نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۸، شماره ۳، پائیز ۱٤۰٤، صفحات ۱- ۱٦

جداسازی و تعیین بایوار سویه‌های *بروسلا* در گاوهای شیری ایران

سعید عالمیان*

دانشیار، مؤسسه تحیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۰۲ مهر ۱۴۰۳، بازنگری: ۰۸ آبان ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۲۲ آبان ۱۴۰۳

10.22034/NFVM.2025.479246.1259

چکیده

بروسلوز، یا تب مالت، یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام با گستره شیوع جهانی است. کنترل و پیشگیری از این بیماری نیازمند پایش و ارزیابی مستمر میزان آلودگی در جمعیت‌های دامی کشور می‌باشد، زیرا انتقال گونه‌های مختلف عامل بیماری از میزبان‌های اصلی به سایر دام‌ها، اهمیت بالای اپیدمیولوژیک دارد. از این رو، شناسایی گونه‌ها و بیووارهای غالب در مناطق مختلف جغرافیایی، گامی اساسی در برنامه‌های مبارزه با بروسلوز محسوب می‌شود. در این مطالعه، ۲۵۷ نمونه از غدد لنفاوی گاوهای راکتور مثبت متعلق به ۱۵ استان و ۴۲ دامداری راکتور مثبت سراسر کشور، به بخش بروسلوز مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی ارجاع گردید. نمونه‌ها با روش‌های کشت میکروبی بررسی، و جدایه‌ها تعیین بیووار شدند. تأیید گونه‌ها و بیووارهای شناسایی‌شده، با آزمون مولتی‌پلکس انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که در مجموع ۶۲ ایزوله بروسلا جدا گردید؛ از این میان، ۲۸ ایزوله *Brucella melitensis* بیووار ۱، پنج ایزوله *B. melitensis* بیووار ۳، و ۲۹ ایزوله *Brucella abortus* بیووار ۳ شناسایی شد. این یافته‌ها، با ترسیم پراکندگی انواع بیووار در نقاط مختلف ایران، بر تداوم خطر قابل توجه تب مالت برای سلامت عمومی جامعه تأکید دارد.

واژگان کلیدی: *بروسلا ملی‌تنسیس، بروسلا آبورتوس، تشخیص، غده‌های لنفاوی، راکتور مثبت*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: alamiansaeed@gmail.com

مقدمه

بیماری بروسلوز: بروسلوز یک عفونت باکتریایی مشترک میان انسان و دام (زئونوز) است. در حیوانات، این بیماری بیشتر با نام سقط جنین واگیردار شناخته می‌شود، در حالی‌که در انسان به نام‌های تب مواج و تب مدیترانه‌ای نیز شهرت دارد و می‌تواند به‌صورت تحت‌حاد، مزمن یا موضعی بروز کند (۱-۳). در حیوانات، بروسلوز عمدتاً دستگاه ادراری–تناسلی را درگیر می‌کند؛ اما در انسان، که میزبان ثانویه یا اتفاقی محسوب می‌شود، با علائمی چون تب، تعریق، ضعف عمومی، بی‌حالی و کاهش وزن همراه است. از نظر جهانی، بیشترین موارد ابتلا در انسان ناشی از گونه *Brucella melitensis* است که به‌عنوان مهاجم‌ترین و بیماری‌زاترین گونه در جنس بروسلا شناخته می‌شود (۱-۳).

شکل ۱- التهاب بیضه و التهاب اپیدیدیم (Orchitis and Epididymitis). بیماری‌های ناشی از بروسلوز گاوی وگوسفندی و آثار آن بر سیستم تناسلی نر

گونه‌های بروسلا به شرح زیر هستند:

۱) بروسلا ملی‌تنسیس با سه بیووار که بر اساس واکنش آنتی‌سرم‌های منواسپسیفیک A و M از یکدیگر متمایز می‌گردند (۱-۳). ، ۲) بروسلا آبورتوس با هفت بیووار، ۳) بروسلا سوئیس، ۴) بروسلا نئوتومه (در جوندگان)، ۵) بروسلا اوویس در قوچ و میش، ۶) بروسلا کنیس در سگ، ۷) بروسلا ماریس (B. maris) شامل زیرگونه‌های: بروسلا فوکه (B. phocae)، خوک دریایی؛ بروسلا فوکونه (B. phocaenae)، خوک و وال؛ بروسلا دلفینی (B. delphini)، دلفین؛ بروسلا پنی‌پده‌آ، خوک و شیر دریایی؛ و بروسلا سته‌آ، بالن و وال.

