JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره هشتم، شماره دوم، ۱۳۹۱، پیاپی ۲۵: ۱۳۵-۱۲۷

تشخیص *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* در شیر گاوها و گوسفندان استان کردستان با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

بهزاد شفیعی[۱]، ملاحت احمدی[۲*]، حبیب دستمالچی ساعی[۲]

۱- دانش آموخته دوره کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۲۳ آبان ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۲٤ اسفند ۱۳۹۱

چکیده

بروسلوز یکی از بیماری‌های مهم مشترک بین انسان و دام می‌باشد. بیماری از بسیاری کشورها گزارش و در تعدادی از کشورها و ایران بومی است. مصرف شیر و فرآورده‌های آلوده‌ی دامی یکی از راه‌های اصلی انتقال بیماری به انسان می‌باشد. با توجه به اینکه در اغلب استان‌های ایران مانند کردستان گله‌های گاو و گوسفند در کنار هم نگهداری می‌شوند و ممکن است دام‌ها به گونه‌های غیر اختصاصی بروسلا آلوده شوند، هدف مطالعه حاضر استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نشان دادن آلودگی شیر و وضعیت میزبان‌های غیر ترجیحی بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس در گاو و گوسفند می‌باشد. در این مطالعه تعداد ۶۰ نمونه شیر از گاو و ۵۰ نمونه از گوسفند مشکوک به بروسلوز از روستاهای شهرستان‌های کامیاران-مریوان و سنندج اخذ گردید. DNA به صورت مستقیم از نمونه‌های شیر استخراج گردید. آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای B4 و B5 به منظور تشخیص جنس بروسلا و با استفاده از پرایمرهای B. a و B. m و IS711 به منظور تشخیص بعضی از بیووارهای گونه‌های آبورتوس و ملی‌تنسیس انجام گرفت. با انجام PCR جهت تشخیص جنس بروسلا از نمونه های جمع‌آوری شده در شیر گاوها ۲۰ مورد و در شیر گوسفندها ۲۲ مورد مثبت بود. از ۲۰ نمونه مثبت گاوی ۹ نمونه به عنوان بروسلا آبورتوس بیووار (۱، ۲ و ۴) و ۲ نمونه به عنوان بروسلا ملی‌تنسیس شناسایی شد. از ۲۲ نمونه مثبت گوسفندی در ۱۵ نمونه بروسلا ملی‌تنسیس و ۱ نمونه به عنوان بروسلا آبورتوس بیووار (۱، ۲ و ۴) شناسایی شد. نظر به اینکه در ۲ راس گاو، بروسلا ملی تنسیس و در ۱ راس گوسفند بروسلا آبورتوس، شناسایی شد، بنابراین در گله‌هایی که در ارتباط نزدیک با یکدیگر نگهداری می‌شوند ممکن است دام‌ها به گونه‌های غیر ترجیحی خود آلوده شوند. با توجه به نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌شود جهت تشخیص بروسلاها در نمونه شیر، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که قادر باشند تمام بیووارهای بروسلا آبورتوس و بروسلا ملیتنسیس را تشخیص دهند از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در کنار کشت استفاده شوند.

کلمات کلیدی: *گوسفند، بز، گاو، بروسلا، تشخیص، شیر*

* نویسنده مسئول: ملاحت احمدی

آدرس: گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه،ایران. تلفن: ۰۴۴۱-۲۹۷۲۶۴۹

پست الکترونیک: m.ahmadi@urmia.ac.ir

مقدمه

بروسلوز یکی از بیماری‌های مهم عفونی مشترک بین انسان و دام است که در اثر آلودگی با باکتری‌های جنس *بروسلا* به وجود می‌آید. این بیماری بهداشت و سلامت عمومی واقتصاد دامی دربعضی از کشورها از جمله ایران را به خطر انداخته است (۹).

باکتری *بروسلا* در دام‌های آلوده در غدد پستانی و غدد لنفاوی فوق پستانی جایگزین شده و به داخل شیر ترشح شود و از این طریق نیز می‌تواند به انسان منتقل شود. یکی از آزمایشات معمول که برای نظارت و غربالگری بروسلوز در گاوها استفاده می‌شود، آزمون حلقه‌ای شیر است، گرچه حساسیت این آزمون موردتایید است ولی اختصاصیت آن در مواردی که شیوع بیماری پایین باشد مورد سوال قرار گرفته است، علاوه بر این نتایج مثبت کاذب نیز مشاهده می‌شود، بنابراین یافتن راهی برای تشخیص دقیق این پاتوژن در نمونه‌های شیر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۸و۱۰).

