Bi-quarterly Journal of
Animal Health and Infectious Diseases
Volume 1, Number 1
Journal homepage: https://jahid.lu.ac.ir/

Serum prevalence of brucellosis based on history of abortion in sheep and goeat using serological tests in Piranshahr

Hasan Armanfar[1], Amir Tukmechi [1]

1. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: Brucellosis is a common human-animal disease caused by *Brucella* bacteria. This study was performed to evaluate the serum prevalence of brucellosis in sheep and goats with a history of abortion in Piranshahr.

Materials and Methods: One of the essential methods for detection is polymerase chain reaction in which Multiplex-PCR method is the fastest way to achieve the desired results. Despite the PCR test simplicity, it can be performed on a large number of samples due to high sensitivity and specificity. This technique was used to simultaneously identify four species of the *Brucella* family, *Brucella mellitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella ovis* and, *Brucella suis* in sheep and goat abortion specimens. 200 serum samples were collected from the Piranshahr region and were first examined for *Brucella* infection by the Rose Bengal test. Then, in the next step, DNA serum samples were extracted for final confirmation and, specific primers designed based on the *16s rRNA* gene were used to detect *Brucella*. Specific primers of each species were used to identify *Brucella* species.

Results: According to Rose Bengal test, the results show that 86 samples (43%) of the serum samples (39% of sheep samples and 4% of goat samples) were positive for *Brucella*. The results of this study were positive for *Brucella* based on multiple PCR tests of 33 samples (16.5%). Prevalence of infection with different species of *Brucella* based on multiple PCR tests is as follows: 19 samples (22%) of *Brucella abortus* species, ten samples (11.6%) of *B. mellitensis* species, four samples (4.6%) of the samples were infected with *B. ovis*. The results also showed a significant relationship between abortion and the type of livestock ($p < 0.05$). Abortion occurred more in sheep than in goats by *Brucella* bacteria.

Conclusion: Finally, none of the samples were infected with *Brucella* Swiss. As a results, *Brucella abortus* one biovar and *B. melitensis* one biovar are common among sheep and goats in Piranshahr region. Moreover, the use of multiplex polymerase chain reaction methods in diagnostic laboratories improves the quality level and increases the detection speed. Finally, the results showed that brucellosis is endemic in flocks of sheep and goats in Piranshahr region.

Keywords: Sheep and goat, serum, *B. abortus*,*B. melitensis*, *B.* ovis,*B. suis*

Received: 09.23.2023 **Accept: 02.11.2024** **Online Publish: 02.29.2024**

Corresponding Information: **Amir Tokmechi,** Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Email: a.tukmachi@urmia.ac.ir

Copyright © 2023, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usage with proper citation.

دو فصلنامه
بهداشت و بیماری های عفونی دام
سال ۱ ، شماره ۱
صفحه مجله: https://jahid.lu.ac.ir/

بررسی شیوع سرمی بروسلوز با سابقه سقط جنین درگوسفندان و بزان با استفاده از آزمایش‌های سرولوژی، در شهرستان پیرانشهر

حسن آرمانفر [۱]، امیر توکمه چی [۱]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه ایران

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز از جمله بیماری های مشترک انسان و دام است که توسط باکتری‌های *بروسلا* ایجاد می‌شود. این تحقیق به منظور بررسی شیوع سرمی بروسلوز در گوسفندان و بزان با سابقه سقط جنین شهرستان پیرانشهر انجام شد.

مواد و روش ها: یکی از روش های کلیدی تشخیص واکنش زنجیره ای پلیمراز بوده که سریع‌ترین آن برای دست یابی به نتایج مطلوب روش Multiplx PCR است. به این دلیل که تست PCR حساسیت و ویژگی بالایی دارد و در عین سادگی می‌تواند بروی تعداد زیاد نمونه انجام شود. به منظور تشخیص همزمان چهار گونه از خانواده بروسلاسه، *بروسلا ملی تنسیس*، *بروسلا آبورتوس*، *بروسلا اویس* و *بروسلا سوئیس* در نمونه های سقطی گوسفندان و بزان از این تکنیک استفاده شد. تعداد ۲۰۰ نمونه سرمی از منطقه پیرانشهر جمع‌آوری گردید و از نظر آلودگی به *بروسلا* ابتدا با تست رزبنگال مورد بررسی قرار گرفتند. سپس در مرحله بعد به منظور تایید نهایی از همه نمونه های سرمی DNA استخراج شد و جهت تشخیص *بروسلا* از پرایمر های اختصاصی طراحی شده بر اساس ژن *16srRNA* استفاده گردید. همچنین به منظور تشخیص گونه های *بروسلا* از پرایمر های اختصاصی هر گونه استفاده گردید.

یافته ها: نتایج بر اساس تست رزبنگال ۸۶ نمونه (۴۳ درصد) از نمونه های سرمی مورد بررسی (۳۹ درصد نمونه های گوسفند و ۴ درصد نمونه های بز) *بروسلا* مثبت بودند. نتایج این مطالعه بر اساس تست PCR چندگانه ۳۳ نمونه (۱۶/۵ درصد) از نمونه‌ها نظر وجود *بروسلا* مثبت بودند. میزان شیوع آلودگی به گونه‌های مختلف *بروسلا* بر اساس تست PCR چندگانه ۱۹ نمونه (۲۲ درصد) از نمونه‌ها به گونه *بروسلا آبورتوس*، ۱۰ نمونه (۱۱/۶ درصد) از نمونه‌ها به گونه *بروسلا ملی تنسیس*، ۴ نمونه (۴/۶ درصد) از نمونه‌ها به گونه *بروسلا اویس* آلوده بودند. همچنین نتایج ارتباط معنی داری بین رابطه سقط و نوع دام را نشان داد ($p< ۰/۰۵$) سقط در گوسفندان نسبت به بزان توسط باکتری بروسلا بیشتر رخ داده است. در نهایت هیچ‌کدام از نمونه‌ها به *بروسلا سوئیس* آلوده نبودند.