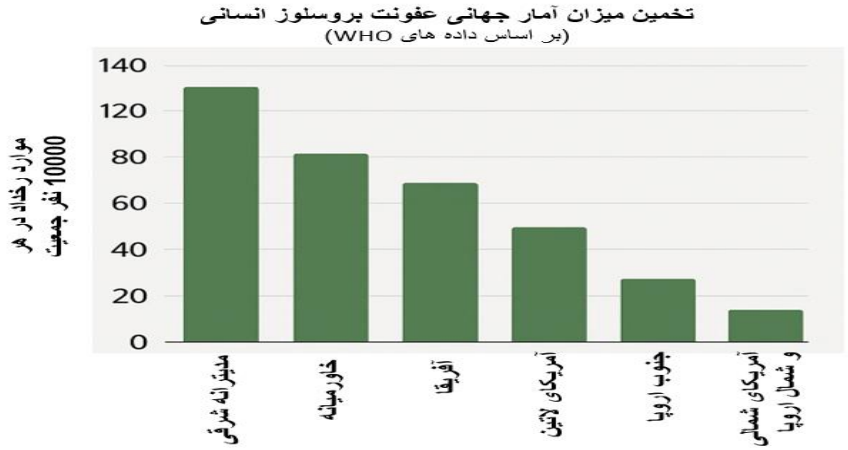
در ایران، عامل بیماری در انسان برای نخستین بار همزمان از کشت خون در انستیتو پاستور ایران توسط دکتر کراندل (رئیس وقت انستیتو پاستور) و همکاران وی، و توسط دکتر علی‌اف از کشت خون بیمار مبتلا به تب مالت در سال ۱۹۳۲ میلادی (۱۳۱۱ شمسی)، میکروب بروسلا ملی‌تنسیس جداسازی شد.

در سال ۱۳۲۳ از جنین سقط شده گاو در انستیتو رازی و سپس به دفعات در گاوداری‌های اطراف تهران، بروسلا آبورتوس جدا گردید. در سال ۱۳۲۷، برای اولین بار دکتر انتصار از شیر و جنین گوسفند و بز، بروسلا ملی‌تنسیس را جدا کرد. در سال ۱۳۵۰ دکتر اردلان و همکارانش وجود بروسلا در خوک را در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی گزارش کردند. در حال حاضر دو گونه بروسلا ملی‌تنسیس و بروسلا آبورتوس در ایران شایع هستند (۳-۱).

آمار سالیانه بروسلوز انسانی در ایران تا سال ۱۳۶۸ روند صعودی داشته و پس از آن تا سال ۱۳۷۹ سیر نزولی طی نموده است. امروزه بروسلوز مشکلی جهانی محسوب می‌شود. به استثنای تعداد کمی از کشورهای جهان که عاری از بیماری بوده یا موفق به ریشه‌کنی آن شده‌اند، بیشتر کشورها به این عفونت آلوده هستند.

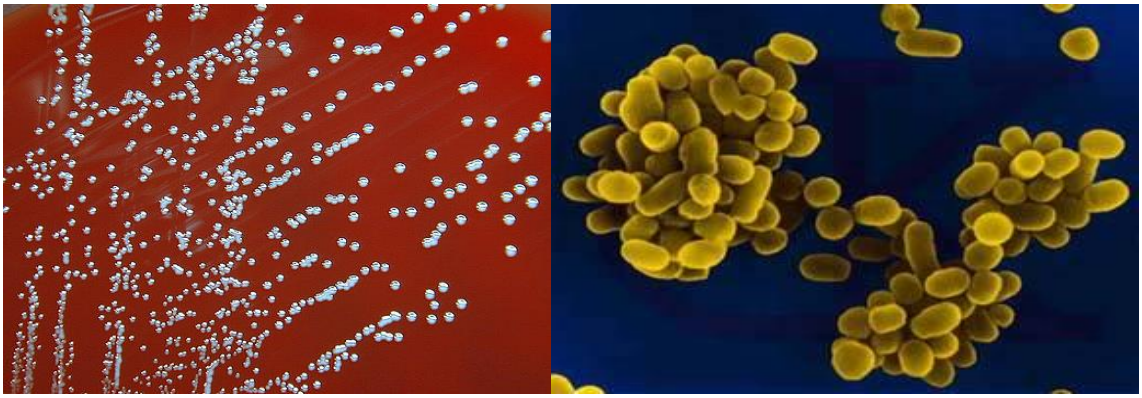
تازه‌ترین آمار جهانی تنها ۱۷ کشور یا ناحیه شامل جزایر مانش، نروژ، سوئد، فنلاند، دانمارک، سوئیس، چک و اسلواکی، رومانی، اسکاتلند، انگلستان، ولز، هلند، لوکزامبورگ، اتریش، قبرس، ژاپن، بلغارستان و جزایر فالکلند را عاری از بیماری گزارش کرده است. ایسلند و جزایر ویرجینیا (ایالات متحده آمریکا) از ابتدا هیچ‌گونه آلودگی نداشته‌اند (۱۵، ۲۰). برخی کشورها نظیر کانادا، نیوزیلند، پولینزی و پاپوا گینه نو نیز به مرز ریشه‌کنی رسیده‌اند.