کاربرد روش‌های جدید تشخیصی که از یک طرف منجر به ردیابی و تشخیص سریع و دقیق *بروسلا* شود و از طرف دیگر خطر عفونت با این باکتری را در آزمایشگاه به حداقل برساند، ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین روش‌های تشخیص مولکولی که ساده، سریع و دارای خطر کمتر بوده و معمولا حساسیت بیشتری، برای تشخیص *بروسلا* دارند، گسترش یافته‌اند. PCR روشی است سریع و دقیق که حساس‌تر از روش کشت بوده و دارای اختصاصیت بیشتری نسبت به تست‌های سرولوژیکی برای تشخیص بروسلوز می‌باشد (۴، ۵و۱۴).

هر کدام از گونه‌های *بروسلا* در میزبان خاصی بیماری‌زایی بیشتری دارند و با وجودی که *بروسلا*ها دارای میزبان ترجیحی هستند ولی این اختصاصی بودن بویژه در مواردی که دام‌های اهلی مختلف در ارتباط نزدیک با یکدیگر نگهداری می‌شوند، قابل انتقال به میزبان ترجیحی می‌باشند. بنابراین شناسایی دقیق گونه-های *بروسلا* جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی در انسان و حیوانات اهلی، به منظور بکارگیری راه‌های کنترلی مناسب، اهمیت پیدا می‌کند (۱۲).

هدف از مطالعه حاضر استفاده از آزمون PCR در تشخیص باکتری *بروسلا* در شیر گاو و گوسفند و نیز پیشنهاد راهی سریع، حساس و کم خطر به منظور شناسایی گونه‌های *بروسلا* در شیر دام‌ها و بررسی میزبان‌های غیر ترجیحی گونه‌های *آبورتوس* و *ملی تنسیس* در استان کردستان می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه‌های شیر

در طی این مطالعه ۶۰ نمونه شیر از گاوان و ۵۰ نمونه شیر از گوسفندان مشکوک به بیماری بروسلوز از روستاهای مختلف شهرستان‌های استان کردستان (کامیاران، مریوان و سنندج) اخذ گردید.

از آنجایی که در عفونت با *بروسلا* ممکن است یک یا چند کارتیه باکتری را به داخل شیر ترشح کنند بنابراین نمونه‌گیری از تمام کارتیه‌ها انجام شد. از هر کارتیه ۱۰ میلی لیتر شیر اخذ گردید (۱۱). شیر تمام کارتیه‌ها (چهار کارتیه در گاو و دو کارتیه در گوسفند) در یک ظرف نمونه‌گیری (فالکون تیوب ۵۰ میلی لیتر) ریخته شده و به عنوان یک نمونه محسوب شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرازدر دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج مستقیم DNA از نمونه‌های شیر

مقدار ۱/۵ میلی لیتر از شیر به داخل میکروتیوب‌های استریل ریخته شد و در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد که در این مرحله سه لایه در داخل میکروتیوب‌ها تشکیل شد که لایه بالایی چربی شیر و لایه میانی مایع شفاف و لایه پایینی رسوبات شیر بود. مایع شفاف (لایه میانی) با استفاده از سمپلر ۱۰۰ میکرولیتری خارج گردید و در نهایت در هر لوله چربی شیر و رسوبات باقی ماند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول TE به آن اضافه و خوب مخلوط گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (Fermantas, Germany) و مطابق دستورات شرکت سازنده آن انجام شد.

تشخیص مولکولی جنس *بروسلا* با تکثیر ژن *bcsp31*

تشخیص جنس *بروسلا* در شیر باتکثیر ژن *bcsp31* به روش PCR و با استفاده از پرایمرهای ارائه شده توسط بایلی و همکاران ۱۹۹۲ (پرایمرهای B4 و B5) انجام گردید (۲). اطلاعات مربوط به پرایمرها در جدول۱ ارائه شده است.

