



بیماری های قابل انتقال بین انسان و حیوان



مقاله پژوهشی

بررسی آلودگی عقده های لنفاوی لاشه های گاو و گوسفند استان قم به باکتری بروسلا با

روش Real Time PCR

احمد شوندی^{*}، امیر شاکریان

گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران



^{*}نویسنده مسئول: haram9463@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۵

چکیده

بروسلوز یکی از بیماری های مهم مشترک بین انسان و دام و اندمیک در ایران می باشد. بنابراین تشخیص سریع این بیماری نقش مهمی در بهبود سلامت عمومی دارد. با توجه به ویژگی هایی مانند سخت رشد بودن، خطرات مرتبط با کشت و وجود واکنش های متقاطع با باکتری های دیگر در آزمون سرولوژیک، در مطالعه حاضر از Real-time PCR به عنوان روش با حساسیت و اختصاصیت بالا جهت بررسی آلودگی لاشه های گاو و گوسفند به گونه های باکتری بروسلا استفاده شد. در این مطالعه از عقده های لنفاوی دام های کشتار شده شامل ۳۰ نمونه گوسفند و بز و ۱۴ نمونه گاو در کشتارگاه های شهرستان قم جمع آوری نمونه انجام پذیرفت و با استفاده از سه جفت پرایمر مربوط به ژن IS711، BMEII0466 و ژن BruAb2_0168 که به ترتیب اختصاصی جنس بروسلا و گونه های *B. abortus* و *melitensis* می باشد آزمون Realtime PCR انجام شد. از ۴۴ نمونه مورد آزمایش ۱۱ نمونه (۲۰/۳۷ درصد) آلوده به باکتری بروسلا تشخیص داده شد که سه نمونه آلوده به *B. melitensis* (۵/۵ درصد) و هشت نمونه آلوده به *B. abortus* (۱۴/۸۱ درصد) بودند. با توجه به نتایج از سه نمونه مثبت مربوط به *B. melitensis* دو نمونه مربوط به گوسفند و یک نمونه مربوط به گاو و از هشت نمونه مثبت *B. abortus* همگی مربوط به نمونه های اخذ شده از گاو گزارش گردید. بنابراین با توجه به درصد آلودگی نمونه ها به باکتری بروسلا و زیان های بهداشتی و اقتصادی این بیماری، لازم است برنامه های کنترلی و نظارتی دقیق تر و کارآمدتری جهت پیشگیری و کنترل بیماری اتخاذ گردد.

کلمات کلیدی: بروسلا، *B. abortus*، *B. melitensis*، Real time PCR



مقدمه

بروسلوز^۱ یک بیماری مشترک بین انسان و دام می باشد که هم دام های اهلی و هم حیوانات وحشی را تهدید می کند و باعث سقط جنین و ناباروری در آن ها می شود. عوامل عفونی این بیماری باکتری هایی از جنس بروسل^۲ هستند که گرم منفی و هوازی اختیاری هستند و می توانند درون ماکروفاژها به صورت درون سلولی تکثیر کنند (۲۱). گونه های بروسل به طور کلاسیک به شش گونه اصلی طبقه بندی می شوند که دو گونه بروسل/برتوس^۳ و ملیتنسیس^۴ باعث سقط جنین در نشخوارکنندگان می شوند (۳). در اکثر موارد بروسلوز در ایران، *B. abortus* و *B. melitensis* عوامل اصلی بیماری را هستند (۴).

این باکتری به طور بالقوه ای برای انسان بیماری زا بوده و عامل بروسلوز انسانی یا تب مالت^۵ می باشد. به رغم کنترل این بیماری در اغلب کشورها، بیماری در ایران به صورت اندمیک مشاهده می گردد (۵).

انتقال از طریق مواد غذایی راه مهم و اصلی آلودگی انسان ها در مناطق شهری است. مصرف شیر تازه یا محصولات آن که از شیر نجوشیده بدست می آیند به عنوان منبع اصلی آلودگی در نواحی شهری عمل می کند.

روش های تشخیصی مبتنی بر کشت با وجود آنکه استاندارد طلایی محسوب می شوند حساسیت پایینی تا ۷۰ درصد دارند. علی رغم توسعه فراوان و دسترسی آسان تست های سرولوژیک، مشکل مهم این تست ها ایجاد نتایج مثبت کاذب به دلیل واکنش متقاطع با آنتی ژن های سایر میکروارگانیسم ها مانند یرسینیا/نتروکولیتیکا، سالمونلا/اورینتالیس، ویبرو کلرا، فرانسیسلا تورانسسیس و/شریشیا کلی می باشد (۶).

کاربرد روش های نوین تشخیصی از جمله PCR و مشتقات آن که ساده، سریع و حساس بوده و نیز اختصاصیت بیشتری نسبت به تست های سرولوژیک دارد، بر مبنای تشخیص اسید نوکلئیک توسعه یافته اند (۷ و ۸). بنابراین استفاده از روش های مولکولی به عنوان تست های تاییدی جهت رفع مشکلات مربوط به آزمون های سرولوژیک مانند نبود الگوهای مناسب جهت تفسیر تیتراهای آنتی بادی در مناطق اندمیک، ضرورت یافته است. گزارشاتی وجود دارد که نشان می دهند که تشخیص DNA بروسل توسط PCR حساس تر از کشت خون و اختصاصی تر از آزمون سرولوژیک برای تشخیص بیماری حاد می باشد (۹ و ۱۰).