طبق گزارش‌های سالیانه، حدود پانصد هزار مورد آلودگی گزارش می‌شود؛ البته این آمار بسیار بیشتر برآورد می‌گردد و اغلب موارد مربوط به بروسلا ملی‌تنسیس است (شکل ۲).



شکل ۲- نمودار به روز شده موارد آلودگی جهانی طبق آمار WHO

باکتری عامل بروسلوز باسیل‌های گرم‌منفی کوچک (Short bacilli)با طول ۰/۶ تا ۱/۵ میکرومتر و عرض ۰/۶ تا ۰/۷ میکرومتر، هوازی، غیرمتحرک، فاقد کپسول و اسپور، و از پاتوژن‌های داخل‌سلولی بوده و رشد آنها در محیط کشت به‌کندی انجام می‌شود؛Catalase ، Oxidase، Nitrateو Urease مثبت، در حالی که Citrate ، Indole و VPمنفی می‌باشند (۱، ۲).



شکل ۳- شکل کلنی‌های بروسلوز در محیط جامد و شکل فضایی باکتری

بیماری بروسلوز در گاو و گوسفند معمولاً موجب سقط جنین، کاهش تولید شیر، جفت‌ماندگی و عقیمی شده و گاهی بر اثر متریت و سپتی‌سمی حتی کشنده نیز هست. در گاو نر این بیماری باعث ارکیت، اپیدیدیمیت، تورم

مفاصل و ناباروری می‌گردد. در ایران برای تشخیص بروسلوز از روش‌های روتین سرولوژیک رایت و رزبنگال استفاده می‌شود، اما بر اساس مطالعات، روش نوین الایزا با کیت‌های وارداتی حساسیت بیشتری دارد. در این مطالعه، با بهره‌گیری از روش‌های سنتی رایت و رزبنگال در دامداری‌ها، دام‌های راکتور مثبت شناسایی و برای کشتار در زمان مشخص برنامه‌ریزی شدند. سپس نمونه‌های غدد لنفاوی این دام‌ها تحت شرایط استریل و زنجیره سرد به بخش بروسلوز ارجاع گردید (۴-۶).

مؤسسه رازی در حال حاضر با تولید سالیانه حدود ۲۰ میلیون دُز واکسن بروسلوز گوسفندی و گاوی، نقش بسزایی در کنترل بیماری در دام و در سطحی بالاتر در بهداشت و سلامت جامعه انسانی ایفا می‌کند. عامل اصلی بروسلوز گاوی، Brucella abortus است که میزبان اصلی آن گاو می‌باشد، اما توانایی آلودگی سایر حیوانات حساس همچون گوسفند، بز، شتر، اسب، سگ و نشخوارکنندگان وحشی را نیز دارد. در ایران این باکتری از گاو، بز، اسب و گاومیش جداسازی شده است (۴). این گونه دارای هفت بیوتیپ بوده که بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی مختلف از جمله نیاز به CO_2 برای رشد، تولید H_2S، رشد روی محیط‌های رنگین و واکنش آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم‌های منواسپسیفیک A، M و R قابل تفریق هستند. در میان این بیوتیپ‌ها، بیوتیپ ۳ در ایران حالت بومی داشته و شایع‌تر است (۲-۵).