تشخیص مولکولی گونه‌های *بروسلا ملی تنسیس* و *بروسلا آبورتوس*

تشخیص گونه‌های *بروسلا آبورتوس* (بیووار های ۱، ۲ و ۴ آبورتوس) و *بروسلا ملی تنسیس* به روش PCR و با استفاده از پرایمرهای ارائه شده توسط برایکر و هالینگ (۱۹۹۴) انجام شد(۳). توالی پرایمرها در جدول ۲ نمایش داده شده است.

مخلوط نهایی برای انجام آزمایش PCR برای هر نمونه، ۲۵ میکرولیتر بود .

در نهایت میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند و پس از تنظیم چرخه‌های دمایی واکنش PCR بر روی نمونه‌ها انجام شد.

الکتروفورزمحصولات PCR

ابتدا ژل آگارز ۱/۵ درصد تهیه و سپس محصولات PCR به درون چاهک‌های ژل منتقل گردید.

به این منظور حدود ۷ میکرو لیتراز محصول PCR با دو میکرولیتر بافر بارگذار به آرامی مخلوط و با دقت کامل به درون چاهک‌ها اضافه گردید. در چاهک اول به میزان ۷ میکرولیتر، (100bp, Fermentase, DNA Ladder(Germany بارگذاری گردید.

در چاهک بعد ازLadder کنترل منفی و چاهک بعد از آن کنترل مثبت و سپس ما بقی نمونه‌ها بارگذاری شدند. ولتاژ روی۱۰۰ ولت تنظیم گردید و عمل الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت حدود ۱ ساعت انجام گرفت.

پس از خاتمه الکتروفورز، ژل به داخل دستگاه Trans illuminator منتقل و با تابش اشعه ماوراء بنفش باندها بر روی ژل ظاهرشدند. با مقایسه موقعیت قطعه تکثیرشده با اندازه باندهای مربوط به مارکر، اندازه محصول PCR تخمین زده شد.

نتایج

نتایج حاصل از آزمایش PCR به منظور تشخیص جنس *بروسلا*

با انجام آزمایش PCR بر روی۶۰ نمونه گاوی، تعداد ۲۰ نمونه (۳۳/۳۳ درصد) و برای ۵۰ نمونه گوسفندی، تعداد ۲۲ نمونه (۴۴ درصد) مثبت گردید. پرایمرهای B4 و B5 مورد استفاده در این آزمایش

قطعه‌ای با طول ۲۲۳ جفت باز را تکثیر دادند (شکل شماره ۱).

نتایج حاصل از آزمایش PCR به منظور تشخیص گونه‌های *آبورتوس* (بیووار ۱، ۲ و ٤) و *ملی تنسیس*

بعد از انجام آزمون PCR بر روی نمونه‌های شیر گاو و گوسفند به منظور شناسایی جنس *بروسلا*، تعداد ۲۰ نمونه از شیرهای گاوی و ۲۲ نمونه از شیرهای گوسفندی مثبت تشخیص داده شدند که در این مرحله آزمون PCR به منظور شناسایی گونه‌های *آبورتوس* و *ملی تنسیس* در مورد این نمونه‌ها انجام گرفت. پرایمرهای IS711 و B.a-SP در *بروسلا آبورتوس* قطعه‌ای به طول ۴۹۸ جفت باز و پرایمرهای IS711 و B.m-SP در *بروسلا ملی تنسیس* قطعه‌ای به طول ۷۳۱ جفت باز را تکثیر نمودند (شکل ۲)

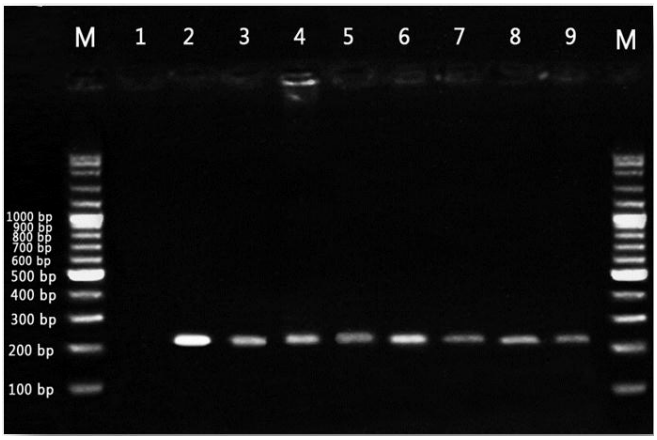
انجام آزمونPCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به گونه‌های *آبورتوس* و *ملی تنسیس* و مشاهده اندازه محصولات تکثیر یافته، *بروسلا آبورتوس* را در دو نمونه شیر گاوی و بروسلا ملی تنسیس را در یک نمونه شیر گوسفندی تائید نمود.