نتیجه گیری: نبیوواراهای ۱ *بروسلا آبورتوس* و بیووراهای ۱ *بروسلا ملی تنسیس*، بیووراهای شایع در بین گوسفندان و بزان منطقه پیرانشهر هستند. همچنین استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه در آزمایشگاه های تشخیصی موجب ارتقای سطح کیفی می‌شود و سرعت تشخیص را افزایش می‌دهد. و در نهایت نتایج گویای این بود که بروسلوز بصورت اندمیک در گله‌های گوسفندان و بزان منطقه پیرانشهر وجود دارد

کلیدواژه ها: پیرانشهر، *بروسلا آبورتوس*، *بروسلا ملی تنسیس*، *بروسلا اویس*، سرم، نشخوار کننده کوچک

دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱ **پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۲** **انتشار آنلاین: ۱۴۰۲/۱۲/۱۰**

اطلاعات نویسنده مسئول: امیر توکمه چی ، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه ایران

Email: a.tukmachi@urmia.ac.ir

حق چاپ © ۲۰۲۳، این یک مقاله با دسترسی آزاد اصلی است که تحت شرایط Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License توزیع شده است که اجازه کپی و توزیع مجدد مطالب را فقط در استفاده غیرتجاری با استناد مناسب می دهد.

مقدمه

شیر و فرآورده‌های آن ارزش غذایی بسیار بالایی در تغذیه انسان دارند. ترکیبات شیر برای تأمین انرژی، تکامل ماهیچه‌ها و استخوان‌ها در نوزاد لازم است و هم‌چنین از شیر و فرآورده‌های آن به عنوان رژیم مغذی حاوی ترکیبات متعادل در تغذیه افراد بالغ استفاده می‌شود. اما شیر و سایر فرآورده‌های آن به دلیل دارا بودن اکثر ترکیبات غذایی، محیط خوبی برای رشد میکروب ها نیز محسوب می‌شوند. بروسلوز یا تب مالت، بیماری عفونی سیستمیک و پیشرونده‌ای است که در منطقه مدیترانه یک مشکل جدی بهداشتی محسوب می‌شود (۱). عامل این بیماری، باکتری های جنس *بروسلا* می‌باشد که انگل اختیاری درون سلولی و جزء باکتری‌های گرم منفی هستند (۲) و دارای گونه متعددی بوده که برخی گونه‌ها دارای چند بیوتیپ می‌باشند، هر گونه یک میزبان طبیعی ترجیحی دارد که به عنوان مخزن عفونت شناخته می‌شود ولی در میزبان‌های دیگر نیز ممکن است بیماری ایجاد کنند. میزبان طبیعی *بروسلا آبورتوس* (گاو)، *بروسلا ملی تنسیس* (گوسفند و بز)، *بروسلا سویس* (خوک)، *بروسلا اویس* (گوسفند)، *بروسلا کنیس* (سگ)، *بروسلا نئوتومه* (نوعی موش صحرایی) می‌باشد، اخیراً نیز مشخص شده است که سویه هایی از *بروسلا* در پستانداران دریایی مانند دلفین وجود دارند که دارای بیماری زایی کم برای نشخوارکنندگان و بیماری زایی بیشتر برای انسان هستند مانند *بروسلاستی*(۲). این باکتری‌ها معمولاً از دام یا فرآورده‌های دامی آلوده به انسان منتقل می‌شوند(۲, ۳).

تب مالت یا تب مواج که به اسامی دیگری مانند بروسلوز هم نامیده می‌شود در زمره مهم ترین و شناخته شده ترین بیماری های مشترک انسان و دام در سطح جهان و به ویژه در ایران محسوب می‌شود. بیماری از نظر بالینی می‌تواند به بیماری‌های تب‌دار دیگر شباهت داشته و فاقد هر گونه ویژگی بالینی اختصاصی باشد. علائم شایع و مهم بیماری شامل تب، لرز، تعریق، درد بدن و عضلات، درد مفاصل و ستون فقرات می‌باشد. در عین حال نشانه های گوارشی، تناسلی، قلبی- عروقی و عوارض عصبی از دیگر علائم بیماری می‌باشند. بسته به شکل بیماری و مشخصات مرتبط با میزبان می‌توانند در بدن ظهور یابند. کشندگی بیماری نادر است ولی با وجود شیوع قابل توجه آن برخی معتقدند این بیماری در سیستم‌های بهداشتی مورد غفلت واقع شده است. شیوع بیماری در مناطق مختلف، بر اساس شرایط آب و هوایی، گونه‌های دامی، سطح بهداشت دام، دسترسی به فرآورده‌های پاستوریزه و آزمون‌های تشخیصی مورد استفاده متغیر است(۴). هدف اختصاصی این مطالعه، بررسی آلودگی نمونه‌های خون گوسفندان در روستاهای مختلف شهرستان پیرانشهر به بروسلا با استفاده از آزمون- های سرولوژیکی و مولکولی بوده است.

مواد روش کار

منطقه مورد مطالعه

شهرستان پیرانشهر در جنوب غربی استان آذربایجان غربی و در مختصات جغرافیایی ۳۶ درجه و۴۲ دقیقه و ۱۵ ثانیه عرض شمالی و ۴۵ درجه و ۸ دقیقه و ۳۰ ثانیه طول شرقی از نصف النهار گرینویچ قرار دارد ارتفاع متوسط شهر از سطح دریا برابر ۱۴۴۵/۹متر است دارای آب و هوای سرد و نسبتا معتدل کوهستانی می باشد این شهرستان در معیشت شبانی و گوسفندداری نقش تعیین کننده‌ای دارد.

جمع‌آوری نمونه‌ها

تحقیق با فرض شیوع ۵٪ بیماری و سطح اطمینان ۹۵ درصد و با دقت ۵ درصد تعداد ۲۰۰ نمونه خون گوسفند و بز، از شهرستان پیرانشهر به طور تصادفی اخذ شد. نمونه‌های شیر اخذ شده در ظروف سترون در مجاورت یخ خشک به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شد. تعداد نمونه‌های اخذ شده در هر منطقه جغرافیایی و روستا در جدول شماره (۱) آورده شده است.

