بیماری های قابل انتقال بین انسان و حیوان

مقاله پژوهشی

بررسی آلودگی عقده های لنفاوی لاشه های گاو وگوسفند 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 دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۸

چکیده

بروسلوز یکی از بیماری های مهم مشترک بین انسان و دام و اندمیک در ایران می‌باشد. بنابراین تشخیص سریع این بیماری نقش مهمی در بهبود سلامت عمومی دارد. با توجه به ویژگی‌هایی مانند سخت رشد بودن، خطرات مرتبط با کشت و وجود واکنش‌های متقاطع با باکتری‌های دیگر در آزمون سرولوژیک، در مطالعه حاضر از Real-time PCR به عنوان روش با حساسیت و اختصاصیت بالا جهت بررسی آلودگی لاشه‌های گاو و گوسفند به گونه‌های باکتری *بروسلا* استفاده شد.در این مطالعه از عقده‌های لنفاوی دام‌های کشتار شده شامل ۳۰ نمونه گوسفند و بز و ۱۴ نمونه گاو در کشتارگاه‌های 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 گونه‌های *B. melitensis* و *B. abortus* می‌باشد 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* (۱۴/۸۱درصد) 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 نمونه‌ها به باکتری *بروسلا* و زیان‌های بهداشتی و اقتصادی این بیماری، لازم است برنامه‌های کنترلی و نظارتی دقیق‌تر و کارآمدتری جهت پیشگیری و کنترل بیماری اتخاذ گردد.

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

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]

مقدمه

بروسلوز[1] یک بیماری مشترک بین انسان و دام می‌باشد که هم دام‌های اهلی و هم حیوانات وحشی را تهدید می‌کند و باعث سقط جنین و ناباروری در آن‌ها می‌شود. عوامل عفونی این بیماری باکتری‌هایی از جنس *بروسلا*[2] هستند که گرم منفی و هوازی اختیاری هستند و می‌توانند درون ماکروفاژها به‌صورت درون‌سلولی تکثیر کنند (۱و۲) .گونه‌های *بروسلا* به طور کلاسیک به شش گونه اصلی طبقه بندی می شوند که دو گونه *بروسلا ابرتوس* [3] و *ملیتنسیس*[4] باعث سقط جنین در نشخوارکنندگان می‌شوند (۳). در اکثر موارد بروسلوز در ایران، *B. abortus* و *B. melitensis* عوامل اصلی بیماری‌زا هستند (۴).

این باکتری به‌طور بالقوه‌ای برای انسان بیماری‌زا بوده و عامل بروسلوز انسانی یا تب مالت[5] می‌باشد. به رغم کنترل این بیماری در اغلب کشورها، بیماری در ایران به صورت اندمیک مشاهده می‌گردد (۵).

انتقال از طریق مواد غذایی راه مهم و اصلی آلودگی انسان‌ها در مناطق شهری است. مصرف شیر تازه یا محصولاتی که از شیر نجوشیده بدست می‌آیند به عنوان منبع اصلی آلودگی در نواحی شهری عمل می‌کند.

روش‌های تشخیصی مبتنی بر کشت با وجود آنکه استاندارد طلایی محسوب می‌شوند حساسیت پایینی تا ۷۰ درصد دارند. علی‌رغم توسعه فراوان و دسترسی آسان تست‌های سرولوژیک، مشکل مهم این تست‌ها ایجاد نتایج مثبت کاذب به دلیل واکنش متقاطع با آنتی‌ژن‌های سایر میکروارگانیسم‌ها مانند *یرسینیا انتروکولیتیکا*، *سالمونلا اورینتالیس*، *ویبرو کلرا*، *فرانسیسلا تورانسیس* و *اشریشیا کلی* می‌باشد (۶).