یکی از مشتقات PCR تکنیک Real-time PCR می باشد که علاوه بر شناسایی، با حذف بسیاری از فرایندهای وقت گیر، امکان بررسی میزان محصول را در حین انجام واکنش در نمونه ها میسر ساخته است.

در این مطالعه به منظور تشخیص سریع و دقیق تر بیماری بروسلوز به بررسی ژنومی *B. melitensis* و *B. abortus* در عقده های لنفاوی لاشه های کشتار شده به روش Real time PCR می پردازیم.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

تعداد ۹۵ نمونه از عقده های لنفاوی دام های کشتار شده (گاو، گوسفند و بز) به طور تصادفی از کشتارگاه های شهرستان قم جمع آوری گردید. جمع آوری نمونه ها در فصول تابستان و پاییز سال ۱۴۰۱ انجام پذیرفت. در مجموع از ۹۵ نمونه اخذ شده، تعدادی از نمونه های اخذ شده به علت محدودیت های آزمایشگاهی حذف شد. نهایتاً از کل ۴۴ نمونه باقی مانده (شامل ۳۰ نمونه از

¹ Brucellosis

² Brucella spp

³ B. abortus

⁴ B. melitensis

⁵ Malta fever



بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان



گوسفند و بز و ۱۴ نمونه از گاو) آزمون انجام شد. ۱۷ نمونه از دام‌ها تست رزینگال مثبت و مابقی نمونه‌ها تست رزینگال منفی داشتند. نتایج حاصله در جدول‌های یک تا چهار به صورت خلاصه آمده است.

جدول ۱. مشخصات نمونه‌ها

شماره نمونه	نوع دام	جنس دام	سن دام	نژاد دام	استان	نوع نمونه	سابقه	نتیجه تست رزینگال	نتیجه تست Real timer pcr
					مبداء	کبد	پستان	پیش کتفی	سقط جنین
۱	گوسفند	ماده	۳۶	بومی	مرکزی	*	*	*	دارد
۲	گوسفند	ماده	۳۶	بومی	مرکزی	*	*	*	-
۳	گوسفند	ماده	۳۶	بومی	مرکزی	*	*	*	-
۴	بز	نر	۲۴	بومی	مرکزی	*	بیضه	*	-
۵	گوسفند	نر	۸	بومی	مرکزی	*	بیضه	*	-
۶	گوسفند	نر	۸	بومی	همدان	*	بیضه	*	-
۷	گوسفند	ماده	۲۴	بومی	همدان	*	*	*	دارد
۸	گوسفند	ماده	۳۶	بومی	همدان	*	*	*	-
۹	بز	ماده	۲۴	بومی	همدان	*	*	*	-
۱۰	گوسفند	ماده	۳۶	بومی	همدان	*	*	*	-
۱۱	گوسفند	ماده	۳۶	کرد	تکاب	*	*	*	-
				افشار					
۱۲	گوسفند	ماده	۴۸	کرد	تکاب	*	*	*	-
				افشار					
۱۳	گوسفند	ماده	۴۸	کرد	تکاب	*	*	*	دارد
				افشار					بروسلا
									ملی-تنسیس
۱۴	گوسفند	ماده	۴۸	کردافشار	تکاب	*	*	*	-
۱۵	بز	نر	۲۴	کردافشار	تکاب	*	بیضه	*	-
۱۶	بز	ماده	۶۰	کردافشار	تکاب	*	*	*	-
۱۷	گوسفند	ماده	۲۴	کردبومی	کرمانشاه	*	*	*	-
۱۸	گوسفند	ماده	۳۶	کردبومی	کرمانشاه	*	*	*	-
۱۹	گوسفند	ماده	۳۶	کردبومی	کرمانشاه	*	*	*	-



