بررسی میزان آلودگی به بروسلوزیس در نمونه خون های افراد سرولوژی مثبت *بروسلا* در Real Time PCR شهرستان های شهرکرد و اصفهان به روش

حسین خدابنده[1]، نازیلا ارباب سلیمانی[2*] محمدرضا افشارزاده[3]

۱. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.

۳. . گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول: *nazilaarbab@yahoo.co.uk*

چکیده

بیماری بروسلوز جزء شایع ترین بیماری های باکتریایی مشترک انسان و دام است که در انسان ایجاد تب مالت نموده و خسارات اقتصادی بالایی را در حیوانات اهلی به بار می آورد. در این تحقیق با استفاده از روش PCR Real Time به بررسی فراوانی گونه های *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* در سرم افراد سرولوژی مثبت پرداختیم. نمونه های سرمی ۳۰ نفر از افرادی که تست رایت آن ها مثبت شده بود (بالای ۱/۱۶۰)، از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان های شهرکرد و اصفهان جمع آوری و DNA نمونه ها با استفاده از کیت استخراج DNA سیناژن استخراج شد. به منظور تشخیص جنس و گونه های *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* واکنش Real Time PCR بر روی نمونه ها انجام شد.در این بررسی تمام ۳۰ نمونه مورد بررسی با روش Real time PCR تأیید شدند. در شهر های اصفهان و شهرکرد در تمامی موارد *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شد. در جنس مونث پس از انجام آزمون Real Time PCR فقط باکتری *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شد در حالی که در جنس مذکر ۲۲ مورد (۷۳/۳۳درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۳ مورد (۱۰درصد) *بروسلا ملی تنسیس* شناسایی گردید. از ۷ مورد آلودگی به بروسلوز در گروه سنی زیر ۳۰ سال، ۶ مورد (۸۵/۷درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۱ مورد (۱۴/۳درصد) *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شدند. در صورتی که از ۲۳ مورد آلودگی به بروسلوز در گروه سنی بالای ۳۰ سال، ۲۱ مورد (۹۱/۳درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۲ مورد (۸/۷درصد) *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شدند. در سال های اخیر روش های مولکولی زیادی برای تشخیص این باکتری مورد استفاده قرار گرفته اند. روش Real Time PCR از این نظر که نیازمند صرف زمان کم و دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی می باشد، در تشخیص این بیماری بسیار مفید می باشد.

واژه های کلیدی: *بروسلا آبورتوس*، *بروسلا ملی تنسیس*، سرولوژی، Real Time PCR

مقدمه

بروسلوز یکی از پنج بیماری مشترک بین انسان و دام است که در اثر آلودگی با باکتری های جنس *بروسلا* به وجود می آید(۱). بعضی از انواع *بروسلا* مثل *بروسلا آبورتوس*، *بروسلا ملی تنسیس* و *بروسلا سوئیس* دارای میزبان های ویژه می‌باشند، *بروسلا*ها باکتری های

کوکوباسیل گرم منفی، کوچک، باریک و کوتاهی هستند، که گاهی به شکل باسیل و یا کوکسی نیز مشاهده می‌شوند طول متغیری حدود ۱/۵-۰/۶ میکرومتر و عرض ۰/۷-۰/۵ دارد. غیر متحرک بوده و اسپور تولید نمی کند. از منابع طبیعی شکل L-Form باکتری نیز جداسازی شده است. مقاومت در برابر رنگ بری بوسیله محلول های رقیق اسیدی و قلیای امکان به کارگیری رنگ آمیزی های متفاوت و غیر اختصاصی را در بافت های آلوده، از قبیل زیل نیلسون اصلاح شده، ماشیاولو و روش کوستر فراهم کرده است (۲،۳).

بروسلوز در تمام مناطق دنیا وجود دارد و از مشکلات بهداشتی در بسیاری از کشورها محسوب می گردد. به طور تقریبی *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* مسئول تمامی موارد بروسلوز در انسان و دام کشور ما هستند. در ایران بروسلوز یک بیماری اندمیک در تمام قسمت های کشور می باشد (۴). علائم بالینی بروسلوز بسیار غیر اختصاصی است. این بیماری به اشکال مختلف نمایان می گردد. علائم این بیماری شامل: تب، تعریق، لرز، سردرد، درد عضلانی، خستگی، بی اشتهائی، درد مفاصل، کمر درد، کاهش وزن، یبوست، درد گلو، سرفه خشک، علائم شبیه سرماخوردگی، التهاب مفاصل، بزرگ شدن غدد لنفاوی، افسردگی (درگیری عصبی مرکزی)، درگیری قرنیه چشم و ضایعات پوستی، کاهش وزن، درد شکم، اختلال خواب، بزرگ شدن کبد و طحال، رنگ پریدگی و درد ستون فقرات می‌باشد. البته گاهی بیماری بروسلوز مزمن می شود که در این حالت علائم خفیف تر ولی مداوم و یا مکرر شده و این افراد مثلاً با تب مکرر ولی خفیف، درد مفاصل و یا خستگی مراجعه می‌کنند. گاهی نیز در عفونت های شدید، دستگاه عصبی مرکزی و یا گاهی لایه داخلی قلب گرفتار می‌شود که در این موارد، بیماری عوارض خطرناکی می تواند داشته باشد(۵). سالانه ۵۰۰ هزار مورد جدید درگیری با بروسلوز در جهان گزارش می-شود که طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت این تعداد در برابر شیوع واقعی آن ناچیز می‌باشد، زیرا این بیماری علائم بالینی متفاوتی دارد. تنوع، غیراختصاصی و غیر تیپیک بودن علائم بالینی بروسلوز ضرورت تشخیص بر اساس یافته های آزمایشگاهی را روشن می‌سازد(۶). به طور کلی پیشگیری، کنترل و ریشه کنی بروسلوز نیازمند شناخت سریع و صحیح فراوانی و توزیع مکانی و زمانی آن است. کشت های باکتریولوژیکی و آزمایش های سرولوژیکی متکی بر آگلوتیناسیون شایع ترین آزمون‌های مورد استفاده در تشخیص عفونت های انسانی و حیوانی بروسلوز هستند(۷). در سال های اخیر روش های مولکولی زیادی برای تشخیص این باکتری مورد استفاده قرار گرفته‌اند. روش Real Time PCR از این نظر که نیازمند صرف زمان کم و دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی می‌باشد، در تشخیص این بیماری بسیار مفید می‌باشد(۸).