کاربرد روش‌های نوین تشخیصی از جمله PCR و مشتقات آن که ساده، سریع و حساس بوده و نیز اختصاصیت بیشتری نسبت به تست‌های سرولوژیکی دارد، بر مبنای تشخیص اسید نوکلئیک توسعه یافته‌اند (۷و۸). بنابراین استفاده از روش‌های مولکولی به عنوان تست‌های تاییدی جهت رفع مشکلات مربوط به آزمون‌های سرولوژیکی مانند نبود الگوهای مناسب جهت تفسیر تیترهای آنتی‌بادی در مناطق اندمیک، ضرورت یافته است. گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهند که تشخیص DNA *بروسلا* توسط PCR حساس‌تر از کشت خون و اختصاصی‌تر از آزمون سرولوژیکی برای تشخیص بیماری حاد می‌باشد (۹و۱۰).

یکی از مشتقات PCR تکنیک Real- time PCR می‌باشد که علاوه بر شناسایی، با حذف بسیاری از فرایندهای وقت‌گیر، امکان بررسی میزان محصول را در حین انجام واکنش در نمونه‌ها میسر ساخته است.

در این مطالعه به منظور تشخیص سریع و دقیق‌تر بیماری بروسلوز به بررسی ژنومی *B. abortus* و *B. melitensis* در عقده‌های لنفاوی لاشه‌های کشتارشده به روش Real time PCR می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها

تعداد ۹۵ نمونه از عقده‌های لنفاوی دام‌های کشتارشده (گاو، گوسفند و بز) به طور تصادفی از کشتارگاه های شهرستان قم جمع آوری گردید. جمع آوری نمونه‌ها در فصول تابستان و پاییز سال ۱۴۰۱ انجام پذیرفت. در مجموع از ۹۵ نمونه اخذ شده، تعدادی از نمونه‌های اخذ شده به علت محدودیت‌های آزمایشگاهی حذف شد. نهایتا از کل ۴۴ نمونه باقی مانده (شامل ۳۰ نمونه از

1 Brucellosis
2 Brucella spp
3 B . abortus
4 B . melitensis
5 Malta fever

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]

گوسفند و بز و ۱۴ نمونه از گاو) آزمون انجام شد. ۱۷ نمونه از دام ها تست رزبنگال مثبت و مابقی نمونه‌ها تست رزبنگال منفی داشتند. نتایج حاصله در جدول های یک تا چهار به صورت خلاصه آمده است.

جدول ۱. مشخصات نمونه‌ها

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

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]

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

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]

۴۰	گاو	ماده	۳۶	دورگ	قم	*	*	*	-	مثبت	*بروسلا آبورتوس*
۴۱	گاو	ماده	۳۶	دورگ	قم	*	*	*	سالم	منفی	منفی
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 بروسلوز بر اساس تست رزبنگال

	فراوانی	درصد	درصد تجمعی
تست رزبنگال مثبت	۱۰	۷۱/۴۲	۲۲/۷۲
سالم	۴	۲۸/۵۷	۹/۰۹
مجموع	۱۴	۱۰۰	۳۱/۸۱

جدول ۳. فراوانی و درصد فراوانی گوسفندهای مبتلا به بروسلوز بر اساس تست رزبنگال

	فراوانی	درصد	درصد تجمعی
تست رزبنگال مثبت	۷	۳۳/۳۳	۱۵/۹۰
سالم	۱۴	۶۶/۶۶	۳۱/۸۱
مجموع	۲۱	۱۰۰	۴۷/۷۲

جدول ۴. فراوانی و درصد فراوانی بزهای مبتلا به بروسلوز بر اساس تست رزبنگال

	فراوانی	درصد	درصد تجمعی
تست رزبنگال مثبت	۰	۰	۰
سالم	۹	۱۰۰	۲۰/۴۵
مجموع	۹	۱۰۰	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* (۱۴/۸۱درصد) بودند.