بررسی آلودگی لاشه های گاو و گوسفند به باکتری بروسل

۲۰	گوسفند	ماده	۲۴	کردبومی	کرمانشاه	*	*	*	-	منفی	منفی
۲۱	بز	نر	۷	کردبومی	کردستان	*	بیضه	*	-	منفی	منفی
۲۲	بز	ماده	۱۲	کردبومی	کردستان	*	*	*	-	منفی	منفی
۲۳	بز	ماده	۱۲	کردبومی	کردستان	*	*	*	-	منفی	منفی
۲۴	بز	ماده	۱۲	کردبومی	کردستان	*	*	*	-	منفی	منفی
۲۵	بز	ماده	۱۲	کردبومی	کردستان	*	*	*	-	منفی	منفی
۲۶	گوسفند	ماده	۳۶	بومی	لرستان	*	*	*	-	مثبت	منفی
۲۷	گوسفند	ماده	۳۶	بومی	لرستان	*	*	*	-	مثبت	منفی
۲۸	گوسفند	ماده	۳۶	بومی	لرستان	*	*	*	-	مثبت	بروسلا
ملی-تنسیس											
۲۹	گوسفند	ماده	۳۶	بومی	لرستان	*	*	*	-	مثبت	منفی
۳۰	گوسفند	ماده	۳۶	بومی	لرستان	*	*	*	-	منفی	
۳۱	گاو	ماده	۳۶	دورگ	قم	*	*	*	-	مثبت	بروسلا
آبورتوس											
۳۲	گاو	ماده	۳۶	دورگ	قم	*	*	*	-	مثبت	بروسلا
آبورتوس											
۳۳	گاو	ماده	۴۸	دورگ	قم	*	*	*	دارد	مثبت	بروسلا
آبورتوس											
۳۴	گاو	ماده	۳۶	دورگ	قم	*	*	*	-	مثبت	بروسلا
آبورتوس											
۳۵	گاو	ماده	۳۶	دورگ	قم	*	*	*	-	مثبت	بروسلا
ملی-تنسیس											
۳۶	گاو	ماده	۳۶	دورگ	قم	*	*	*	-	مثبت	منفی
۳۷	گاو	ماده	۳۶	دورگ	قم	*	*	*	-	مثبت	بروسلا
آبورتوس											
۳۸	گاو	ماده	۴۸	دورگ	قم	*	*	*	دارد	مثبت	بروسلا
آبورتوس											
۳۹	گاو	ماده	۳۶	دورگ	قم	*	*	*	-	مثبت	بروسلا
آبورتوس											



بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان



۴۰	گاو	ماده	۳۶	دورگ	قم	*	*	*	-	مثبت	بروسلا
۴۱	گاو	ماده	۳۶	دورگ	قم	*	*	*	سالم	منفی	آبورتوس
۴۲	گاو	ماده	۳۶	دورگ	قم	*	*	*	سالم	منفی	منفی
۴۳	گاو	نر	۲۴	دورگ	قم	*	بیضه	*	سالم	منفی	منفی
۴۴	گاو	نر	۲۴	دورگ	قم	*	بیضه	*	سالم	منفی	منفی

جدول ۲. فراوانی و درصد فراوانی گاوهای مبتلا به بروسلاز بر اساس تست رزینگال

فراوانی	درصد	درصد تجمعی
تست رزینگال مثبت	۱۰	۷۱/۴۲
سالم	۴	۲۸/۵۷
مجموع	۱۴	۳۱/۸۱

جدول ۳. فراوانی و درصد فراوانی گوسفندهای مبتلا به بروسلاز بر اساس تست رزینگال

فراوانی	درصد	درصد تجمعی
تست رزینگال مثبت	۷	۳۳/۳۳
سالم	۱۴	۶۶/۶۶
مجموع	۲۱	۴۷/۷۲

جدول ۴. فراوانی و درصد فراوانی بزهای مبتلا به بروسلاز بر اساس تست رزینگال

فراوانی	درصد	درصد تجمعی
تست رزینگال مثبت	۰	۰
سالم	۹	۲۰/۴۵
مجموع	۹	۲۰/۴۵

شناسایی مولکولی باکتری بروسلا در عقده‌های لنفی گاو و گوسفند به روش Real-time PCR از ۴۴ نمونه مورد آزمایش ۱۱ نمونه (۲۰/۳۷ درصد) با استفاده از روش Real-time PCR آلوده به باکتری بروسلا تشخیص داده شد. که سه نمونه آلوده به بروسلا ملی‌تنسیس (۵/۵ درصد) و هشت نمونه آلوده به بروسلا آبورتوس (۱۴/۸۱ درصد) بودند.



بررسی آلودگی لاشه های گاو و گوسفند به باکتری بروسلا

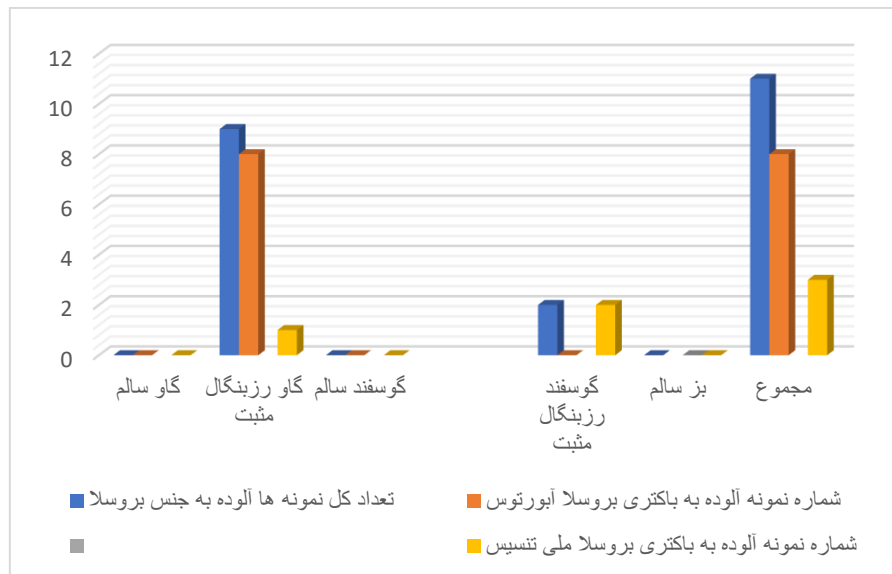
با توجه به نتایج شناسایی گونه های بروسلا به روش Real-time PCR که در جدول پنج و شکل یک آمده است، از سه نمونه مثبت مربوط به بروسلا ملی تنسیس دو نمونه مربوط به گوسفند و یک نمونه مربوط به گاو و از هشت نمونه مثبت بروسلا آبورتوس همگی مربوط به نمونه های اخذ شده از گاو بودند.