جدول ۱: توالی پرایمر های B4 و B5

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول	منبع
B4	5 – TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA – 3	223 bp	3
B5	5 – CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG – 3		

جدول ۲: توالی پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص گونه *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس*

گونه	نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول	منبع
B. abortus (bv. 1, 2 and 4)	Ba-SP	5 - GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC- 3	498 bp	5
	IS711SP	5 - TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT- 3		
B. melitensis	Bm-SP	5 - AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA - 3	731 bp	
	IS711SP	5 - TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT- 3		



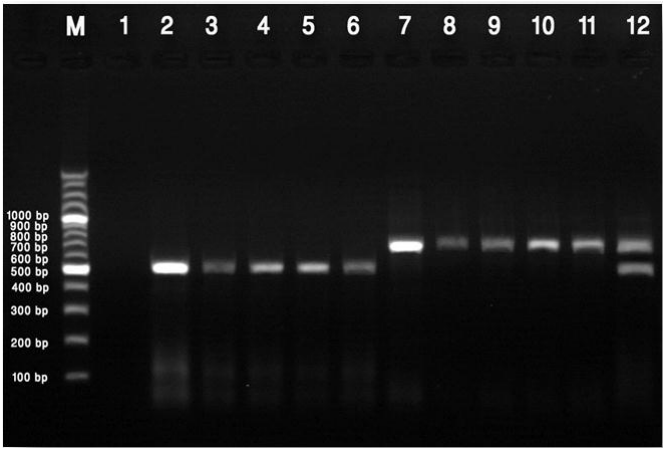
شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن bcsp31 نمونه‌های شیر گاو (چاهک‌های ۳-۵) و گوسفند (چاهک‌های ٦-۹)

چاهکM: مارکر 100 bp DNA ladder

چاهک شماره ۱: کنترل منفی (آب مقطر استریل)

چاهک شماره ۲: کنترل مثبت (واکسن RB51)

چاهک‌های شماره ۹-۳ نمونه‌های مثبت.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای IS711 و B.a-SP و B.m-SP

چاهک M: مارکر 100 bp DNA ladder

چاهک شماره ۱: کنترل منفی (آب مقطر استریل)

چاهک شماره ۲: کنترل مثبت *بروسلا آبورتوس* (واکسن RB51)

چاهک‌های ۶-۳: نمونه‌های مثبت *بروسلا آبورتوس*

چاهک شماره ۷: کنترل مثبت *بروسلا ملی تنسیس* (واکسن Rev. 1)

چاهک‌های ۱۱-۸ نمونه‌های مثبت بروسلا ملی تنسیس

چاهک شماره ۱۲: کنترل مثبت *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس*به صورت توام

بحث و نتیجه‌گیری

بروسلوز عمدتا بیماری حیوانات اهلی می‌باشد که بوسیله اعضای جنس *بروسلا* بوجود می‌آید.

اگر چه میزبان‌های اختصاصی هر یک از گونه‌های جنس *بروسلا* شناسائی گردیده است، اما اختصاصی بودن میزبان درگونه‌های مختلف قطعی نبوده و هر یک از میزبانان حساس ممکن است با گونه‌های غیراختصاصی نیز آلوده شوند. تشخیص آلودگی میزبان‌های مختلف با گونه غیراختصاصی با استفاده از روش‌های معمول مانند کشت و آزمایشات سرمی امری مشکل و زمان‌بر می‌باشد.

روش‌های تشخیص مولکولی مانند PCR و سنجش هیبریداسیون جایگزین نوید بخشی برای روش‌های معمول تشخیصی و شناسایی گونه‌های *بروسلا* می باشند (۶و۷).