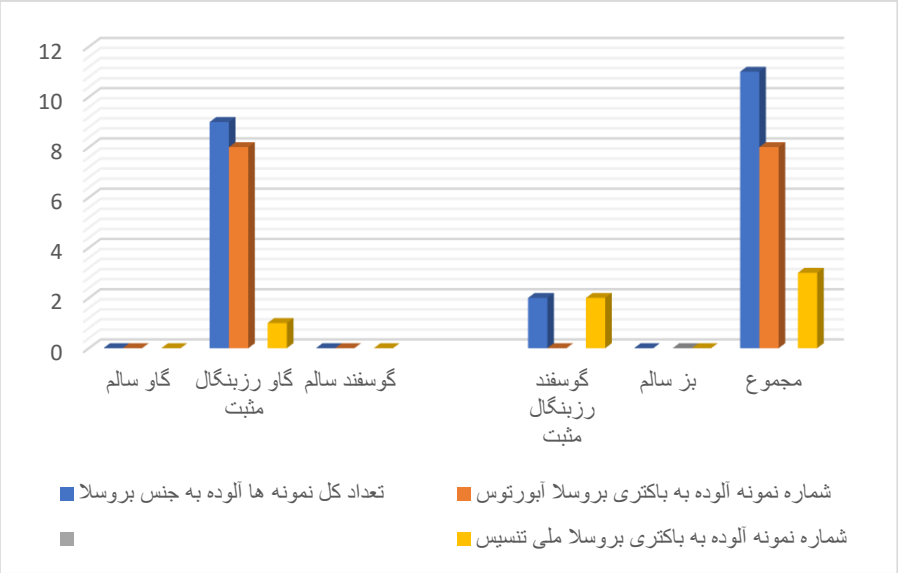
[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]

با توجه به نتایج شناسایی گونه‌های *بروسلا* به روش Real-time PCR که در جدول پنج و شکل یک امده 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 نمونه‌های 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

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]



شکل ۱. درصد آلودگی کل نمونه‌ها به باکتری *بروسلا*

استخراج DNA

در این تحقیق استخراج DNA از نمونه های بافت لنفاوی با استفاده از کیت High Pure PCR Template Preparation Kit ساخت شرکت Roche با شماره ی کاتالوگ ۱۱۷۹۶۸۲۸۰۰۱مطابق 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 گونه های *B. melitensis* و *B. abortus* به ترتیب متعلق به ژن *BMEII0466* و ژن *BruAb2_0168* می باشند و مطابق روش V. Hinić و همکاران می‌باشد (۹). مشخصات پرایمرها و پراب مورد استفاده در جدول شش آمده است.

جدول۶. توالی پرایمرها و پراب مورد استفاده در این مطالعه

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

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]

آماده سازی مسترمیکس و تهیه ی محصول PCR

برای شناسایی جنس و گونه‌های *بروسلا*، 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) مقدار۵/۲۵ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز، ۱۲/۵ میکرولیتر بافر 2X، یک میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهایF و R با غلظت µM ۱۰و ۰/۲۵ میکرولیتر پراب با غلظت µM ۱۰ (سنتز شده توسط شرکت سیناژن- ایران) تهیه شد. بعد از آماده شدن مسترمیکس، به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش، میکروتیوپ‌های 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، میکروتیوپ‌ها برای آزمایش Real-time PCR به دستگاه ترماسایکلر RotorGene Q (ساخت شرکت Qiagene، آلمان) انتقال داده شد. افزوده سازی به صورت واسرشته سازی اولیه (Initial denaturation) در ۹۵ درجه سانتی‌گراد 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 طویل سازی(Elongation) ۷۲ درجه ۲۰ ثانیه انجام شد.

نتـایج

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 *بروسلا* مثبت به تفکیک گونه به دست آمده در جدول ۷ نشان داده شده است.