جدول ۵. فراوانی و درصد آلودگی به بروسلا در نمونه های مورد آزمایش به روش Real-time PCR

نوع نمونه	تعداد کل نمونه ها آلوده به جنس بروسلا	شماره نمونه آلوده به باکتری بروسلا آبورتوس	شماره نمونه آلوده به باکتری بروسلا ملی تنسیس
گاو سالم	۰	۰	۰
گاو رزبنگال مثبت	۹ ۲۰/۴۵ درصد	۸ ۱۸/۱۸ درصد	۱ ۲/۲۷ درصد
گوسفند سالم	۰	۰	۰
گوسفند رزبنگال مثبت	۲ ۴/۵ درصد	۰	۲ ۴/۵ درصد
بز سالم	۰	۰	۰
مجموع	۱۱ ۲۵ درصد	۸ ۱۸/۱۸ درصد	۳ ۶/۸۱ درصد



بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان



شکل ۱. درصد آلودگی کل نمونه‌ها به باکتری بروسلا

استخراج DNA

در این تحقیق استخراج DNA از نمونه‌های بافت لنفاوی با استفاده از کیت High Pure PCR Template Preparation Kit ساخت شرکت Roche با شماره ی کاتالوگ ۱۱۷۹۶۸۲۸۰۰۱ مطابق دستورالعمل سازنده انجام شد. آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه از سه جفت پرایمر استفاده شد که به ترتیب مربوط به ژن *IS711* اختصاصی جنس بروسلا و برای تشخیص گونه‌های *B. abortus* و *B. melitensis* به ترتیب متعلق به ژن *BMEII0466* و ژن *BruAb2_0168* می‌باشند و مطابق روش V. Hinić و همکاران می‌باشد (۹). مشخصات پرایمرها و پراب مورد استفاده در جدول شش آمده است.

جدول ۶. توالی پرایمرها و پراب مورد استفاده در این مطالعه

اندازه	توالی پرایمر و پراب (3→5)	نام پرایمر	ژن هدف
محصول			
(جفت باز)			
63 bp	GCTGAAGCTTGCGGACAGT GGCCTACCGCTGCGAAT FAM-AAGCCAACACCCGGCCATTATGGT-TAMRA	IS711-F IS711-R probe-IS711	<i>IS711</i>
112 bp	TCGCATCGGCAGTTTCAA CCAGCTTTTGGCCTTTTCC Cy5-CCTCGGCATGGCCCGCAA-BHQ-2	BMEII0466-F BMEII0466-R probe-BMEII0466	<i>BMEII0466</i>
222 bp	GCACACTCACCTTCCACAACAA CCCCGTTCTGCACCAGACT FAM-TGGAACGACCTTTGCAGGCGAGATC-BHQ-1	<i>BruAb2_0168-F</i> <i>BruAb2_0168-R</i> - <i>BruAb2_0168</i> probe	<i>BruAb2_0168</i>



آماده سازی مسترمیکس و تهیه ی محصول PCR

برای شناسایی جنس و گونه های بروسل، از کیت RealQ Plus 2x Master Mix for Probe شرکت Ampliqon به شماره کاتالوگ A313402 استفاده شد. ابتدا مواد مورد نیاز از فریزر ۲۰- خارج و در دمای محیط و زیر لامینارفلو قرار داده شد تا به آرامی ذوب شوند. برای ساخت مسترمیکس، طبق دستورالعمل سازنده کیت به ازای هر نمونه (ژنوم استخراج شده از هر کد نمونه) مقدار ۵/۲۵ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز، ۱۲/۵ میکرولیتر بافر 2X، یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F و R با غلظت ۱۰ μM و ۰/۲۵ میکرولیتر پراب با غلظت ۱۰ μM (سنتز شده توسط شرکت سیناژن- ایران) تهیه شد. بعد از آماده شدن مسترمیکس، به تعداد نمونه های مورد آزمایش، میکروتیوپ های پی سی آر را در داخل کول باکس قرار داده و در هر میکروتیوپ ۲۰ میکرولیتر مسترمیکس و پنج میکرولیتر از ژنوم مورد آزمایش ریخته شد و بعد از حدود پنج ثانیه سانتریفوژ، میکروتیوپ ها برای آزمایش Real-time PCR به دستگاه ترماسایکلر RotorGene Q (ساخت شرکت Qiagen، آلمان) انتقال داده شد. افزوده سازی به صورت واسرشته سازی اولیه (Initial denaturation) در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل به ترتیب شامل واسرشته سازی ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال پرایمر (Annealing) ۶۰ درجه ۳۰ ثانیه و طولیل سازی (Elongation) ۷۲ درجه ۲۰ ثانیه انجام شد.