Al-Mariri و Haj-Mahmoud (۲۰۱۰) برای تشخیص *بروسلا* در شیر گاوها، ۵۰ نمونه از شیر گاوهای آلوده و ۲۵ نمونه از شیر گاوهای عاری از باکتری *بروسلا* را اخذ کرده و استخراج DNA از نمونه‌های شیر را با سه روش مختلف انجام داده و آزمون PCR را (با استفاده از پرایمرهای B4 و B5) روی آنها انجام دادند. در تحقیق فوق حساسیت و اختصاصی بودن PCR با روش‌های مختلف استخراج DNA برای تشخیص *بروسلا* در شیر ۱۰۰٪ تعیین گردید (۱).

در مطالعه حاضر جهت استخراج DNA از کیت استخراج DNA ژنومی (Fermentas, Germany) استفاده شد که با توجه به بررسی انجام شده در این مطالعه مشخص شد که قادر به شناسایی $۱۰^{۲}$ *CFU* از باکتری *بروسلا* در هر میلی لیتر شیر بود.

شواهد نشان می‌دهند که در برخی از مناطق ایران آلودگی گاو با *بروسلا ملی تنسیس* و آلودگی گوسفند و بز با *بروسلا آبورتوس* اتفاق می‌افتد از این رو تشخیص و شناسائی گونه‌های *بروسلا* ضروری می‌باشد (۱۳)

ذوقی و همکاران (۲۰۰۸) *بروسلا آبورتوس* را از ۶۱۲ گاو و از ۶ گوسفند جداسازی نموده‌اند. درضمن تعداد ۱۷۱۷ مورد *بروسلا ملی تنسیس* را از بزها و گوسفندان و ۱۹۰ مورد *بروسلا ملی تنسیس* را از گاوها نیز جدا کرده‌اند (۱۸).

در تحقیق دوستی و قاسمی ده‌کردی (۲۰۱۱) از ۴۵۲ نمونه خون گاوی در آزمون‌های PCR و Real-time PCR برای افتراق گونه‌های *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس*، از ۱۲۷ نمونه سرم گاوی مثبت در PCR، ۹مورد به *بروسلا ملی تنسیس*، ۶۹ مورد به *بروسلا آبورتوس* و ۵ نمونه هزمان به *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* آلوده بودند (۴).

صفرپور ده‌کردی و همکاران (۲۰۱۲) از جنین‌های سقط شده میزبان‌های مختلف نمونه‌گیری کرده و آزمون PCR و Real-time PCR روی آنها انجام دادند و آلودگی جنین‌های گاوی را با *بروسلا ملی‌تنسیس* و جنین‌های گوسفندی را با *بروسلا آبورتوس* نشان دادند. همچنین در ۶۱۸ نمونه جنین شتر بررسی شده در PCR از ۲۰۱ مورد، آلودگی با *بروسلا ملی‌تنسیس* و *بروسلا آبورتوس* و نیز آلودگی همزمان با دو گونه یاد شده گزارش گردید (۱۶).

پیشوا و صالحی (۲۰۰۸) از گله‌هایی که گاو و گوسفند بصورت مختلط نگهداری می‌شدند و مدتی بعد از واکسیناسیون در گاوها سقط جنین اتفاق افتاد بود، توانستند از ۷۰ نمونه جنین سقط شده گاوی در ۵۰ نمونه باکتری *بروسلا* را از طریق آزمون PCR شناسایی کنند که از این ۵۰ نمونه ۲ نمونه واکسن *بروسلا ملی تنسیس* (Rev. 1) بود لذا به این نتیجه رسیدند که واکسیناسیون گوسفندها در گله‌هایی که با گاوها مخلوط هستند، می‌تواند به عنوان منبعی برای انتقال عفونت و سقط جنین در گاوها باشد (۱۵).