جدول۷. فراوانی و درصد آلودگی به *بروسلا* در آزمون Real-time PCR

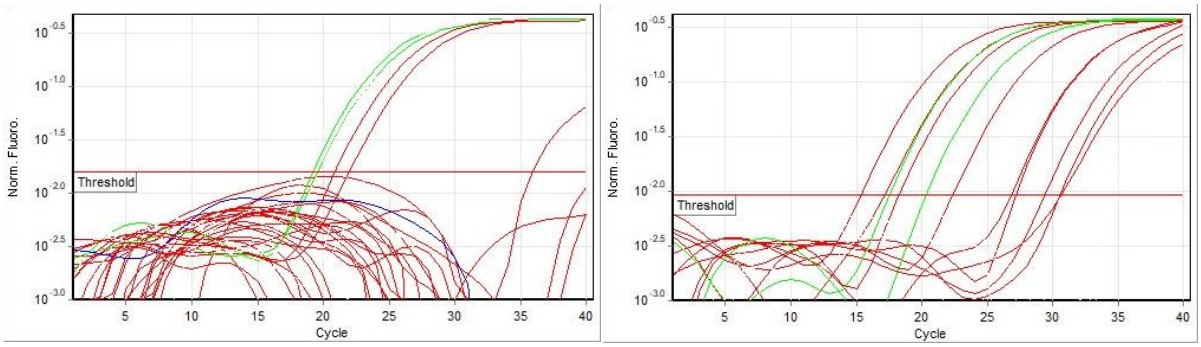
نوع نمونه	تعداد کل نمونه ها آلوده به جنس *بروسلا*	تعداد نمونه آلوده به *باکتری* ***B. abortus***	تعداد نمونه آلوده به *باکتری* ***B. melitensis***
گاو	۹	۸	۱
	۲۰/۴۵ درصد	۱۸/۱۸ درصد	۲/۲۷ درصد
گوسفند	۲	۰	۲
	/۵ درصد		۴/۵ درصد
بز	۰	۰	۰

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]

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

نمودار تکثیر Real time PCR برای نمونه‌ها

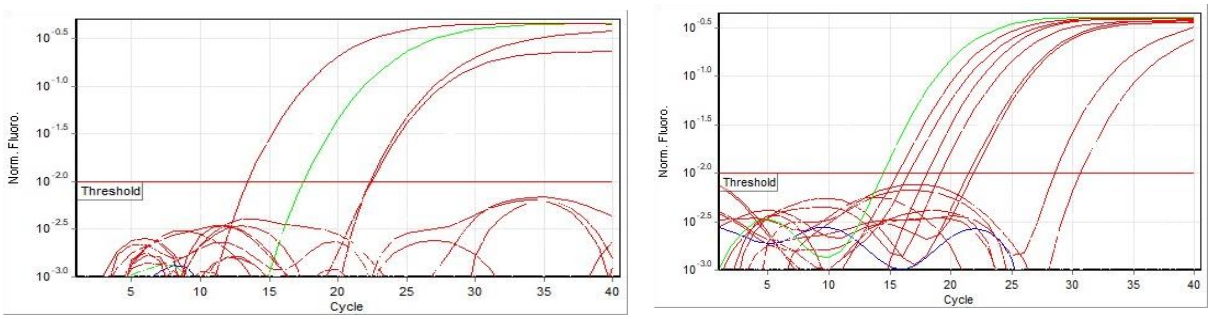
در این آزمایش برای صحت و درستی واکنش از DNA سویه واکسن *B. abortus*(Razi institute, Iran) RB51 و سویه واکسن *B. melitensis* (Razi institute, Iran) Rev.1 به عنوان دو کنترل مثبت استفاده گردید و برای کنترل منفی از آب مقطر استفاده شد. در ابتدا برای شناسایی جنس عمومی باکتری *بروسلا* از پرایمرهای جنس *بروسلا* استفاده گردید که در صورت مثبت شدن نتیجه Real-time PCR آن در مرحله بعدی، برای تعیین گونه *بروسلا* از پرایمرهای اختصاصی گونه *B. abortus* و *B. melitensis* 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 گونه های جنس *بروسلا* از نمونه‌های مثبت، مجددا 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 نمونه های مذکور استفاده شد و برنامه دمایی نیز همانند گروه قبلی بود. نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است.

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]



شکل ۳. نمودار تکثیر برای تعیین گونه *B. abortus* و *B. melitensis* در نمونه های مثبت مورد آزمایش برای ژن *BruAb2_0168* و *BMEII0466*

بحث

تابلوی کلینیکی بروسلوزیس به جهت علائم غیراختصاصی و بعضا 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. تیترها 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 *بروسلا*، 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 می که نشان می دهد 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 *بروسلا* از نظر فنی نسبت به روش Real-time PCR وقت گیرتر و سخت‌تر است (۱۱و۱۲).