مرحله نمونه‌گیری

نمونه گیری در تاریخ خرداد ماه سال ۱۴۰۰ در روستای بادین آبادپیران از توابع بخش مرکزی، از تعداد ۴۵ راس گوسفند ماده بالغ دوساله خون گیری به عمل آمد. در آذر ماه سال ۱۴۰۰ روستای دیلزه از توابع بخش مرکزی و جزو دهستان‌های پیران، از تعداد ۳۵ راس گوسفند ماده بالغ دوساله خون گیری به عمل آمد. در دی ماه ۱۴۰۰ روستای قلاته رش از توابع بخش مرکزی، از تعداد ۳۸راس بز ماده بالغ خون گیری به عمل آمد. در تیر ماه ۱۴۰۰ روستای کانی اشکوت منگور واقع در دهستان منگور غربی به طرف شهرستان سردشت، از تعداد ۵۴ راس گوسفند ماده بالغ سه سال و بالاتر خون گیری به عمل آمد. در تیر ماه ۱۴۰۰روستای گرگول سفلی از توابع لاهیجان شرقی به طرف جاده مهاباد (جاده سر میدان) از طرف پسوه، از تعداد ۲۸ راس گوسفند بالغ خون‌گیری به عمل آمد.

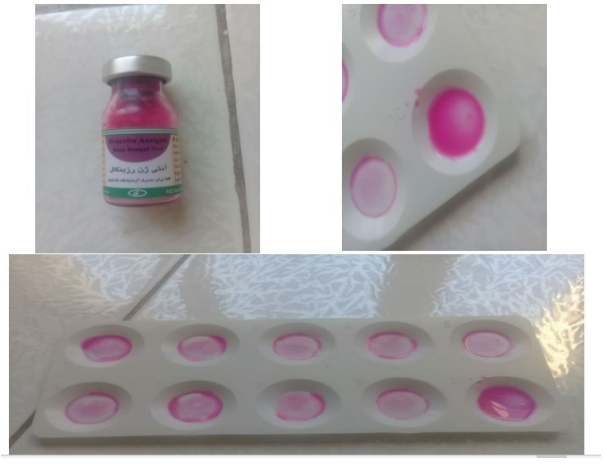
شکل ۱) نقشه شهرستان پیرانشهر، ایران

تشخیص بر اساس تست رزبنگال

نحوه‌ی تست رزبنگال (آزمایش تست سریع) در نمونه‌های اخذ شده بعد از انتقال به آزمایشگاه اداره دامپزشکی شهرستان پیرانشهر انجام شد.

روش انجام تست رزبنگال

ابتدا لوله‌های آزمایش حاوی خون گرفته شده مدتی در آزمایشگاه در یک جایگاه ثابت نگهداری شد تا سرم از خون جدا شود و سپس سرم جداسازی شده را به میکروتیوب های ۱/۵ میکرو لیتری انتقال داده شد. سپس جهت شفاف سازی بیشتر سرم میکروتیوب‌ها سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد از سرم‌ها به پلیت مخصوص انتقال داده شد و در ادامه با استفاده از آنتی ژن رزبنگال ۳۰ میکرو لیتر به هر نمونه سرم اضافه گردید، سرم با آنتی‌ژن به طور کامل مخلوط گردید. سپس به مدت ۱تا ۲ دقیقه بعد پلیت زیر نور چراغ جهت وجود ذرات ریز آگلوتیناسیون بررسی گردید. نمونه‌های که داری آگلوتیناسیون بودن به عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شدند. در نهایت نمونه‌های مثبت جهت انجام تست PCR در دمای ۲۰- جهت انتقال به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه نگهداری شدند. شکل (۲) تست رزبنگال را نشان می‌دهد



شکل ۲) تست رزبنگال

استخراج DNA از سرم

بعد از انجام تست رزبنگال نمونه های مثبت به منظور استخراج DNA استفاده شدند. از مجموع ۲۰۰ نمونه تعداد ۸۶ نمونه بر اساس تست رزبنگال مثبت بودند. در مرحله جهت استخراج از کیت استخراج DNA (Gene All cell SV mini 250 p) محصول شرکت پیشگام طبق دستور العمل سازنده انجام شد. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد حجم نمونه هایی که کمتر از ۲۰۰ میکرولیتر بود با PBS (Phosphate buffered saline) به حجم ۲۰۰ میکرو لیتر رسانده شد و سپس ۲۰ میکرو لیتر پروتئیناز K به نمونه اضافه گردید. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرو لیتر بافر لیز کننده BL (Lysis Buffer) به تیوب اضافه و ورتکس گردید و سپس در بن ماری ۵۶ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. پس از آن یک سانتریفیوژ کوتاه انجام داده شد و در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق به نمونه اضافه گردید. سپس یک ورتکس و سانتریفیوژ کوتاه انجام داده و سپس کل حجم نمونه به لوله‌های (SV) منتقل شد. در ۸۰۰۰ دور به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع زیری جمع‌آوری شده دور ریخته شد و سپس ۶۰۰ میکرولیتر بافر شستشو BW (Wash Buffer) اضافه شد. یک دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفیوژ صورت گرفت و مایع زیری خارج شد. در مرحله بعد ۷۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی مرحله دوم (TW) اضافه شد و یک دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد برای این که بافرهای باقی مانده حذف شوند با سرعت ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ انجام شد. در پایان ۲۰۰ میکرولیتر بافر جدا کننده یا احیاء AE (Elution Buffer) اضافه شد و مدت یک دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید، در پایان لوله‌ها با ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و نمونه‌های جمع شده داخل میکروتیوب برای انجام PCR در مراحل بعد فریز گردید.