در مطالعات انجام شده در ایران تعداد موارد جدا شده بیووار ۳ *بروسلا آبورتوس* به مراتب بیشتر از سایر بیووارها بوده است (۱۷و۱۸)، پرایمرهایی که در مطالعه حاضر به منظور تشخیص گونه *بروسلا آبورتوس* استفاده شد فقط می‌تواند بیووارهای ۱، ۲ و ۴ *بروسلا آبورتوس* را شناسایی کند. با توجه به اینکه از ۲۰ نمونه شیر که به باکتری *بروسلا* آلوده بودند، در ۹ نمونه (۴۵ درصد) حضور بیووارهای ۱، ۲ و ۴ تشخیص داده شده است این نتایج تا حدودی با مطالعات انجام شده در سایر استان‌ها مغایرت دارد. این امر شاید به دلیل مجاورت استان کردستان با کشور عراق، ورود دام‌ها از عراق به استان کردستان و وارد شدن بیووارهای غیر بومی به این استان باشد. از طرف دیگر با توجه به اینکه واکسن RB51 جزو بیووار ۱ *بروسلا آبورتوس* است و تا مدتی بعد از واکسیناسیون گاوها، باکتری به داخل شیر ترشح می‌شود ممکن است که در شیر بعضی از گاوها واکسن RB51 وجود داشته باشد و این امر سبب افزایش تعداد موارد این بیووار غیرشایع شده باشد.

واکسن *بروسلا* پس از تزریق به دام‌ها ممکن است در شیر آنها ترشح شود. با توجه به حدت این واکسن‌ها برای انسان و اهمیت این موضوع، پیشنهاد می‌شود در دام‌های بومی ایران، احتمال ترشح این واکسن‌ها در شیر و نیز مدت زمانی‌که ممکن است این واکسن‌ها در شیر ترشح شوند، مطالعاتی در خصوص ترشح واکسن Rev.1 در شیر گوسفندان و بزها و ترشح واکسن RB51 در شیر گاوان انجام گیرد.

در مطالعه حاضر در شیر ۲ راس گاو، *بروسلا ملی تنسیس* و در شیر ۱ راس گوسفند، *بروسلا آبورتوس* شناسایی شد و در هیچکدام از نمونه‌های شیر حضور همزمان *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده نشد. با توجه به اینکه حساسیت

پرایمرهای استفاده شده برای تشخیص *بروسلا ملی تنسیس* پایین‌تر است و با توجه به اینکه بیووار شایع *بروسلا آبورتوس* در ایران بیووار ۳ است که توسط پرایمرهای مورد استفاده شناسایی نمی‌شود (۱۸)، بنابراین ممکن است در نمونه‌هایی که در مرحله شناسایی گونه هیچ باندی برای آنها مشاهده نشد، سایر بیووارهای *بروسلا آبورتوس* وجود داشته باشد و تعداد آن در گوسفندان بیشتر از ۲ مورد باشد.

همچنین با توجه به اینکه در دام‌های مبتلا به بروسلوز، ترشح باکتری *بروسلا* در شیر و نیز حضور آن در خون متناوب است، پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی به صورت همزمان نمونه شیر و خون از دام‌ها اخذ شود و آزمایشات کشت و PCR با استفاده از پرایمرهای بیووارهای مختلف گونه‌های *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* بر روی این نمونه‌ها به طور همزمان انجام گیرد.

منابع

1. Al-Mariri, A., Haj-Mahmoud, N. (2010). Detection of *Brucella abortus* in bovine milk by Polymerase chain reaction. *Acta Veterinaria Brno* **79**: 277-80.
2. Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S., Stoker, N.G. (1992). Detection of *Brucellamelitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **95**: 271-5.
3. Bricker, B.J., Halling, S.M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **32**: 2660-6.
4. Doosti, A., Ghasemidehkordi, P. (2011). Application of real-time PCR for identification and differentiation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in cattle. *Bulgarian journal of veterinary medicine* **14**:32-5.
5. Gupta, V.K., Deepak, K., Vermaa, P.K., Routa, S.V., Singha., A., Vihana, V.S. (2006). Polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Brucella melitensis* in goat milk. *Small Ruminant Research* **65**: 79-84.
6. Hamdy, M.E., Amin, A.S. (2002). Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Veterinary Journal* **163**: 299-305.
7. Herman, L., De Ridder, H. (1992). Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 2099-101.
8. Ibrahim, A.K., Abeer, A., Abdelall., Amin, A.S. (2012). Long-Term diagnostic studies for detection of *Brucella* spp. in milk samples. *Global Veterinaria* **1**: 8-12.
9. Moradi, G.,Esmaiel Nasab, N., Ghaderi, E., Sofi Majidpour, M., Salimzadeh, H. (2006). Brucellosis in Kurdistan province from 1997 to 2003. *Annals of Alquds Medicine* **2**: 32-7.
10. Morgan, W.J.B., Mackinon., D.J., Gill, K.P., Gower, S.G.M., Norris, P.I.W. (1978). *Brucellosis Diagnosis: Standard Laboratory Techniques*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 2nd Edition. Weybridge, Surrey, England: 40-82.
11. National Mastitis Council (1978). *Laboratory and field Handbook on Bovine Mastitis*. National Mastitis Council Inc., Arlington, VA.
12. Ocholi, R.A., Kwaga, J.K., Ajogi, I., Bale, J.O. (2004). Phenotypic characterization of *Brucella* strains isolated from livestock in Nigeria. *Veterinary Microbiology* **103**: 47-53.
13. Ocholi, R.A., Kwaga, J.K., Ajogi, I., Bale, J.O. (2005). Abortion due to *Brucella abortus* in sheep in Nigeria. *Revue Scientifique et Technique* **24**: 973-9.