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 *بروسلا* شامل ژن‌های *IS711*، *bcsp31* 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 تایید 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).

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]

هدف از این مطالعه توصیف روش Real-time PCR برای تشخیص گونه‌های *بروسلا* در عقده‌های لنفی گاو و گوسفند بود. در این مطالعه از میان ۴۴ نمونه، تعداد ۱۱ مورد آلوده به جنس *بروسلا* و تمامی دام‌هایی 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 می‌شود. بروز بالای بروسلوز در نمونه‌های لنفاوی در مطالعه حاضر احتمالاً نشان می‌دهد که این حیوانات در ارتباط نزدیک با گوسفند و گاو آلوده نگه‌داری می‌شدند. در تحقیق دوستی و قاسمی‌ده‌کردی در سال ۱۳۹۰ از ۴۵۲ نمونه سرم گاوی که به روش Real Time PCR انجام گرفت، برای افتراق گونه‌های *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 یافته‌ها بالاتر از نتایج بدست آمده در این تحقیق است.

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

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

این مطالعه نشان داد که هر دو *B. abortus* و *B. melitensis* می‌توانند 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 میزبان‌های اولیه در تماس با آنها بستگی دارد. از سوی دیگر، گسترش بروسلوز در گاوها به شیوع گونه‌های *بروسلا* در سایر حیواناتی که محل نگه‌داری آن‌ها مشترک بوده و به روش‌های پرورش گونه‌های مختلف بستگی دارد.

در واقع مرحله آلودگی دام‌ها در این آزمایش مشخص نبود. از این‌رو، بعید است که حیوانات هنگام نمونه‌برداری در مراحل اولیه عفونت بوده باشند. این احتمال وجود دارد که برخی از حیوانات ممکن است باکتری را قبل از نمونه‌برداری دفع کرده باشند. از این رو، مرحله عفونت که در آن نمونه جمع‌آوری می‌شود، می‌تواند تأثیر عمده‌ای بر تشخیص باکتری با استفاده از PCR داشته باشد.

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]

نتیجه‌گیری کلـــی و پیشنهادها

این مطالعه نشان داد که روش Real-time PCR روشی حساس، اختصاصی و سریع است و علاوه بر تشخیص بروسلوزیس، قادر به افتراق بین *B.abortus* و *B. melitensis* می‌باشد. علاوه بر این، با روش‌های ایمونولوژیک، برهمکنش‌های آنتی‌بادی-آنتی‌ژن می‌تواند توسط فعل و انفعالات غیراختصاصی دشوار باشد و نتایج مثبت کاذب از حیوانات واکسینه شده با سطوح بالای آنتی‌بادی در گردش مشاهده شود.

نتایج ما نشان می دهد که باکتری ممکن است به راحتی در بافت لنفاوی قابل تشخیص باشد. تشخیص PCR در نمونه‌های بافت گاو و گوسفندهای آلوده به‌طور طبیعی قبلاً نشان داده شده است. در نتیجه‌گیری اینکه نمونه‌های بافتی از غدد لنفاوی امیدوارکننده‌ترین نوع نمونه برای تشخیص *بروسلا* توسط PCR به نظر می‌رسد، توجه به این نکته مهم است که نمونه‌های لنفاوی پس از مرگ جمع‌آوری شدند. این به دور از یک موقعیت ایده‌آل برای یک آزمایش تشخیصی است. با توجه به این مشاهدات، ما پیشنهاد می‌کنیم که استفاده از نمونه‌های بیوپسی از بافت لنفاوی برای تشخیص *بروسلا* ارزش بررسی داشته باشد.

تقـــدیر و تشـــکر

از تمامی کسانی که در جمع‌آوری نمونه همکاری کردند سپاسگزاریم.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی 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 Zanjan, 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 Puławy 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

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]

[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

[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, bcsp31 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.

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]

Research Article

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*, *BMEII0466* 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.

[Downloaded from zoonosis.ir on 2026-11-09]