بررسی DNA استخراج شده

جهت اطمینان از روش استخراج و ارزیابی میزان غلظت DNA به صورت تصادفی، جذب نوری تعداد ۱۰ نمونه از نمونه های استخراج شده توسط اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر قرائت شد و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ (DNA/Protein) نیز تعیین شد.

ترکیب مواد مورد نیاز جهت انجام PCR

برای انجام PCR مرحله اول، غلظت بهینه مواد به کار رفته در واکنش، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت زیر استفاده شد. ۵ میکرولیتر

DNA الگو (۱۰ نانوگرم DNA الگو در هر واکنش)، ۱میکرو مول از هر پرایمر رفت و برگشت، ۱۲/۵میکرو لیتر مستر میکس و ۶/۵ میکرو لیتر آب مقطر. لوله‌ها در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند.

تشخیص جنس *بروسلا* و گونه *بروسلا* به روش PCR

در این مطالعه از روش Orzile و همکاران (۲۰۱۶) برای تشخیص بروسلا و گونه‌های آن استفاد شد. به منظور شناسایی باکتری *بروسلا* از جفت پرایمرهای اختصاصی ژن *16SrRNA* استفاده گردید(۵). همچنین جهت تشخیص گونه‌های *بروسلا آبورتوس*، *بروسلا ملی تنسیس*، *بروسلا سوئیس و بروسلا اویس* از روش Bricker و Halling (۱۹۹۴) استفاده شد(۶). از جفت پرایمر *IS711* اختصاصی گونه *بروسلا آبورتوس* استفاده گردید لیست پرایمرهای استفاده شده در (جدول ۱) آورده شده است. برنامه و سیکل‌های دمایی برای جنس و گونه یکسان بوده که در (جدول ۲) آورده شده است. در این بررسی، کنترل مثبت از سویه واکسنی RB54 و کنترل منفی بدون حضور DNA (بجای DNA آب مقطر استریل اضافه شد).

نام ژن	نام پرایمر	سکانس ۵/----------۳/	محصول PCR (جفت باز)	غلظت مورد در هر واکنش
16srRNA	16s.Universal.800F	GTGCCAGCAGCCGCCGTAATAC	۸۰۰	۲۵ میکرومولار
	16s.Universal.800R	TGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG		
eriD	Bru-BMEii0428F	GCCGCTATTATGTGGACTGG	۴۹۸	
	Bru-BMEii0428R	AATGACTTCACGGTCGTTCG		
AMOS	Bru-AMOS-Ab	GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC	۵۹۰	
	Bru-AMOS-Me	AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA	۷۳۱	
	Bru-AMOS-Ov	CGGGTTCTGGCACCATCGTCG	۹۷۶	
	Bru-AMOS-Su	GCGCGGTTTTCTGAAGGTTCAGG	۲۸۵	
IS711	Bru-AMOS	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT		

جدول ۱) پرایمر های مورد استفاده جهت شناسایی بروسلا (۷).

تعداد چرخه‌ها	زمان	دما(°C)	مرحله
۱	۳ دقیقه	۹۵	واسرشت سازی اولیه
۳۵	۷۵ ثانیه	۹۵	واسرشت سازی
	۸۰ ثانیه	۵۵/۵	چسبیدن پرایمر
	۸۰ ثانیه	۷۲	توسعه
۱	۵ دقیقه	۷۲	توسعه نهایی

جدول ۲) برنامه و سیکل های دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جهت شناسایی *بروسلا (ابورتوس، ملی‌تنسیس، سوئیس و اویس)* (۷).

الکتروفورز و آنالیز محصولات PCR

جهت شناسایی آمپلیکون‌ها یا فرآورده های تکثیر یافته‌ی حاصل از واکنش های PCR، از روش الکترفورز روی ژل آگارز استفاده شد. در این مرحله با توجه به اندازه آمپلیکون‌ها، ژل آگاروز ۱/۵ درصد تهیه گردید که برای این منظور ۰/۸ گرم آگاروز را به ۴۰ سی سی TBE با غلظت ۰/۵X اضافه گردید و تا شفاف شدن آن حرارت داده شد. و در حین سرد شدن ۱/۵ میکرولیتر رنگ Safe Stain(Smobio, Taiwan) در زیر هود لامینار به محلول اضافه شد و خوب مخلوط گردید تا ترکیب حاصل کاملاً یکنواخت شود. در نهایت مخلوط حاصل، در زیر هود داخل قالب های مخصوص ژل الکترفورز ریخته شد. با ژله‌ای و سفت شدن مخلوط، ژل آگاروز برای انجام الکتروفورز استفاده گردید.

آنالیز آماری داده‌ها

آنالیز آماری داده ها با استفاده از روش آماری کای (Chi-square Tests) دو انجام شد. از برنامه آماری SPSS نسخه ۲۲ (IBM, USA) برای انجام آزمون آماری استفاده گردید. اختلاف با $p < ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

توزیع و فراوانی *بروسلا* در جمعیت گوسفندان مناطق مورد مطالعه

شیوع و فراوانی *بروسلا* در گوسفند بر اساس تست رزبنگال ۸۱ نمونه (۴۰/۵ درصد) و بر اساس PCR ۲۸ نمونه (۳۴/۵ درصد) بود. بر اساس تست رزبنگال شیوع *بروسلا* در گوسفندان در مناطق مورد مطالعه به ترتیب در روستای مرکزی (روستای بادین آباد) ۲۴/۴ درصد، در (روستای دیلزه) ۸۲/۹ درصد، در (روستای اشکوت منگور) ۵۵/۵ درصد بود. جدول شماره مشاهده شود.

توزیع و فراوانی *بروسلا* در جمعیت بزان منطقه

شیوع فراوان *بروسلا* در بز بر اساس تست رزبنگال ۸ نمونه (۲۱ درصد) و براساس تست پی سی آر ۵ نمونه (۶۲/۵ درصد) بود. بررسی نتایج نشان می دهد شیوع بیماری بر اساس نوع دام تفاوت معنی داری دارد($p<۰/۰۵$). به طوری که فراوانی آلودگی در گوسفندان نسبت به بزان بیشتر از بزان بوده است. جدول (۳) مشاهده شود.