نتایج

در این مطالعه از ۳۰ لاشه گوسفند و بز و ۱۴ لاشه گاو نمونه بافت لنفاوی جمع آوری شد و تمامی نمونه ها با استفاده روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد نمونه های بروسل مثبت به تفکیک گونه به دست آمده در جدول ۷ نشان داده شده است.

جدول ۷. فراوانی و درصد آلودگی به بروسل در آزمون Real-time PCR

نوع نمونه	تعداد کل نمونه ها آلوده به جنس بروسل	تعداد نمونه آلوده به باکتری <i>B. abortus</i>	تعداد نمونه آلوده به باکتری <i>B. melitensis</i>
گاو	۹ ۲۰/۴۵ درصد	۸ ۱۸/۱۸ درصد	۱ ۲/۲۷ درصد
گوسفند	۲ ۵/۵ درصد	۰	۲ ۴/۵ درصد
بز	۰	۰	۰



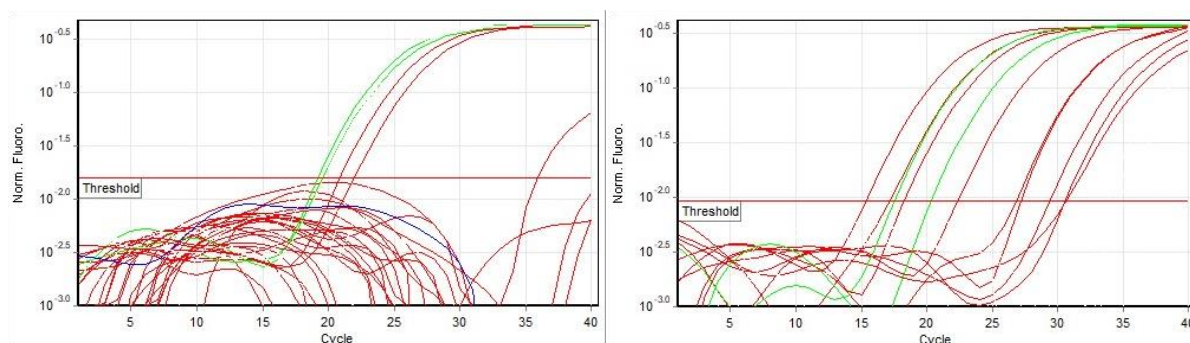
بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان



۳	۸	۱۱	مجموع
۶/۸۱ درصد	۱۸/۱۸ درصد	۲۵ درصد	

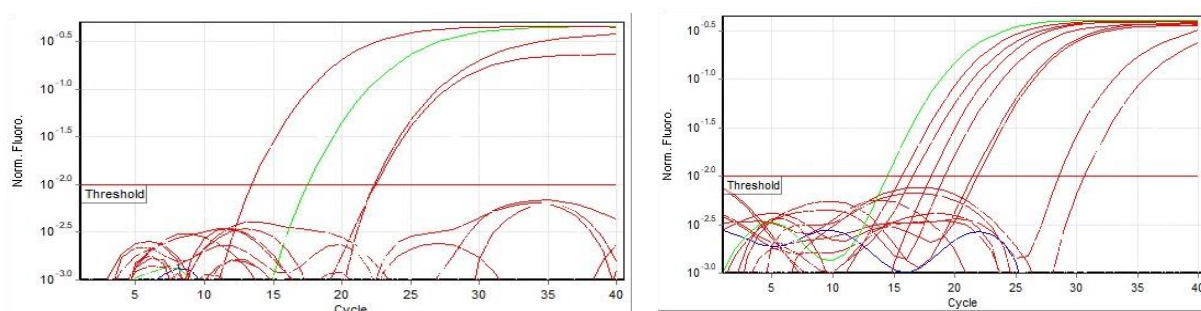
نمودار تکثیر Real time PCR برای نمونه‌ها

در این آزمایش برای صحت و درستی واکنش از DNA سویه واکسن *B. abortus* (Razi institute, Iran) RB51 و سویه واکسن *B. melitensis* (Razi institute, Iran) Rev.1 به عنوان دو کنترل مثبت استفاده گردید و برای کنترل منفی از آب مقطر استفاده شد. در ابتدا برای شناسایی جنس عمومی باکتری بروسلا از پرایمرهای جنس بروسلا استفاده گردید که در صورت مثبت شدن نتیجه Real-time PCR آن در مرحله بعدی، برای تعیین گونه بروسلا از پرایمرهای اختصاصی گونه *B. melitensis* و *B. abortus* استفاده شد. نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲. نمودار تکثیر باکتری بروسلا برای ژن *IS711* جنس عمومی بروسلا در ۳۰ نمونه گوسفند و بز و ۱۴ نمونه گاو