این روش تلفیقی از تکنیک PCR و تکنیک کاربرد پروب های فلورسنس است که هر دو در یک واکنش جمع گردیده اند به طور کلی در این روش نوین واکنش PCR و شناسایی قطعه تکثیر یافته در یک ساعت یا کمتر انجام می‌شود که این امر باعث افزایش سرعت و صرفه جویی در زمان نسبت به سیستم های رایج PCR گردیده است. مزیت دیگر این تکنیک نسبت به PCR این است که مراحل Post PCR که شامل ژل الکتروفورز، رنگ آمیزی با ماده سرطان زای اتیدیوم بروماید و تفسیر ژل با نور ماورای بنفش می باشد، حذف گردیده و آلودگی محیط آزمایشگاه به اتیدیوم بروماید و قطعات DNA تکثیر یافته به روش PCR نیز به حداقل می‌رسد. کار با تجهیزات و دستگاه های به کار گرفته شده در Real Time PCR به طور قابل ملاحظه ای نسبت به PCR ساده تر بوده و مجموعه مزایایی

نظیر ترکیب حساسیت و ویژگی بالا، خطر آلودگی پایین، ساده بودن کارکرد و سرعت بالا، باعث شده است تا فناوری Real Time PCR جذاب‌تر از روش‌های رایج بر پایه کشت یا تست های ایمونولوژیکی در آزمایشگاه میکروبیولوژی بالینی برای تشخیص عوامل عفونی گردد(۹).

با توجه به قرار گرفتن ایران در منطقه شایع بروسلوز و هم چنین عوارض و خطرات بالقوه بروسلوز و هزینه‌هایی که بر اقتصاد تحمیل می‌کند، اهمیت لزوم تحقیق در مورد میزان شیوع واقعی و هم چنین استفاده از بهترین، دقیق‌ترین و به صرفه‌ترین روش برای تشخیص این شیوع لازم به نظر می‌رسد. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی روش Real Time PCR برای تشخیص بروسلوزیس در نمونه سرم های مثبت *بروسلا* به عنوان ابزار تشخیصی کارآمد در تشخیص افراد آلوده حقیقی و بررسی گونه های درگیر کننده *بروسلا* در این افراد است.

مواد و روش کار

نمونه گیری

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، نمونه های سرمی مربوط به ۳۰ نفر از افرادی که تست رایت آن ها مثبت شده بود، از آزمایشگاه های تشخیص طبی شهرستان های شهرکرد و اصفهان جمع آوری و در مجاورت یخ به مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردیدند.

استخراج DNA

به منظور تشخیص مولکولی، استخراج DNA با استفاده کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن) مطابق روش کار کیت انجام شد. برای ارزیابی کیفی DNA استخراج شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شده و مقدار ۵µl از آن را بر روی ژل آگارز ۱درصد ران می‌کنیم. ژل را درون تانک الکتروفورز گذاشته و از هر نمونه DNA تخلیص شده به میزان ۵ µl با رنگ برموفنل بلو (Loading Buffer) مخلوط کرده و توسط سمپلر درون چاهک‌ها ریخته شد. در یکی از چاهک‌ها مارکر ریخته شد و پس از نیم ساعت ران شدن با ولتاژ ۸۰، ژل را برداشته و با رنگ DNA Self Saine رنگ آمیزی می‌کنیم. برای رنگ‌آمیزی، ابتدا درون یک ظرف مقداری آب دیونیزه ریخته شد و شیشه‌ها به آرامی از روی ژل برداشته شد (نباید ژل پاره شود). سپس ژل را درون ظرف آب قرار داده و ۱۵ میکرولیتر رنگ مورد نظر به آن اضافه گردید و پس از حدود ۱۵ دقیقه توسط دستگاه ژل داک (UV) از ژل فوق عکس گرفته شد و کیفیت DNA استخراج شده را ارزیابی می‌کنیم. به منظور کمیت سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه گیری میزان DNA در نمونه در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید.

واکنش Taq-Man Real Time PCR

به منظور انجام واکنش Taq-Man Real Time PCR پرایمر مورد استفاده برای تشخیص جنس *بروسلا* و گونه های *آبورتوس* و *ملی تنسیس* و هم چنین توالی پروب مورد استفاده جهت سنتز به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شدند. پرایمرهای مخصوص و پروب TaqMan مطابق دستورالعمل کارخانه رقیق سازی گردید. توالی پرایمرهای و پروب‌های مورد استفاده در این تحقیق در جدول (۱) نشان داده شده است (۱۰). جهت رقیق سازی پروب مطابق دستورالعمل شرکت سازنده در تاریکی و تحت شرایط استریل ۱۰۰۰میکرولیتر آب Nuclease free بدون عمل پیپتینگ به ویال حاوی پروب افزوده و به مدت نیم ساعت در دمای اتاق قرار دادیم. سپس ۵۰ میکرولیتر از پروب را برداشتیم و با ۲۰۰ میکرولیتر آب Nuclease free مخلوط نمودیم. واکنش Real Time PCR جهت

تشخیص جنس *بروسلا* و گونه های *آبورتوس* و *ملی تنسیس* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۱۲/۵ میکرولیتر TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)، ۰/۶۲۵ پرایمر F، ۰/۶۲۵ پرایمرهای R، ۰/۳ میکرولیتر پروب، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۸/۴۳ میکرولیتر آب مقطر، به صورت جداگانه برای هر ژن صورت گرفت. در نهایت نمونه‌ها در دستگاه Light Cycler مخصوص Real Time PCR قرار داده شده اند. برنامه زمانی- گرمایی با استفاده از نرم افزار Rotor-Gene 6000 در ۹۵ درجه سانتی گراد ۱۰ دقیقه (Hot Start)، سپس ۴۵ چرخه دمایی به ترتیب ۹۵ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه دقیقه تنظیم گردید . علاوه بر ۴۵ سیکل تکثیر، یک سیکل نیز در دامنه دمایی ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد جهت رسم منحنی ذوب، به وسیله قرائت رنگ فلورسانس TaqMan probe برای دستگاه تعریف شد.