منطقه جغرافیایی نمونه‌گیری	نام روستا	نوع دام	تعداد نمونه	رزبنگال مثبت	تست PCR
مرکز	بادین آباد	گوسفند	۴۵	۱۱	۵
مرکز	دیلزه	گوسفند	۳۵	۲۹	۸
مرکز	قلاته‌رش	بز	۳۸	۸	۵
مرکز	اشکوت منگور	گوسفند	۵۴	۳۰	۱۲
شرق	گرگول سفلی	گوسفند	۲۸	۸	۳
جمع کل			۲۰۰	۸۶	۳۳

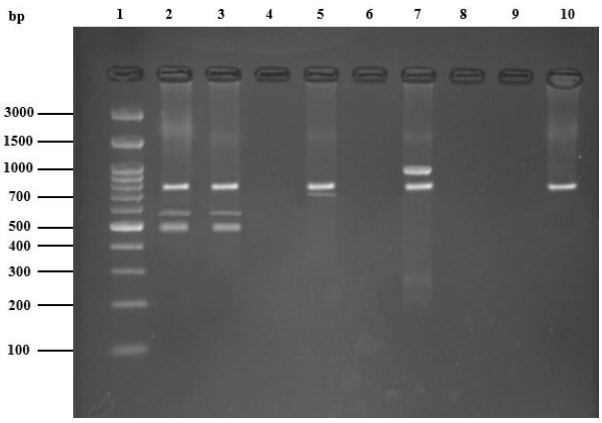
جدول ۳) آنالیز آماری متغیر مرتبط با شیوع *بروسلا* در گوسفندان و بزان منطقه پیرانشهر

نتایج براساس رابطه سقط با باکتری *بروسلا*

بررسی نتایج این مطالعه نشان می‌دهدکه اختلاف معنی داری بین سقط در حیوان توسط باکتری بروسلا وجود دارد. لذا مشخص گردید که گوسفندان نسبت به بزان حساسیت بیشتر داشته و احتمال سقط در گوسفندان بیشتر از بزان می‌باشد. یعنی ارتباط معنی داری وجود دارد ($p< ۰/۰۵$).

نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی حضور گونه‌های *بروسلا*

از مجموع ۲۰۰ نمونه سرم جمع آوری شده، تعداد ۳۳ نمونه (۱۶/۵ درصد) برای *بروسلا بر اساس ژن 16SrRNA* که قطعه ۸۰۰ جفت بازی از ژن *16SrRNA* با روش PCR تکثیر می‌دهد، مثبت بوده. الکتروفورز محصولات بیانگر تعدادی ۱۹ نمونه مثبت *بروسلا آبورتوس*، ۱۰ نمونه مثبت *بروسلاملی‌تنسیس* و در نهایت ۴ نمونه مثبت *بروسلاویس* بود. تصویر نمونه های مثبت با باندهای مورد انتظار در (شکل ۳) آورده شده است



شکل ۳) آزمایش PCR بر اساس ژن *16S rRNA* سرم گوسفند و بز مورد مطالعه محصول PCR ژن *16S-rRNA* با استفاده از ژل ۱/۵ آگاروز. چاهک ۱: مارکر با وزن مولکولی bp ۱۰۰ (پیشگام، ایران)، چاهک‌های۳و۱: جدایه‌های *بروسلا آبورتوس*، چاهک‌های ٤، ٦، ٨ : نمونه‌های منفی، چاهک ۱۰ : کنترل مثبت *بروسلا*، چاهک ۷: نمونه مثبت *بروسلا ملی‌تنسیس*، چاهک ۷: نمونه مثبت بروسلا/*ویس*

بحث

تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز و تعیین هویت گونه‌های *بروسلا* در اصل بر پایه کشت ارگانیسم و تعیین ویژگی‌های فنوتیپی آن قرار دارد. این فرآیند ضمن این که زمان بر و مستلزم کار آزمایشگاهی قابل توجهی است، می‌تواند خطر ایجاد آلودگی‌های آزمایشگاهی بروسلوز را نیز به همراه داشته باشد(۸). برای رفع این مشکلات و نیز دستیابی به متدهای ردیابی سریع پاتوژن و نیز تعیین دقیق گونه‌های *بروسلا*، تکثیر اسیدهای نوکلئیک آن مد نظر قرار گرفت(۹). برای تشخیص *بروسلا* با روش PCR تاکنون براساس سکانس نواحی مختلف ژنوم سویه های مختلف باکتری پرایمرهای متعددی طراحی شده و پروتکل‌های گوناگون PCR ارایه شده و نتایج آن‌ها منتشر شده است(۱۰). طی مطالعه Mostafavi و همکاران در سال ۲۰۱۲، روند بیماری در کشور از سال ۱۳۷۰ تا ۱۳۸۷ در گاو رو به کاهش بوده است. طبق دستورالعمل سازمان دامپزشکی کشور، شناسایی موارد آلوده توسط آزمون‌های سرولوژی رزبنگال، رایت و 2ME انجام می‌شود. لیکن این آزمایش‌ها به دلیل حساسیت و ویژگی پایین، قادر به تشخیص صحیح موارد آلوده نمی‌باشند و گاه با نتایج منفی و مثبت کاذب همراهند(۱۱–۱۳). نتایج منفی کاذب به معنی عدم تشخیص گاو آلوده و باقی ماندن منبع عفونت در بین دام های گله است که خود تا زمان آزمایش بعدی که حداقل ۶ ماه طول می‌کشد موجب انتشار باکتری در بین دام‌ها و خطر آلودگی انسان از طریق مستقیم یا غیر مستقیم را به دنبال خواهد داشت و مثبت کاذب یعنی حذف دامی که علی‌رغم تولید در گله و عدم خطر انتشار عفونت با پرداخت غرامت توسط دولت و وارد کردن خسارت به دامدار به کشتارگاه اعزام می‌شود. باید اذعان نمود که آزمون‌های سرولوژی ویژگی کافی جهت تعیین موارد منفی کاذب را ندارند و با عنایت به ارزش گاو شیری در حال حاضر ضروری است روش‌های تشخیصی را مورد ارزیابی قرار داده و تلاش شود تا از روش‌های جایگزین با حساسیت و ویژگی بالاتر یا از آزمون‌های تکمیلی برای شناسایی موارد سرواکتیو استفاده نمود، زیرا در مجموع خسارت زیادی را به اقتصاد ملی وارد می‌نماید. مضافا بر این که دامداری که به عنوان مثبت گزارش می‌شود دچار بحران‌های جدی می‌شود. روش‌های سرولوژی جدید از جمله الایزا، کشت میکروبی و تکنیک‌های تشخیص مولکولی در زمره روش‌های تکمیلی به