بیماری در گاوهای ماده غیر آبستن معمولاً بدون علامت بوده، اما در گاوهای بالغ آبستن موجب بروز جفت‌ماندگی و در نهایت سقط جنین بین ماه‌های پنجم تا نهم آبستنی می‌شود که مهم‌ترین نشانه بیماری است (۶). علت احتمالاً تمایل باکتری به قند اریتریتول و وجود مقادیر بالای آن در بافت‌های رحم و جفت گاو می‌باشد. B. abortus از طریق ادرار، جفت، جنین، ترشحات مهبلی و شیر گاوهای آلوده دفع شده و دام‌های سالم در اثر تماس با این مواد از طریق مخاطات بینی، دهان، حلق و دستگاه تناسلی آلوده می‌شوند (۷). مهم‌ترین راه انتقال، خوردن جنین و جفت سقط شده و ترشحات رحمی آلوده به‌صورت دهانی است. این بیماری همچنین موجب اختلال در تولید مثل، کاهش تولید شیر، افزایش فاصله بین دو زایش و ناباروری می‌شود. در گاوهای نر، B. abortus می‌تواند ارکیت، اپیدیدیمیت و دفع باکتری از طریق اسپرم ایجاد کند (۸). در هر دو جنس، بیماری می‌تواند منجر به ناباروری و ضایعات اسکلتی– عضلانی گردد.

ایمنی علیه B. abortus هم از نوع هومورال و هم با واسطه سلولی است (۹). اگرچه تولید آنتی‌بادی‌ها اساس آزمایش‌های سرولوژیک بوده و در مقاومت علیه باکتری نقش دارند، به نظر می‌رسد ایمنی مؤثر بیشتر وابسته به پاسخ سلولی Th1 و تولید IL-2 و اینترفرون گاما باشد (۹-۲۱).

در تایپینگ سویه‌های بروسلای غیرکلاسیک (آتیپیک، بینابینی و گونه‌های جدید)، روش‌های بیوتایپینگ مانند فاژتایپینگ و اکسیداتیو متابولیک تست کارایی محدودی دارند، چرا که باکتری زنده نیازمند آزمایشگاه با ایمنی زیستی سطح سه است و این تست‌ها زمان‌بر و وابسته به ویژگی‌های ظاهری باکتری هستند که ممکن است تغییر یابند. این روش‌ها همچنین در شناسایی گونه‌های غیر معمول مانند گونه‌های دریایی محدودیت دارند (۲۲، ۲۳، ۲۴). تایپینگ مولکولی عموماً بر اساس ۱- لیپوپلی‌ساکارید و اسیدهای چرب، ۲- پروتئین‌های غشاء خارجی یا سیتوپلاسمی، و ۳- اسیدهای نوکلئیک انجام می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

کشت آزمایشگاهی بروسلاها: کشت آزمایشگاهی بروسلاها را می‌توان تحت سه عنوان اصلی تقسیم‌بندی کرد:

- کشت نمونه‌های غدد لنفاوی برای جداسازی باکتری Brucella.
- بررسی آزمایشگاهی نمونه‌ها به‌منظور نگهداری و مطالعه باکتری جداشده از کشت‌ها و شناسایی آن.
- کشت انبوه باکتری برای تهیه معرف‌های تشخیصی آلودگی به سویه‌های حاد و تولید واکسن‌ها.

در کشت بروسلا از نمونه‌های مرضی، محیط‌های جامد نسبت به محیط مایع ترجیح داده می‌شوند، زیرا علاوه بر

تسهیل شناسایی پرگنه‌های بروسلا، از مداخله باکتری‌هایی با رشد سریع‌تر جلوگیری می‌نمایند. توسعه محیط‌های انتخابی با اثر ویژه در پیشگیری از آلودگی، استفاده از محیط مایع برای جداسازی بروسلا را نیز امکان‌پذیر ساخته است.

معمولاً بررسی‌های آزمایشگاهی نیازمند کشت بر روی محیط جامد در لوله، پتری‌دیش یا بوآت دورو هستند. کشت در محیط مایع ممکن است منجر به تغییر در خصوصیات اصلی کشت شود، اما در صورت تأمین هوای کافی در محیط مایع طی دوره گرمخانه، می‌توان از این تغییرات جلوگیری کرد.