جدول ۱- توالی آغازگرها و پروب‌ها

توالی هدف	توالی پرایمر (′۳→′۵)	توالی پروب (′۳→′۵)
IS711	GCTTGAAGCTTGCGGACAGT GGCCTACCGCTGCGAAT	FAM-AAGCCAACACCCGGCCATTATGGT-TAMRA
BMEII0466	TCGCATCGGCAGTTTCAA/ CCAGCTTTTGGCCTTTTCC	Cy5-CCTCGGCATGGCCCGCAA-BHQ-2
BruAb2_0168	GCACACTCACCTTCCACAACA A/ CCCCGTTCTGCACCAGACT	FAM-TGGAACGACCTTTGCAGGCGAGATC-BHQ-1

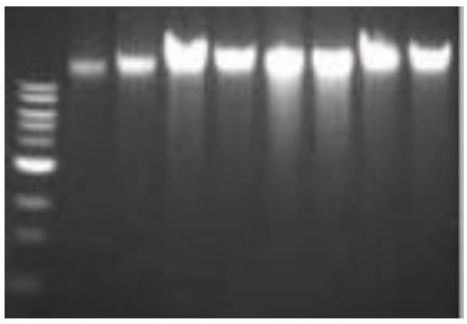
آنالیز آماری

در نهایت ارتباط آماری (جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها) حاصل از نتایج به دست آمده مورد بررسی آماری قرار گرفت. در نتیجه به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آمار استنباطی (آزمون های دقیق فیشر و مربع کای) با استفاده از نرم افزار SPSS20 استفاده گردید و ارتباط آماری حاصل از نتایج به دست آمده مورد بررسی آماری قرار گرفت و در این بررسی $P < 0.05$ به‌عنوان معنی دار، معرفی شد.

نتایج

نتایج کیفی مربوط به استخراج DNA

استخراج DNA طبق روش شرکت سازنده کیت انجام شد و در شکل ۱ نتایج استخراج DNA نشان داده شده است. شماره‌های ۱ تا ۵ همگی نشان دهنده غلظت بالای DNA است.

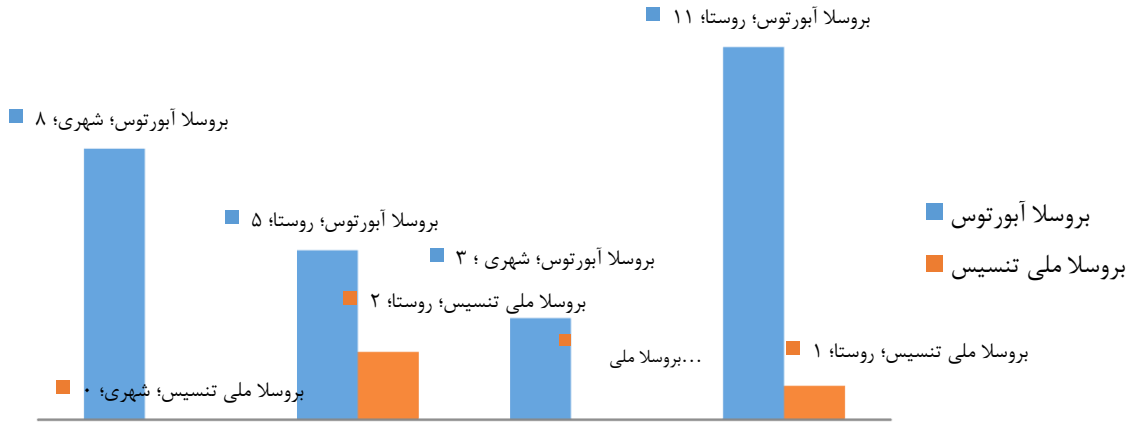


شکل ۱- تصویر الکتروفورDNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد

در این بررسی تعداد ۳۰ نمونه سرم مثبت به منظور ردیابی ژنوم باکتری *بروسلا*، مورد بررسی قرار گرفتند (نمودار ۱). که ۱۵ مورد (۵۰ درصد) مربوط به شهرستان اصفهان و ۱۵ مورد (۵۰درصد) مربوط به شهرستان شهرکرد بودند. از ۱۵ نمونه مورد بررسی در شهرستان اصفهان، ۸ مورد در شهرها (۵۳/۳درصد) و ۷ مورد (۴۶/۷درصد) در روستاها اقامت داشتند (جدول ۲). بیش‌ترین میزان ابتلا در شهر اصفهان مربوط به ساکنین شهرها (۵۳/۳درصد) می باشد در حالی که ۷ مورد از روستاییان اصفهان (۴۶/۷درصد) به بروسلوز مبتلا بودند. از ۸ مورد آلودگی به *بروسلا* در شهرستان اصفهان ۸ مورد (۱۰۰درصد) *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شدند و *بروسلا ملی تنسیس* در هیچ نمونه ایی یافت نشد. در صورتی که از ۷ نمونه آلوده به *بروسلا* در روستاهای اصفهان ۵ نمونه (۷۱/۴۳درصد) *بروسلا* فراوانی را در مناطق روستایی شهرکرد دارد(نمودار ۱).

آبورتوس و ۲ نمونه (۲۸/۵۷درصد) *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شدند.