حساب می‌آیند که محققین مختلف آنرا مورد ارزیابی قرار داده‌اند. نتایج مطالعه حاضر نیز تنها توانست حدود ۱۶/۵ درصد از موارد سروپوزیتیو را در آزمون PCR تایید نماید یعنی اگر این عدد را تنها در منطقه پیرانشهر در نظر بگیرم خسارتی شاید نزدیک به ۱۰ میلیارد ریال را در سال مورد ایجاد شود(۱۴).

تشخیص دام مبتلا از طریق کشت میکروبی محدود به موارد خاص بوده و نمونه‌برداری جهت کشت میکروبی در حجم وسیع امکان پذیر نیست. لذا بیشتر باید به فکر روش‌های سرولوژی بهتر یا تکنیک‌های تشخیص مولکولی بود. در مطالعه‌ای که Ghosian Moghadam و همکاران در سال ۲۰۰۸ به منظور مقایسه بین نتایج کشت و PCR نسبت به آزمایش رایت در گاو، انجام دادند نتیجه گرفتند که روش کشت ۳۱/۶ درصد حساسیت و ۴۸ درصد با نتایج آزمایش رایت همخوانی دارد در حالی که این مقادیر برای آزمایش PCR، ۵۸ درصد حساسیت و ۶۵ درصد همخوانی بود و از این رو پیشنهاد نمودند که روش PCR می‌تواند به عنوان یک روش سریع و مناسب در تشخیص بروسلا مورد استفاده قرار گیرد. در گوسفند نیز نتایج تقریبا مشابه است(۱۵). در مطالعه ILhan و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه روی بافت‌های ۱۶۲ راس گوسفند، شامل ۴۵ مورد سروپوزیتیو و ۱۱۷ مورد سرونگاتیو با روش کشت و PCR، باکتری *بروسلاملی‌تنسیس*، ۱/۲ درصد موارد خون و ۱۷/۲ درصد عقده‌های لنفی جدا شد. در حالی که ۲۷/۷ درصد از نمونه‌های خون و ۲۹ درصد از اندام‌های لنفاوی آن‌ها در آزمون PCR نتیجه مثبت نشان دادند که با نتایج بدست آمده در این مطالعه تقریبا همخوانی دارد. در شتر نیز گزارش شده است که موفقیت PCR در شناسایی موارد مثبت بیشتر از آزمایش سرولوژی بوده است(۱۶). در مطالعه Ghorbani و همکاران در سال ۲۰۱۲ نتایج سرولوژی، کشت و nested-PCR روی ۳۱۰ نمونه سرم شتر نشان داد که حساسیت PCR در شناسایی موراد از روش سرولوژی و کشت بیشتر است. هیچ یک از نمونه‌های عقده لنفاوی در کشت نتیجه مثبت به همراه نداشت در حالی که ۶ نمونه‌ی خون و ۹ نمونه سرم در بین ۱۰۰ نمونه در روش nested-PCR مثبت بودند(۱۷).

با توجه به این که روش‌های ملکولی انجام شده معمولا روی خون انجام می‌شود و نظر به این که باکتری برای مدت طولانی در خون حضور ندارد. در این مطالعه آزمون PCR در دام‌های سروپوزیتیوی انجام شد با توجه به فاصله زمانی تست سرولوژی و تست PCR علت پایین بودن موارد مثبت با PCR می‌تواند به دلیل دیر انجام شدن تست ملکولی به دلیل دیر شدن مرحله سنتز پرایمرها باشد.

بیشتر تست‌های PCR با استفاده از ژنوم تخلیص شده کشت خالص باکتری ارزیابی شده‌اند؛ بنابراین کارآیی عملی آن‌ها در آزمای نمونه‌های بالینی تا حدود زیادی بستگی به شرایط آزمایش دارد. البته پرایمرهایی نیز طراحی و با استفاده از نمونه‌های بالینی (انسانی و دامی) آزمایش شده که در این مورد نیز نتایج به دست آمده در همه شرایط قابل تکرار نمی‌باشد. بیشتر پرایمرهای طراحی شده برای *بروسلا*، باکتری را در سطح گونه تشخیص داده و قادر به تمایز بین گونه‌ها نمی‌باشند. پرایمرهای به کار برده شده بر اساس اینسرشن سکانس یا *IS711* طراحی شده که در تمامی گونه‌های *بروسلا* منحصر بوده و تعداد کپی و موقعیت اینسرشن سکانس در هر گونه و بیووار متمایز است(۱۸). پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق قبلا آزمایش شده و نسبت به باکتری‌های نزدیک با *بروسلا* نتیجه منفی داشته‌اند(۱۹). علت کاهش حساسیت ممکن است به خاطر این باشد که ست آماده شده PCR برای یک گونه خاص (*بروسلاآبورتوس*) طراحی شده(۲۰) و طبیعی است که قادر به تشخیص بروسلاهای غیر از آبورتوس مناسب نباشد. ضمن این که پرایمرهای استفاده شده در سطح گونه اختصاصی بوده و احتمال دارد نمونه تشخیص داده نشده محتوی گونه‌ای غیر از *بروسلا آبورتوس* بوده باشد. به بیان دیگری *بروسلای* تشخیص داده نشده با PCR به احتمال زیاد گونه‌ای غیر از بروسلا *آبورتوس* بوده که پرایمرهای اختصاصی برای *بروسلا آبورتوس* قادر به ردیابی آنها نبوده است. علت دیگری که می‌تواند توجیه کننده این حساسیت نه چندان مناسب باشد این است که حساسیت این واکنش در مرحله اپتیمایز کردن حدود ۶۰۰ باکتری تعیین شده. بنابراین قابل انتظار است که قادر به ردیابی DNA باکتری‌های کمتر از این حد نباشد.