برای تعیین گونه‌های جنس بروسلا از نمونه‌های مثبت، مجدداً آزمایش Real-time PCR به وسیله پرایمرهای گونه *B. abortus* و *B. melitensis* به طور جداگانه انجام پذیرفت. این آزمایش در دو گروه ۱۳ تایی انجام شد. گروه اول شامل ۱۱ نمونه مثبت در مرحله جنس، کنترل منفی و DNA باکتری *B. abortus* به عنوان کنترل مثبت، که در این گروه از پرایمرهای اختصاصی گونه *B. abortus* استفاده شد. گروه دوم نیز همانند گروه اول شامل ۱۱ نمونه مثبت در مرحله جنس، کنترل منفی و یک کنترل مثبت شامل DNA باکتری *B. melitensis* که در این گروه از پرایمرهای اختصاصی گونه *B. melitensis* در نمونه‌های مذکور استفاده شد و برنامه دمایی نیز همانند گروه قبلی بود. نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳. نمودار تکثیر برای تعیین گونه *B. melitensis* و *B. abortus* در نمونه‌های مثبت مورد آزمایش برای ژن

BMEII0466 و *BruAb2_0168*

بحث

تابلوی کلینیکی بروسلوزیس به جهت علائم غیراختصاصی و بعضاً غیرمعمول، به تنهایی نمی‌تواند بیانگر این بیماری باشد. بنابراین تأیید تشخیص، به آزمون‌های آزمایشگاهی نیاز دارد. در حال حاضر بیشتر از روش‌های سرولوژیکی برای تشخیص بروسلوز استفاده می‌شود. سرولوژی روش مؤثرتری برای تشخیص است هرچند، واکنش متقاطع با سایر ارگانیسم‌ها بزرگترین مشکل آن است. تیترا برای دوره‌ی زمانی طولانی پس از درمان، مثبت باقی می‌مانند. حساسیت روش‌های سرولوژیکی ۹۵ - ۶۵ درصد است اما اختصاصیت آن در مناطق اندمیک پایین است. برای رفع مشکلات ذکر شده در بالا و نیز دستیابی به متدهای ردیابی سریع پاتوژن و نیز تعیین دقیق گونه‌های بروسل، تعیین اسیدهای نوکلئیک آن مد نظر قرار گرفت. علاوه بر این، روش Real-time PCR در مقایسه با PCR معمولی نتایج قابل اعتماد و قابل تکرار را ارائه می‌دهد که نشان می‌دهد نیازی به تجزیه و تحلیل پس از PCR (الکتروفورز ژل، هیبریداسیون) ندارد و در مقایسه با روش معمول خطر آلودگی متقاطع محدودی دارد. با این حال Real-time PCR، گران‌تر از PCR معمولی است. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که روش مرسوم برای تشخیص گونه‌های بروسل از نظر فنی نسبت به روش Real-time PCR وقت گیرتر و سخت‌تر است (۱۱ و ۱۲).

در سال‌های اخیر، مطالعه‌ها و ارزیابی‌های متفاوتی راجع به حساسیت و اختصاصیت Real time PCR در تشخیص بروسلوزیس در حیوانات صورت گرفته است. Bounaa dja و همکاران Real time PCR و PCR معمولی را با استفاده از ژن‌های یکسان مقایسه کردند. در تحقیقات آن‌ها، سه ژن از بروسل شامل ژن‌های *IS711*، *bcp31* و *per* با هر دو تکنیک مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتیجه‌گیری شد که استفاده از روش‌های Real-time PCR آسان است و نتایج سریع‌تری نسبت به سیستم‌های PCR معمولی ایجاد می‌کند و در عین حال خطر آلودگی DNA را کاهش می‌دهد (۱۳).

Surucuoglu و همکاران در سال ۲۰۰۹ مزایای استفاده از تکنیک Real-time PCR TaqMan را آزمایش و آن را با روش‌های مرسوم با استفاده از نمونه‌های سرم بیماران مبتلا به اشکال بالینی مختلف بروسلوزیس مقایسه کردند. این تحقیق حساسیت و ویژگی بالای روش Real-time PCR را نشان داد و آن را به عنوان ابزاری مفید برای تشخیص بروسلوز با تظاهرات بالینی متفاوت تأیید کرد (۱۴).

ثابت شده است زمانی که کشت منفی است و نتایج سرولوژی غامض، Real time PCR روشی ارزشمند و قابل اعتماد برای تشخیص بروسلوزیس است (۱۵).



بیماری های قابل انتقال بین انسان و حیوان

هدف از این مطالعه توصیف روش Real-time PCR برای تشخیص گونه های بروسلا در عقده های لنفی گاو و گوسفند بود. در این مطالعه از میان ۴۴ نمونه، تعداد ۱۱ مورد آلوده به جنس بروسلا و تمامی دام هایی که مبتلا به بروسلوز بودند در آزمایش Real time PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی گونه *B. melitensis* سه مورد و هشت مورد *B. abortus* مثبت شدند. لذا شیوع *B. melitensis* نیز برابر ۶/۸۱ درصد و *B. abortus* ۱۸/۱۸ درصد گزارش می شود. بروز بالای بروسلوز در نمونه های لنفاوی در مطالعه حاضر احتمالاً نشان می دهد که این حیوانات در ارتباط نزدیک با گوسفند و گاو آلوده نگهداری می شدند. در تحقیق دوستی و قاسمی ده کردی در سال ۱۳۹۰ از ۴۵۲ نمونه سرم گاوی که به روش Real Time PCR انجام گرفت، برای افتراق گونه های *B. abortus* و *B. melitensis* از ۱۲۷ نمونه سرم گاوی مثبت در PCR، نه مورد به *B. melitensis*، ۶۹ مورد به *B. abortus* و پنج نمونه به هر دو گونه آلوده بودند (۱۶). این یافته ها بالاتر از نتایج بدست آمده در این تحقیق است.