از ۱۵ نمونه مورد بررسی در شهرستان شهرکرد ۱۱ مورد در شهرها (۷۳/۳درصد) و ۴ مورد (۲۶/۷درصد) در روستاها اقامت داشتند. بیشترین میزان ابتلا در شهرستان شهرکرد، مربوط به ساکنین شهرها می‌باشد. از ۱۱ مورد آلودگی به *بروسلا* در شهرستان شهرکرد، ۱۱ مورد (۱۰۰درصد) *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شدند و *بروسلا ملی تنسیس* در هیچ نمونه ای یافت نشد. در صورتی که از ۴ نمونه آلوده به *بروسلا* در روستاهای شهرکرد، ۳ نمونه (۷۵درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۱ نمونه (۲۵درصد) *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شدند. که نشان می‌دهد که *بروسلا آبورتوس* بیش‌ترین فراوانی را در مناطق روستایی شهرکرد دارد(نمودار ۱).

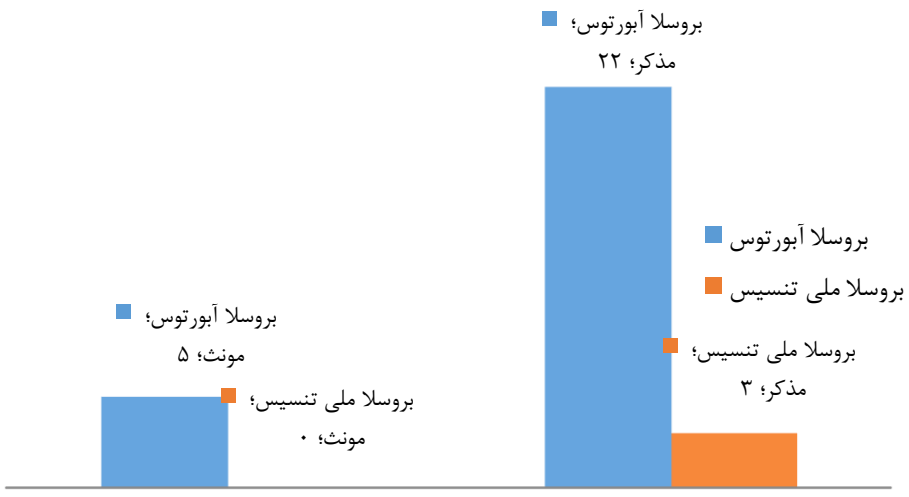


نمودار ۱- فراوانی *بروسلا آبورتوس و ملی تنسیس* در شهرستان های اصفهان و شهرکرد

جدول ۲- مقایسه میزان فراوانی باکتری‌ها در شهرها و روستاهای اصفهان و شهرکرد

شهر و محل سکونت	اصفهان (۱۵)				شهرکرد (۱۵)				p-value
	شهر (۸) ۵۳/۷ درصد		روستا (۷) ۴۶/۷ درصد		شهر (۱۱) ۷۳/۳ درصد		روستا (۴) ۲۶/۷ درصد		
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
جنس *بروسلا*	۸	۱۰۰	۷	۱۰۰	۱۱	۱۰۰	۴	۱۰۰	۰/۲۵۱
بروسلا آبورتوس	۸	۱۰۰	۵	۷۱/۴۳	۱۱	۱۰۰	۳	۷۵	
بروسلا ملی تنسیس	۰	۰	۲	۲۸,۵۷	۰	۰	۱	۲۵	

در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین منطقه (شهر و روستا) و آلودگی *بروسلا* ارتباط معنی داری مشاهده نگردید (p-value>0/05). از ۳۰ نمونه مورد بررسی ۲۵ مورد (۸۳/۳درصد) مربوط به جنس مذکر و ۵ مورد (۱۶/۷درصد) مربوط به جنس مونث بودند. که در جنس مونث پس از انجام آزمون Real Time PCR فقط باکتری *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شد در حالی که در جنس مذکر ۲۲ مورد (۷۳/۳۳درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۳ مورد (۱۰درصد) *بروسلا ملی تنسیس* شناسایی گردید (جدول ۳).

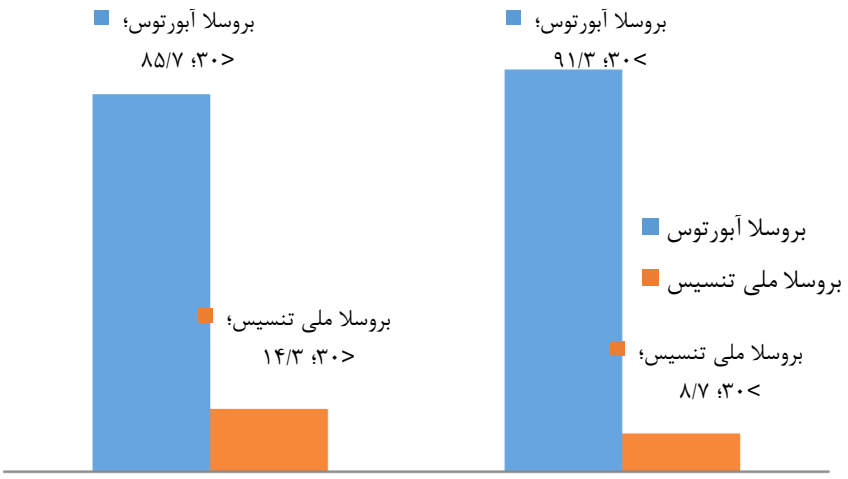


نمودار ۲- فراوانی *بروسلا آبورتوس و ملی تنسیس* در دو جنس مذکر و مونث

جدول ۳- مقایسه میزان فراوانی باکتری‌ها در جنس مونث و مذکر

جنسیت	مونث (۵)		مذکر (۲۵)		p-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
جنس *بروسلا*	۵	۱۰۰	۲۵	۱۰۰	۱/۰۰
بروسلا آبورتوس	۵	۱۰۰	۲۲	۸۸	
بروسلا ملی تنسیس	۰	۰	۳	۱۲	