روش‌های سرولوژیک ویژگی کمی دارند و تیتر آنتی بادی برای مدت زمانی 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، اهیمت روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی آشکار می‌شود(۲۰). ابداع روش‌های شناسایی نوین، شناسایی دقیق جنس *بروسلا* را امکان‌پذیر ساخته است. استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به سکانس‌های *۱۶SrRNA* و *bcsp ۳۱* به عنوان ابزارهای مناسبی برای ردیابی باکتری‌ها در نمونه‌های بالینی و دامی به‌ویژه شناسایی جنس *بروسلا* تأیید شده‌اند(۲۱). در سال ۲۰۰۰ Zowgi و همکاران، با استفاده از روش‌های سرولوژی رایج، بیوواراهای M1 و M2 *بروسلاملی‌تنسیس* و بیوواراهای A1, A2, A3 گونه‌ی *بروسلا آبورتوس* جدا شده از دام‌های را در ایران گزارش کردند(۲۲). در مطالعه Dosti و همکاران ۲۰۱۱ نیز از ۸۳ نمونه‌ی سرمی گاوهای مثبت در PCR، ۹ مورد به *بروسلاملی‌تنسیس*، ۶۹ مورد به

بروسلاآبورتوس و ۵ مورد همزمان به *بروسلاآبورتوس* و *بروسلاملی‌تنسیس* آلوده بودند(۲۳). در این مطالعه، مشخص شد که ۱۹ نمونه (۷۳ درصد) از جدایه تایید شده‌ی جنس *بروسلا* متعلق به گونه‌ی *بروسلاآبورتوس*، ۱۰ نمونه (۲۷ درصد) متعلق به گونه‌ی بروسلا *ملی‌تنسیس* و ۴ نمونه (۴/۷ درصد) متعلق به *بروسلااویس* بودند که این نتایج با نتایج پژوهش‌های انجام شده همخوانی دارد.

Khalili و همکاران شیوع سرمی بروسلوز را در کارگران کشتارگاه دام کرمان ۵۸/۶ درصد گزارش نمودند (۲۴). Shafei و همکاران در بررسی ۶۰ نمونه شیر گاو مشکوک به بروسلوز، در استان کردستان، ۳۳/۴ درصد با روش PCR مثبت گزارش کردند (۲۵). Abdalla در سودان با روش PCRIS711 توانست ۲۲/۴ درصد از نمونه‌های شیر خام باکتری *بروسلا* را تشخیص دهد(۲۶). در مطالعه‌ای که Kayank و همکاران انجام دادند، ۲ درصد از کل نمونه‌ها هم با روش qPCR و هم با روش کشت از نظر وجود باکتری *بروسلاآبورتوس* مثبت گردید (۲۷).

علت تفاوت در میزان شیوع و آلودگی به *بروسلا* در این مطالعه با مطالعات دیگری می‌تواند در روش‌های جداسازی و تشخیصی (کشت و سرولوژی با روش‌های مولکولی)، موقعیت جغرافیایی، گسترش بیوروراها 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 استفاده‌ی بی‌رویه مدیریت نشده‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های گوناگون عفونی در دام‌های بررسی شده باشد. همچنین باید در نظر داشت که حضور سویه‌های متفاوت و جدید به عنوان عوامل عفونی می‌تواند به احتمال فراوان با قدرت بیماری زایی 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 (۲۸).

از آنجایی که تنها منبع پخش آلودگی دام‌های اهلی هستند، بهترین راهکار واکسیناسیون مناسب دام‌ها و حذف دام‌های مثبت است. از سوی دیگر عدم واکسن در درمان‌های دیر هنگام، ناکارآمد بودن تکنیک‌های تشخیصی، عدم وجود علایم اختصاصی، وجود مخازن دامی که نقش انکوباتور را دارد، از جمله مهمترین مشکلات در بهداشت عمومی است. با توجه به کاستی‌های بیان شده، ضرورت همکاری نزدیک پزشکی و دامپزشکی در پایش و پیشگیری از بروسلوز و سایر زئونوزها احساس می‌شود. توجه بیشتر به گوسفند و بز از نظر اهمیت این گونه‌ها در انتشار *بروسلاملی‌تنسیس* که عامل اصلی عفونت در موارد بالینی انسان است و می‌تواند مخزن آلودگی برای گاو هم باشد نیز قویا توصیه می‌گردد.

نتیجه گیری

مطالعه‌ی حاضر اولین مطالعه‌ی است که بررسی شیوع *بروسلا* و گونه‌های *بروسلا آبورتوس*، *بروسلا ملی‌تنسیس* و *بروسلااویس* را در خون گوسفند و بز در استان آذربایجان غربی منطقه پیرانشهر انجام شده است. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که خون گوسفند و بز می‌تواند از منابع و مخازن مهم عامل بروسلوزیس در منطقه پیرانشهر باشند. همچنین گوسفند و بز می‌توانند نقش مهمی در اپیدمیولوژی بروسلوزیس در منطقه پیرانشهر داشته باشند. و اینکه *بروسلا اویس* از عوامل مهم سقط جنین می‌باشد که به آن کمتر اهمیت داده شده است. در نهایت نتایج نشان دادن که PCR چندگانه یک روش موثر جهت تشخیص *بروسلاملی‌تنسیس*، *بروسلاآبورتوس* و *بروسلااویس* می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه برای تأمین اعتبار مورد نیاز پژوهش حاضر و مساعدت‌های فراوانی که در انجام مراحل مختلف این مقاله انجام شده است، تشکر و قدردانی کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع گزارش نشده است.