در مطالعه خامسی پور و همکاران در سال ۲۰۱۵ که با هدف شناسایی بروسلا در نمونه های خون و غدد لنفاوی شتر با استفاده از روش Real-time PCR در ایران طراحی شد، Real time PCR برای تمایز گونه ها و بر اساس جایگاه های ژنتیکی، ژن *BMEII0466* برای *B. melitensis* و ژن *Bru-Ab2_0168* برای *B. abortus* استفاده شد که مشابه ژن های هدف مورد استفاده در این تحقیق می باشد. در مطالعه فوق *Brucella spp* در ۱۸ نمونه خون (۱۳/۳۳ درصد) و چهار نمونه (۲/۹۷ درصد) غدد لنفاوی شناسایی شد. این روش به ترتیب در تشخیص *B. abortus* و *B. melitensis* در نمونه های خون و لنف مؤثر بود. *B. abortus* سه نمونه خون (۲/۲۲ درصد) مشاهده شد اما در نمونه های غدد لنفاوی مشاهده نشد. *B. melitensis* تنها در چهار نمونه (۲/۹۷ درصد) غدد لنفاوی مشاهده شد (۱۷).

در مطالعه ای که توسط Seo'nadh O' Leary و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد شناسایی *B. abortus* در نمونه های شیر، خون و غدد لنفاوی گاوهای آلوده با استفاده از روش Real-time PCR با استفاده از جایگاه های ژنتیکی 16S rRNA و ژن *IS711* انجام شد، که مشابه ژن هدف مورد استفاده در این تحقیق می باشد. *B. abortus* در نمونه های خون جمع آوری شده از گاوهای آلوده به طور طبیعی توسط PCR معمولی یا Real-Time تشخیص داده نشد، اما در شیر (۴۴ درصد) و بافت لنفاوی (۶۶ درصد) رتروفارنکس و ۷۵ درصد فوق پستانی) شناسایی شد (۱۸).

این مطالعه نشان داد که هر دو *B. abortus* و *B. melitensis* می توانند گاو را آلوده کنند، اما میزان بروز *B. abortus* بیشتر از *B. melitensis* بود. در نتیجه، شیوع بروسلوز در گاو و گوسفند به میزان آلودگی میزبان های اولیه در تماس با آنها بستگی دارد. از سوی دیگر، گسترش بروسلوز در گاوها به شیوع گونه های بروسلا در سایر حیواناتی که محل نگهداری آنها مشترک بوده و به روش های پرورش گونه های مختلف بستگی دارد.

در واقع مرحله آلودگی دامها در این آزمایش مشخص نبود. از این رو، بعید است که حیوانات هنگام نمونه برداری در مراحل اولیه عفونت بوده باشند. این احتمال وجود دارد که برخی از حیوانات ممکن است باکتری را قبل از نمونه برداری دفع کرده باشند. از این رو، مرحله عفونت که در آن نمونه جمع آوری می شود، می تواند تأثیر عمده ای بر تشخیص باکتری با استفاده از PCR داشته باشد.



نتیجه گیری کلی و پیشنهادها

این مطالعه نشان داد که روش Real-time PCR روشی حساس، اختصاصی و سریع است و علاوه بر تشخیص بروسلازیس، قادر به افتراق بین *B. melitensis* و *B. abortus* می باشد. علاوه بر این، با روش های ایمنولوژیک، برهمکنش های آنتی-بادی-آنتی ژن می تواند توسط فعل و انفعالات غیراختصاصی دشوار باشد و نتایج مثبت کاذب از حیوانات واکسینه شده با سطوح بالای آنتی بادی در گردش مشاهده شود.

نتایج ما نشان می دهد که باکتری ممکن است به راحتی در بافت لنفاوی قابل تشخیص باشد. تشخیص PCR در نمونه های بافت گاو و گوسفند های آلوده به طور طبیعی قبلاً نشان داده شده است. در نتیجه گیری اینکه نمونه های بافتی از غدد لنفاوی امیدوارکننده ترین نوع نمونه برای تشخیص بروسلا توسط PCR به نظر می رسد، توجه به این نکته مهم است که نمونه های لنفاوی پس از مرگ جمع آوری شدند. این به دور از یک موقعیت ایده آل برای یک آزمایش تشخیصی است. با توجه به این مشاهدات، ما پیشنهاد می کنیم که استفاده از نمونه های بیوپسی از بافت لنفاوی برای تشخیص بروسلا ارزش بررسی داشته باشد.

تقدیر و تشکر

از تمامی کسانی که در جمع آوری نمونه همکاری کردند سپاسگزاریم.

تعارض منافع

هیچ گونه تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آنها ارسال شده است.