در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین جنسیت و آلودگی به *بروسلا* ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید (P-Value=1/00>0/05). از نظر گروه های سنی، افراد مورد مطالعه به دو گروه زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال طبقه بندی شدند. ۷ مورد (۲۳/۳۳درصد) مربوط به افراد زیر ۳۰ سال و ۲۳ مورد (۷۶/۶۷درصد) مربوط به افراد بالای ۳۰ سال می باشد (نمودار ۴). از ۷ مورد آلودگی به بروسلوز در گروه سنی زیر ۳۰ سال، ۶ مورد (۸۵/۷درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۱ مورد (۱۴/۳درصد) *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شدند. در صورتی که از ۲۳ مورد آلودگی به بروسلوز در گروه سنی بالای ۳۰ سال، ۲۱ مورد (۹۱/۳درصد) *بروسلا آبورتوس* و ۲ مورد (۸/۷درصد) *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شدند (جدول ۵).



نمودار۴- درصد آلودگی به در گروه های سنی زیر ۳۰ و بالای ۳۰ سال

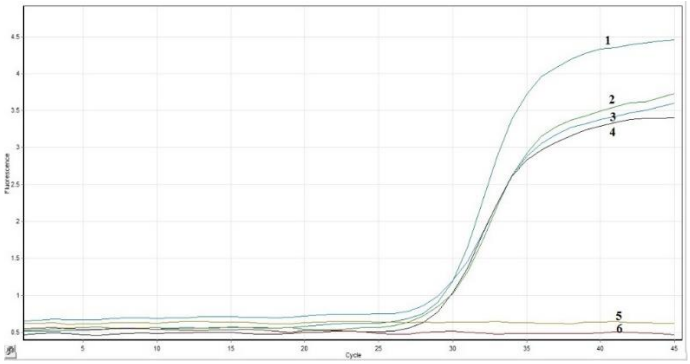
جدول ۵- مقایسه میزان فراوانی باکتری‌ها در گروه های سنی زیر ۳۰ و بالای ۳۰ سال

سن	<۳۰ (۷)		>۳۰ (۲۳)		p-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
جنس *بروسلا*	۷	۱۰۰	۲۳	۱۰۰	
بروسلا آبورتوس	۶	۸۵/۷	۲۱	۹۱/۳	۱/۰۰
بروسلا ملی تنسیس	۱	۱۴/۳	۲	۸/۷	

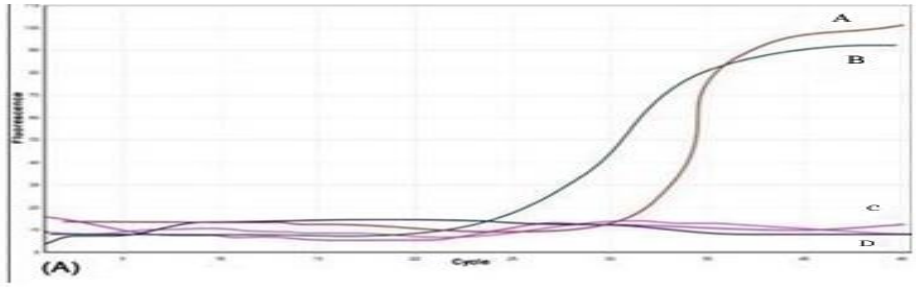
در تجزیه و تحلیل آماری با آزمون دقیق فیشر بین گروه سنی و آلودگی به *بروسلا* ارتباط آماری معنی داری مشاهده نگردید (P-value=1/00>0/05).

نتایج Real Time PCR

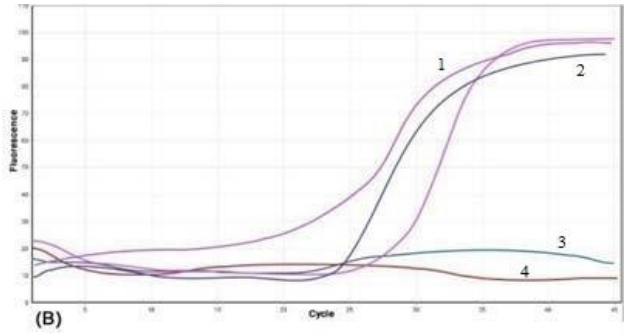
در مرحله اول ابتدا از طریق روش Real Time PCR به تشخیص *بروسلا* پرداخته شد. در مرحله بعدی بر اساس آنالیز منحنی ذوب ایجاد شده از واکنش Real Time PCR می‌توان به تشخیص گونه‌های *بروسلا ملی تنسیس* و *بروسلا آبورتوس* پی برد. در شکل های ۱، ۲ و ۳ مراحل پروفایل حرارتی برای جنس *بروسلا* و گونه های *بروسلا* در دستگاه Real Time PCR نشان داده شده است. CT کم تر از ۴۰ مثبت در نظر گرفته شد.



شکل۲- آنالیز منحنی ذوب برای جنس *بروسلا*: خط ۱: کنترل مثبت. خطوط ۲، ۳ و ۴: نمونه‌های مثبت جنس *بروسلا*. خط ۵: کنترل منفی. خط ۶: نمونه منفی برای واکنش است.



شکل۳- آنالیزمنحنی ذوب برای گونه *بروسلاآبورتوس*. خط A: کنترل مثبت.خط B: نمونه مثبت. خط C: کنترل منفی.خط D: نمونه منفی برای واکنش است.



شکل۴- آنالیزمنحنی ذوب برای گونه *بروسلاملی تنسیس*. خط ۱: کنترل مثبت.خط ۲: نمونه مثبت. خط۳: کنترل منفی. خط۴: نمونه منفی برای واکنش است.