منابع

1. Corbel M. Recent advances in brucellosis. Journal of medical microbiology. 1997;46(2):101-3.
2. Spanu V, Spanu C, Virdis S, Cossu F, Scarano C, De Santis EPL. Virulence factors and genetic variability of Staphylococcus aureus strains isolated from rawsheep's milk cheese. International Journal of Food Microbiology. 2012;153(1-2):53-7.
3. Davydov N. Properties of Brucella isolated from reindeer. Trudy Vsyesoyuz Inst Eksp Vet. 1961;27:24-31.

4. Shakerian A, Nodargah M. Review of Brucella contamination inMilk and its products of Iran. 2018.
5. Orzil LdL, Preis IS, Almeida IGd, Souza PGd, Soares PM, Jacinto FB, Fonseca AA. Validation of the multiplex PCR for identification of Brucella spp. Ciência Rural. 2016;46:847-52.
6. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of Brucella abortus bv. 1, 2, and 4, Brucella melitensis, Brucella ovis, and Brucella suis bv. 1 by PCR. Journal of clinical microbiology. 1994;32(11):2660-6.
7. Parisi A, Fraccalvieri R, Cafiero M, Miccolupo A, Padalino I, Montagna C, et al. Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. Veterinary microbiology. 2006;118(1-2):101-6.
8. SERPE L, GALLO P, FIDANZA N, SCARAMUZZO A, FENIZIA D. Single-step method for rapid detection of Brucella spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. Journal of dairy research. 1999;66(2):313-7.
9. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, García-Ordonez MA, Cárdenas A, Colmenero JD. Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. Journal of clinical microbiology. 2003;41(1):144-8.
10. Morata P, Queipo-Ortuño MI, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. Journal of clinical microbiology. 1998;36(9):2443-6.
11. Nielsen K, Smith P, Widdison J, Gall D, Kelly L, Kelly W, Nicoletti P. Serological relationship between cattle exposed to Brucella abortus, Yersinia enterocolitica O: 9 and Escherichia coli O157: H7. Veterinary microbiology. 2004;100(1-2):25-30.
12. Mostafavi A, Asmand M. Process of brucellosis (Malta fever) in Iran during 1993-2006. Iranian Journal of Epidemiology (In Persian). 2012;8:94-101.
13. Lübeck PS, Skurnik M, Ahrens P, Hoorfar J. A multiplex PCR-detection assay for Yersinia enterocolitica serotype O: 9 and Brucella spp. based on the perosamine synthetase gene. The Genus Yersinia: Springer; 2004. p. 451-4.
14. Mahzounieh M, Mehri H, Seidi Samani H, Momeni A, Shokuhi A, Khaksar K, et al. Genomic detection of Brucella spp in Seropositive cattle in charmahal va Bakhtiyari province, Iran. Journal of Veterinary Research. 2015;70(4):395-401.
15. GHOUSIAN MM, KEYVANI AH, ZAHRAEI SM, Khazraeinia P, FALAH N. A comparison of cultureand PCR methods wrights test for diagnosis of brucellosis. 2008.
16. Ilhan Z, Aksakal A, Ekin I, Gülhan T, Solmaz H, Erdenlig S. Comparison of culture and PCR for the detection of Brucella melitensis in blood and lymphoid tissues of serologically positiveand negative slaughtered sheep. Letters in applied microbiology. 2008;46(3):301-6.
17. Ghorbani A, Khorasgani MR, Zarkesh-Esfahani H, Sharifiyazdi H, Kashani AD, Emami H. Comparison of serology, culture, and PCR for detection of brucellosis in slaughtered camels in Iran. Comparative Clinical Pathology. 2013;22(5):913-7.
18. Thomsen VØ, Kok-Jensen A, Buser M, Philippi-Schulz S, Burkardt H-J. Monitoring treatment of patients with pulmonary tuberculosis: can PCR be applied? Journal of clinical microbiology.۷-۳٦۰۱:(۱۱)۳۷;۱۹۹۹ .
19. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of Brucella spp., B. abortus, and B. melitensis. Journal of clinical microbiology. 2004;42(3):1290-3.
20. Leyla G, Kadri G, Ümran O. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. Veterinary Microbiology. 2003;93(1):53-61.
21. Solera J, Solis Garcia del Pozo J. Treatment of pulmonary brucellosis: a systematic review. Expert review of anti-infective therapy. 2017;15(1):33-42.
22. Zoughi E, EBADI A, Yarahmadi M. Isolation and identification of Brucella organisms in Iran. 2008.
23. Doosti A, Ghasemi Dehkordi P. Application of real-time PCR for identification and differentiation of Brucella abortus and Brucella melitensis in cattle. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 2011;14(2):109-15.
24. Khalili M, Sami M, Aflatoonian MR, Shahabi-Nejad N. Seroprevalence of brucellosis in slaughterhouse workers in Kerman city, Iran.

Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2012;2(6):448-50.
25. Shafei B, Ahmadi M, DASTMALCHI SH. Diagnosis of Brucella abortus and Brucella melitensis in the milk of cattle and sheep in Kordestan province by polymerase chain reaction. 2012.
26. Abdalla A, Hamid ME. Comparison of conventional and non-conventional techniques for the diagnosis of bovine brucellosis in Sudan. Tropical animal health and production. 2012;44(6):1151-5.
27. Kaynak-Onurdag F, Okten S, Sen B. Screening Brucella spp. in bovine raw milk by real-time quantitative PCR and conventional methods in a pilot region of vaccination, Edirne, Turkey. Journal of dairy science. 2016;99(5):3351-7.
28. Alizadehmofrad F, Parvini M. Evaluation and Diagnosis of Speciesand Biovars of Brucella among cattles by Multiplex Polymerase Chain Reaction. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2017;11(5):107-14.