فهرست منابع

- [1]. Christopher, S., et al. (2010). "Brucellosis: Review on the Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnosis." J Lab Physicians 2(02): 055-060. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.72149>
- [2]. Padilla Poester, F., et al. (2010). "Diagnosis of brucellosis." The Open Veterinary Science Journal Bentham Open. <https://doi.org/10.2174/1874318801004010046>.
- [3]. Megid, J., et al. (2010). Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans, Bentham Open. <https://doi.org/10.2174/1874318801004010119>.
- [4]. Khamesipour, F. and Momeni M. (2014). "Brucella abortus and Brucella melitensis in Iranian bovine and buffalo semen samples: The first clinical trial on seasonal, Senile and geographical distribution using culture, conventional and real-time polymerase chain reaction assays." Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. [In Persian].
- [5]. Garshasbi, M., et al. (2014). "Molecular detection of Brucella species in patients suspicious of Brucellosis from Zanzan, Iran." Brazilian Journal of Microbiology 45: 533-538. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000048>. [In Persian].
- [6]. Kovacova, D., et al. (2007). "Importance of serological diagnostics in ovine epididymitis caused by Brucella ovis." Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2(51).
- [7]. Mitka, S., et al. (2007). "Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods." Journal of clinical microbiology 45(4): 1211-1218. <https://doi.org/10.1128/JCM.00010-06>
- [8]. Espy, M., et al. (2006). "Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing." Clinical microbiology reviews 19(1): 165-256. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>



بیماری های قابل انتقال بین انسان و حیوان



- [9]. Taleski, V., et al. (2002). "An overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe." *Veterinary microbiology* 90(1-4): 147-155. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00250-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00250-X)
- [10]. Hinić, V., et al. (2008). "Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems." *Journal of Microbiological Methods* 75(2): 375-378. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.002>.
- [11]. Bogdanovich, T., et al. (2004). "Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella*." *Journal of clinical microbiology* 42(5): 2261-2263. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2261-2263.2004>
- [12]. Yang, S.-J., et al. (2007). "Bacteriological detection of *Brucella abortus* and its characterization by PCR in the sporadic outbreak of bovine brucellosis in Gyeonggi province." *Korean Journal of Veterinary Service* 30(2): 251-258.
- [13]. Bounaadja, L., et al. (2009). "Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, bcs31 and per target genes." *Veterinary microbiology* 137(1): 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.023>
- [14]. Surucuoglu, S., et al. (2009). "Evaluation of real-time PCR method for rapid diagnosis of brucellosis with different clinical manifestations." *Polish journal of microbiology* 58(1): 15.
- [15]. Al Dahouk, S., et al. (2007). "Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella* spp." <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.305>.
- [16]. Doosti, A. and P. Ghasemi 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): 109-115.
- [17]. Khamesipour, F., et al. (2015). "Molecular study of Brucellosis in camels by the use of TaqMan® real-time PCR." *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 62(4): 409-421. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.4.6>. [In Persian].
- [18]. O'Leary, S., et al. (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. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.12.00>.



This journal is following of Committee on Publication Ethics (COPE) and complies with the highest ethical standards in accordance with ethical laws". This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2023 Zoonosis.



Examining the contamination of lymph nodes of cattle and sheep carcasses in Qom province with *Brucella* by real-time PCR

Shavandi A*, Shakerian A

Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.



*Corresponding author: haram9463@gmail.com

Received: 2023/05/29

Accepted: 2023/05/15

Abstract

Brucellosis is one of the most common diseases among humans and animals and is endemic in Iran. Therefore, the rapid diagnosis of this disease plays a vital role in improving public health. Considering the characteristics such as being hard to grow, the risks associated with the cultivation, and the presence of cross-reactions with other bacteria in serological tests, in the present study, Real-time PCR is used as a method with high sensitivity and specificity to check contamination. Cow and sheep carcasses were used for *Brucella* bacteria species. In this study, samples were collected from the lymph nodes of slaughtered animals, including 30 samples of sheep and goats and 14 samples of cows in the slaughterhouses of Qom city and using three pairs of primers related to *IS711*, *BMEI0466* and *BruAb2_0168* genes, which is specific to the *Brucella* genus and *Brucella melitensis* and *Brucella abortus*, respectively. A Real-time PCR test was performed. Of the 44 tested samples, 11 samples (20.37%) were found to be infected with *Brucella* spp, three samples were contaminated with *Brucella melitensis* (5.5%), and 8 samples were infected with *Brucella abortus* (14.81%). According to the results, out of 3 positive samples related to *Brucella melitensis*, two samples were related to sheep, and one sample was related to cattle, and out of 8 positive samples associated with *Brucella abortus*, all of them were related to samples taken from cows. Therefore, according to the percentage of samples contaminated with *Brucella* bacteria and the health and economic losses of this disease, it is necessary to adopt more accurate and efficient control and monitoring programs to prevent and control the disease.

Key words: *Brucella*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, Real time PCR

How to cite this article: Shavandi A, Shakerian A. Examining the contamination of lymph nodes of cattle and sheep carcasses in Qom province with *Brucella* by real-time PCR. Journal of Zoonosis. 2023; 3 (1): 43-56.