بحث

طبق آخرین گزارش های وزارت بهداشت و کتاب راهنمای کشوری مبارزه با بروسلوز (تب مالت) پراکندگی بیماری در ایران در استان چهار محال و بختیاری نسبت به استان اصفهان بیشتر است که بر این اساس استان چهار محال و بختیاری جز استان های با آلودگی متوسط (میزان بروز ۲۰-۱۱ درصد) است و استان اصفهان جز استان های با آلودگی پایین (میزان بروز ۱۰-۰ درصد) است. در تحقیق ما آلودگی به *بروسلا* در ساکنین شهرها نسبت به روستاها بیشتر می‌باشد که می تواند به علت عواملی از قبیل توزیع لبنیات غیر پاستوریزه (خامه و پنیر محلی) و ارتباط تنگاتنگ ساکنین شهرها با روستاها باشد. بیماری در تمامی سنین وجود دارد ولی وفور آن در سن ۳۰-۲۰ سالگی است، یعنی نیروی فعال و کارآمد کشور در معرض خطر این بیماری هستند. در مطالعه حاضر بیماری بروسلوز در گروه سنی بالای ۳۰ سال شیوع بیشتری دارد در حالی که در تحقیق انجام شده توسط زینلی و همکاران بیشترین گروه سنی مبتلایان ۳۰-۲۰ سال و در تحقیق قاسمی و همکاران بیشترین گروه سنی مبتلایان ۱۹-۱۵ برآورد گردید (۱۱،۱۲). با توجه به شیوع بالاتر بیماری بروسلوز در گروه سنی بالای ۳۰ سال در تحقیق ما می‌توان نتیجه گیری کرد که آگاهی این گروه نسبت به راه های انتقال بیماری به اندازه کافی نیست و جا دارد که با آموزش بیشتر و تأکید بر راه های انتقال بیماری میزان آگاهی را نسبت به این بیماری بالا برد. بیماری در هر دو جنس دیده می‌شود تحقیقات متعدد انجام شده حاکی از آن است که میزان آلودگی به بروسلوز در جنسیت مرد نسبت به جنسیت زن بیشتر می باشد که در تحقیق ما نیز چنین نتیجه ای به دست آمد. بیماری را انحصاراً نمی‌توان یک بیماری شغلی محسوب نمود ولی شغل به عنوان یک عامل خطر در ابتلا به بیماری مطرح است به خصوص نزد خانم های خانه دار (خانم های خانه دار عمدتاً به عنوان دامدار و کشاورز دوشادوش همسرانشان در مناطق روستایی به فعالیت می‌پردازند)، دامداران، کشاورزان. بیماری در

تمام فصول وجود دارد ولی در فصل بهار و تابستان هم زمان با فصل زایش و شیردهی دام ها بیش تر دیده می‌شود.در تحقیق حاضر تمامی نمونه های سرم مثبت در آزمون Real Time PCR مثبت تشخیص داده شدند که یکی از دلایل اختلاف با تحقیق دل بیشه می-تواند متفاوت بودن تیتر واکنش رایت لوله ای باشد. در تحقیق دیگری که توسط سهرابی و همکاران درسال ۲۰۱۱ بر روی ۵۰ نمونه (۲۵ نمونه سرم مثبت و ۲۵ نمونه سرم منفی) و ۷۵ نمونه از دام ذبح شده با تب مالت را به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار دادند. سرم های منفی آلودگی به *بروسلا* تشخیص داده نشد ولی آلودگی *بروسلا* در ۴۶ مورد از ۷۵ نمونه حیوانات ذبح شده و هم چنین نمونه های سرم مثبت را مورد تأیید قرار داد(۸). در مطالعه ای که توسط زهرایی صالحی و همکاران در سال ۱۳۹۲ برای طراحی و بهینه سازی روش Real Time PCR جهت تشخیص باکتری *بروسلا آبورتوس* بر روی سویه استاندارد و واکسن *بروسلا آبورتوس، ملی تنسیس، سوئیس، نئوتومه* و ۱۵ ایزوله *بروسلا آبورتوس* جداشده از شیر گاو انجام شد، قطعه ۲۱۵ نوکلئوتیدی بر اساس منحنی ذوب حاصله در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد یک الگوی صعودی کاملا اختصاصی را نشان داد. نتایج مشخص کرد که با استفاده از این روش می توان باکتری *بروسلا* گونه *آبورتوس* به صورت اختصاصی از سایر گونه ها تمایز داد(۱۳). در بررسی انجام شده توسط محمدزاده و همکاران درسال ۱۳۹۰ که بر روی ۶۴ نمونه سرم از افرادی که از نظر آزمایش رایت لوله ای عیار تیتر برابر و بالای ۱۶۰ داشتند، جهت گونه *بروسلا ملی تنسیس* به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق از ۶۴ نمونه مورد بررسی در ۴۳ نمونه ۷۱/۸۷ درصد *بروسلا ملی تنسیس* گزارش گردید (۱۴). در صورتی که در تحقیق ما *بروسلا آبورتوس* از فراوانی بالاتری برخوردار می باشد. در تحقیق انجام شده توسط دل بیشه و همکاران که درسال ۱۳۹۱ که بر روی ۴۵ نمونه ی مثبت خون گوسفند از نظر تست های سرولوژیکی در چندین شهرستان استان مازندران صورت گرفت، تنها ۲۰ نمونه از نظر حضور باکتری های جنس *بروسلا* با استفاده از روش Real Time PCR TaqMan مثبت تشخیص داده شدند(۱۵). Newby و همکاران در سال ۲۰۰۳ تشخیص *بروسلا آبورتوس* به روش Real Time PCR انجام گرفت که مقایسه ای را بین سه تکنیک SYBR Green، ۱ و ۵ اگزونوکلئازی و پروب های هیبرید شونده انجام دادند. در این سه روش از همان پرایمر تقویت شده برای تولید یک قطعه ی یکسان استفاده شده است این قطعه محدوده های یک منطقه از ژنوم *بروسلا آبورتوس* که شامل بخش هایی از ژن *Alk B* و عنصر IS711 الحاق شده است هر سه روش دارای حساسیت قابل ملاحظه ای بوده است با این حال بیش‌ترین ویژگی را با استفاده از روش پروب هیبریداسیون به‌دست آوردند(۱۶). در مطالعه انجام شده توسط Jolie و همکاران درسال ۲۰۰۷ تعیین سریع جدایه های در مرحله تشخیص گونه با روش Multiplex- PCR بر پایه SNP صورت گرفت که در آن سه ژن *omp25*، *glk* و *trpE* هدف بودند (۱۷). در ایران توسط مالک نژاد و همکاران در سال ۱۳۸۷ برای تعیین گونه های *بروسلا* در مناطق مرکزی کشور با تکنیک PCR-RLFP روی ژن های *Omp2b* و *Omp2a* پروتئین های غشای خارجی مطالعه شد که اختلاف بین انواع *بروسلا*های بیماری زا و برخی بیوتایپ های آن را مشخص کرد(۱۸). در سال ۲۰۰۹ Hinic و همکاران روش Real Time PCR مبتنی بر پایه ی IS711 به توصیف ارزیابی روش بر پایه سکوئنس درج شده روی *بروسلا آبورتوس* با نمونه های خون ۱۹۹ گراز نر و نمونه ی بافت ۵۳ گراز نر وحشی جمع آوری شده