14. O'Leary, S., Sheahan, M., Sweeney, T. (2006). *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Research in Veterinary Science* **81**: 170-6.
15. Pishva, E., Salehi, M. (2008). First report of isolation of *Brucella melitensis*, Vaccine strain Rev.1 as a source of cattle infection in Iran. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* **19**: 19-23.
16. Safarpoor Dehkordi, F., Saberian, S., Momtaz, H. (2012). Detection and segregation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in aborted bovine, ovine, caprine, buffaloes and camelid fetuses by application of conventional and real-time polymerase chain reaction. *Thailand Journal of Veterinary Medicine* **42**: 13-20.
17. Zowghi, E., Ebadi, A. (1988). Abortion due to *Brucella abortus* in sheep in Iran. *Revue Scientifique et Technique de L`office International des Epizooties* **7**: 379-82.
18. Zowghi, E., Ebadi, A., Yarahmadi, M. (2008). Isolation and identification of *Brucella* organisms in Iran. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases* **3**: 185-8.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 8, Issue 2, 2012

Diagnosis of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in the Milk of Cattle and Sheep in Kordestan Province by Polymerase Chain Reaction

Shafeie, B.[1], Ahmadi, M.[2*], Dastmalchi Saei, H.[2]

1- Graduated of Master Degree in bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
2- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received Date: 13 Nov 2012 *Accepted Date: 14 Mar 2013*

Abstract

Brucellosis is an important zoonotic disease in humans and animals. Brucellosis has been reported from most countries , but in some countries including Iran the disease is endemic. Consumption of milk and products of infected animals is a major transmission source of infection to humans. Since in most provinces of Iran such as Kurdestan province, cattle and sheep are kept close together, it is possible that animals are infected with non-specific Brucella species. The aim of this study was to use PCR in detection of Brucella species in milk, and also to detect the host specificity of Brucella abortus and Brucella melitensis in cattle and sheep. In this research, 60 milk samples from suspected cattle and 50 milk samples from suspected sheep in different villages of Kurdestan province were collected. DNA was extracted from all milk samples directly. In order to detect the Brucella spp. PCR was carried out using B4 and B5 primers on all extracted DNAs and in order to detect the B. abortus and B. melitensis, PCR was carried out with B. a, B. m and IS711 primers on all DNAs. Using PCR for detection of Brucella spp.20 and 22 of milk samples were positive in cattle and sheep samples respectively. Using PCR, out of the 20 cattle positive samples, 9 samples were identified as B. abortus (biovar 1, 2 and 4), and 2 samples were identified as B. melitensis. Also out of the 22 sheep positive samples, 15 samples were identified as B. melitensis and 1 as B. abortus (biovar 1, 2 and 4). Regarding the fact that in two milk samples of cattle, B. melitensis and in 1 milk sample of sheep, B. abortus were detected, the animals that were kept in close contact with each other may lose the host -specificity. Based on the results of this research, it is recommended that in order to detect Brucella spp. in milk samples. The vaccination status should be detected and using specific primers for detection of all biovars of Brucella abortus and Brucella melitensis, PCR and cultural methods should be carry out.

Keywords: *Sheep, Goat, Cattle, Brucella, Diagnosis, Milk*

**Corresponding author: Ahmadi, M.*
Address: Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Tel: 0441-2972649
Email: m.ahmadi@urmia.ac.ir