بیووارها بودند. در سال ۲۰۱۴، Esmaeili بیووارهای M1,M2, M3 متعلق به گونهٔ *بروسلا ملی تنسیس* و بیووارهای A5,A4,A3,A2,A1، متعلق به گونهٔ *بروسلا آبورتوس* جداشده از دام‌ها را در ایران گزارش کرد. نتایج پژوهش او نشان‌دهندهٔ شیوع بیشتر سویه‌های بیووار ۱ در *بروسلا ملی تنسیس* و بیووارهای ۱ و ۳ *بروسلا آبورتوس* در دام‌های آلودهٔ 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 ملی‌تنسیس* 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 ذکرشده (۲۳،۲۱) 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 مولّد بتالاکتامازهای گسترده در دام‌های یک ناحیه و استفادهٔ بی‌رویه و مدیریت نشدهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های گوناگون عفونی در دام‌های بررسی‌شده باشد. همچنین باید در نظر داشت که حضور سویه‌های متفاوت و جدید به‌عنوان عوامل عفونی می‌تواند به احتمال فراوان با قدرت

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 پلیمراز چندگانه از حساسیت و دقت 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 پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد فرزاد عالی زاده مفرد به شمارهٔ تحقیقاتی ۱۰۳۳۰۵۱۳۹۲۲۰۳۰ می باشد.

تعارض منافع

میان نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

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. Invesigation 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. Haghighi 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 l7/l12 and 16srRNA genes compared with common serological tests. AMUJ 2012; 14(3):31-39.
12. Peeri Dogaheh 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 extrac tion 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 Br ucella 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 thediagnosis 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 differenti ation of Brucella abortus and Brucella melitensisin cattle. tru.uni-sz 2011;4:29-35.

23. Esmaeili 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, aneimproved version of the Brucella AMOS polymerase chain reaction assay for cattle, J Vet Diagn Invest 2003;15:374-378.