از *سوئیس* پرداختند *بروسلا* در ۱۱/۱ درصد از نمونه ی خون ۱۹۹ نر وحشی با روش IS711 Real Time PCR که تست سرولوژی آن ها منفی بود تشخیص داده شد(۱۹). در سال ۲۰۱۰ توسط Bertu و همکاران روی نمونه های شیر از گله های فاقد واکسیناسیون و گاوهای بدون علایم آبسه ی غده ی پستانی مطالعه شد. در این بررسی آنتی بادی های ضد *بروسلا*به عنوان ملاک تشخیصی به کار گرفته شد(۲۰). در بررسی انجام شده توسط محمدزاده و همکاران درسال ۱۳۹۰که بر روی ۶۴ نمونه سرم از افرادی که از نظر آزمایش رایت لوله ای عیار تیتر برابر و بالای۱۶۰ داشتند، جهت گونه *بروسلا ملی تنسیس* به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق از ۶۴ نمونه مورد بررسی در ۴۳ نمونه ۷۱/۸۷ درصد *بروسلا ملی تنسیس* گزارش گردید (۱۴). در تحقیق انجام شده توسط سهرابی و همکاران در سال ۲۰۱۱ که بر روی ۵۰ نمونه (۲۵ سرم مثبت و ۲۵ سرم منفی) و ۷۵ نمونه از دام ذبح شده با تب مالت را به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار دادند. سرم های منفی آلودگی به *بروسلا* تشخیص داده نشد ولی آلودگی *بروسلا* در ۴۶ مورد از ۷۵ نمونه حیوانات ذبح شده مورد تأیید قرار گرفت (۸). در مطالعه ای که توسط زهرایی صالحی و همکاران در سال ۱۳۹۲ برای طراحی و بهینه سازی روش Real Time PCR جهت تشخیص باکتری *بروسلا آبورتوس* بر روی سویه استاندارد و واکسن *بروسلا آبورتوس*، *ملی تنسیس*، *سوئیس*، *نئوتومه* و ۱۵ ایزوله *بروسلا آبورتوس* جداشده از شیر گاو انجام شد، قطعه ۲۱۵ نوکلئوتیدی بر اساس منحنی ذوب حاصله در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد یک الگوی صعودی کاملاً اختصاصی را نشان داد. نتایج مشخص کرد که با استفاده از این روش می توان باکتری *بروسلا* گونه *آبورتوس* به صورت اختصاصی از سایر گونه ها تمایز داد (۱۳).

نتیجه گیری کلی

با توجه به محدودیت های کشت های باکتریولوژیکی و آزمایش های سرولوژیک و فقدان حساسیت لازم چنین تست هایی در بیمارانی که به بروسلوز مزمن مبتلا هستند، از طرف دیگر وجود واکنش متقاطع با دیگر باکتری های گرم منفی که منجر به نتایج مثبت کاذب می گردد، به منظور تسهیل در این مشکلات و با وجود درجه ی بالایی از شباهت ژنتیکی بین گونه های *بروسلا* روش های مولکولی از قبیل PCR و Real time PCR که آسان تر، سریع تر، امن تر، راحت تر و دقیق تر از روش های سنتی هستند مناسب به نظر می رسند.

منابع

1. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. (2007). Human brucellosis. Lancet infect dis. 7(12): 775-786.

۲. جاوتز ا، ملنیک ج، آدلبرگ ا. (۱۳۷۸)، *هموفیلوس*، *بوردتلا*، *بروسلا*، میکروبیولوژی جاوتز، نوروزی ج، چاپ اول، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی حیان، تهران، ۳۰۰-۳۰۳.

3. Ko J, Splitter GA. (2003). Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans.Clin Microbiol Rev. 16(1): 65-78.

4. Pakzad I, Rezaee A, Emaneini M, Hosseini AZ, Tabbaraee B, Taherikalani M. (2009). Expression of Human Serum Albumin - L 7/L 12 (*Brucella abortus* Ribosomal Protein) Fusion Protein in Saccharomyces cerevisiae. Pol J Microbiol. 58(2): 99-104.

5. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Grave MH. (2003). Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella spp*, *B. abortus*, and *B.*

melitensiss. J Cn Microbiol. 42(3): 1290-1293.

۶. ناصری ز، یوسف علیخانی م، هاشمی ح، عربستانی م. (۱۳۹۳). تعیین گونه های *بروسلا* ایزوله شده از نمونه های خون بیماران مشکوک به بروسلوزیس با روش PCR.مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک. ۱۷(۵): ۵۲-۵۹.

۷. جعفرپور م، کترا ابراهیمی ن، ناظمی ع، آسمار م، خاتمی نژاد م. (۱۳۸۹). مقایسه آزمایش های سرولوژیک (رزبنگال، رایت لوله های و کومبس رایت) و مولکولی (PCR) در تشخیص بروسلوز گوسفند و بز. پاتوبیولوژی مقایسه ای، علمی پژوهشی. ۷(۴):۳۳۷-۳۴۲.

8. Sohrabi M, Mohabati Mobarez A, Behmanesh M, Khoramabadi N, Hosseini Dous R. (2011). Evaluation of a new set of Real-Time PCR for *Brucella* detection within human and animal samples. J Pharma Health Sci. 1(2): 14-17.

۹. دوستی ع، کارگر م، قربانی دالینی ص، سرشار م. (۱۳۹۱). مبانی Real Time PCR و تکنیک FRET در تشخیص بیماری های عفونی. دنیای میکروب ها. ۴ (۱۴): ۴۱-۴۵.

10. Hinic V, Brodard I, Thomann A, Cvetnic Z, Makaya PV, Frey J, Abril C. (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. J Microbiol Methods. 75(2): 375–378.

۱۱. زینلی م، شیرزادی م ر. (۱۳۸۷). عوامل مؤثر در افزایش و کاهش بروز بروسلوز (تب مالت) در انسان در کشور از سال ۶۵ لغایت ۸۵، پانزدهمین کنگره دامپزشکی ایران، تهران، جامعه دامپزشکان ایران. سال۱۳۸۷، ۲۰۰-۲۰۱

12. Ghasemi B, Mohammadian B, Majidpour M. (2004). Epidemiology of human and animal brucellosis in Kurdistan province in 1997-2001. Kurdistan Uni Med Sci. 8 (30)): 23-32.

۱۳. زهرایی صالحی ت، آقایی پور خ ، عالمیان س، اکبری الف ، اسماعیل زاد م، نیری فسایی ب، صفویه ص ، اعتمادی الف. (۱۳۹۲). پنجمین کنگره ی بروسلوزیز بین المللی ایرانیان. سال۱۳۹۲، ۳۱-۲۹.

۱۴. محمد زاده ر، یوسف زاده ر. (۱۳۹۰). تشخیص *بروسلا ملی تنسیس* به روش Real Time PCR. اولین کنگره بین المللی باکتریولوژی. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز. سال۱۳۹۰، ۲۴۵۹.

۱۵. دل بیشه م، ناظمی ع، جعفر پور م. (۱۳۹۱). راه اندازی روش حساس و اختصاصیReal-Time PCR به منظور تشخیص گونه های *بروسلا*. مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی. ۴ (۱): ۱۱۰.

16. Newby DT, Hadfield TL, Roberto FF. (2003). Real-Time PCR Detection of *Brucella abortus*: a Comparative Study of SYBR Green I, Exonuclease, and Hybridization Probe Assays. Appl Environ Microbiol. 69(8): 4753-4759.

17. Jolie CS, Mark SK, Michael RS, Adrian MW. (2007). Multiplex assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *brucella* isolates at the species level. Appl Environ Microbiol. 73(22): 7331–7337.

۱۸. مالک نژاد پ، پیری دوگاهه ه، امیر زرگر ع، جعفری س، فتح اله زاده ب. (۱۳۸۷). تشخیص بروسلوز با استفاده از محیط کشت خون BACTEC و تائید آن با PCR. مجله تحقیقات دامپزشکی. ۶۲(۴): ۸۳-۸۶.

19. Hinić V, Brodard I, Thomann A, Holub M, Miserez R, Abril C. (2009). IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella spp.* in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. Bio Med Central. 5(22): 1-8.

20. Bertu WJ, Dapar M, Gusi AM, Ngulukun SS, Leo S, Jwander LD. (2010). Prevalence of *brucella* antibodies in marketed milk in Jos and environs. Afr J Food Sci. 4(2): 62-64.

Contamination of brucellosis in blood samples of seropositive patients for *Brucella* in the Shahr-e Kord and Isfahan city by Real Time PCR method

Hossein Khodabandeh[1], Nazila Arbab Soleimani[2*] Mohammad Reza Afsharzadeh[3]

1. Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Islamic Azad University, Shahrekord Branch,Shahrekord ,Iran.

2. Department of Microbiology, Department of Microbiology,Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan,Iran.

3. Department of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

***Corresponding author:** *Nazilaarbab@yahoo.co.uk*

Abstract

Brucellosis is one of the most common bacterial diseases in both humans and animals.It causes human to suffer from Malta fever and has highly economic losses in livestock. Bacteriological culture and serological tests for the diagnosis of chronic cases are insensitive. Therefore, the use of Real Time PCR is a great help to evaluate the frequency of types of *brucella abortus* and *brucella melitensis* in serum of people with positive serology.Serum samples of 30 cases with right positive test (over 1/160) were collected from DNA clinical laboratories in the cities of Shahrekord and Esfahan and they were extracted with the use of signagen DNA extraction kit. In order to identify the genus and the types of *brucella abortus* and *brucella melitensis* Real Time PCR reaction was carried out on the samples.In this study, all 30 samples were confirmed with the use of Real Time PCR. *Brucella abortus* was detected in all samples in the cities of Esfahan and Shahrekord. After Real Time PCR test was run on females, *brucella abortus* was just detected, While in males, 22 (%73/33) cases suffered from *brucella abortus* and 3 (%10) suffered from *brucella melitensis*. From the total of 7 cases with brucellosis infection in the age group below 30 years old, 6 (%85/7) cases suffered from *brucella abortus* and 1 (%14/3) suffered from *brucella melitensis*, While from the 23 cases with brucellosis in the age group over 30 years old, 21 (% 91/3) had *brucella abortus* and 2 (%8/7) had *brucella melitensis*. In recent years many molecular methods have been used for the detection of this bacteria. Real Time PCR method in the sense that it requires less time and has high sensitivity and specificity is very useful in the diagnosis of the disease.

Keywords*:* *brucella abortus*, *brucella melitensis*, serology, Real Time PCR