تا دهه‌ی ۱۹۸۰، آزمون کشت باکتریولوژیک برای تشخیص بروسلوز حیوانی چندان مورد توجه نبود، زیرا معمولاً تعداد کمی باکتری در نسوج وجود داشت و تهیه نمونه‌های عاری از آلودگی دشوار بود. با این حال، توسعه روش‌هایی برای خرد کردن آسان بافت‌ها و استفاده از محیط‌های کاملاً انتخابی، چشم‌انداز دستیابی به کشت‌های موفق را بهبود بخشید.

در میان روش‌های تشخیصی، تشخیص باکتریولوژیک می‌تواند برای نظارت مستمر بر عملکرد روش‌های سرولوژیک و تعیین وضعیت عفونت حیوانات در گله‌های دارای مشکل بکار رود (۲۴-۲۷).

شناسایی باکتری‌های بروسلا: هیچ آزمون منفردی قادر به شناسایی دقیق باکتری و تعیین تعلق آن به جنس Brucella نیست؛ اما ترکیبی از ویژگی‌های کشت، روش‌های سرولوژیک و باکتریولوژیک می‌تواند طبقه‌بندی این باکتری‌ها را امکان‌پذیر سازد. کارشناسان باتجربه معمولاً بر اساس ریخت‌شناسی (مورفولوژی) کلونی‌ها و نتایج آزمون آگلوتیناسیون صفحه‌ای، قادر به انجام شناسایی مقدماتی Brucella خواهند بود.

برای تعیین تیپ، نمونه جدا شده باید در قالب یک کشت خالص تهیه و مورد بررسی قرار گیرد. در مواردی که خصوصیات غیر معمول مشاهده شده یا باکتری از میزبان با شرایط غیر متداول جدا گردد، اجرای روش‌های رایج باکتریولوژی برای تشخیص اولیه Brucella پیش از انجام آزمون‌های تعیین تیپ ضروری است.

استاندارد طلایی (Gold Standard) برای تشخیص بروسلوز، جداسازی باکتری‌های Brucella از نمونه‌های بالینی یا محیط کشت می‌باشد.

ریخت‌شناسی (Morphology) و رنگ‌آمیزی باکتری‌های بروسلا: Brucellaها باکتری‌های گرم‌منفی، کوکوباسیل هستند که معمولاً به‌صورت انفرادی مشاهده می‌شوند؛ هرچند ممکن است به شکل جفت یا در گروه‌های کوچک نیز وجود داشته باشند. طول باکتری بین ۰/۶ تا ۱/۵ میکرومتر و عرض آن بین ۰/۵ تا ۰/۷ میکرومتر متغیر است. ریخت‌شناسی باکتری نسبتاً پایدار بوده و اشکال چندشکلی (Pleomorphism) جز در کشت‌های کهنه به‌ندرت دیده می‌شود. این باکتری‌ها فاقد کپسول واقعی هستند و در رنگ‌آمیزی‌های معمول یا رنگ‌آمیزی دوقطبی قابل مشاهده نیستند، هاگ تشکیل نمی‌دهند و غیر متحرک‌اند.

بروسلاها تا حدی در برابر رنگ‌زدایی توسط اسیدهای ضعیف مقاوم بوده، بنابراین در روش رنگ‌آمیزی اصلاح‌شده زیل–نیلسون (Modified Ziehl–Neelsen) رنگ قرمز به خود می‌گیرند. رشد بروسلا در محیط‌های مایع معمولاً ضعیف است مگر در شرایط هوادهی کامل. در انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد طی ۷ روز، سویه‌های صاف (Smooth) کدورت یکنواخت ملایمی همراه با ته‌نشست پودرمانند ایجاد می‌کنند، در حالی‌که سویه‌های ناصاف (Rough) ممکن است ته‌نشست دانه‌ای با کدورت متغیر و غشای نازک سطحی بر روی محیط مایع تشکیل دهند. رشد در محیط‌های مایع، احتمال تغییر شکل صاف به ناصاف را افزایش می‌دهد.

در محیط‌های نیمه‌جامد، سویه‌های وابسته به CO_2 مانند *B. abortus* و *B. ovis*، صفحه‌ای از رشد چند میلی‌متری در زیر سطح ایجاد می‌کنند؛ در حالی‌که گونه‌های غیر وابسته به CO_2، کدورتی یکنواخت از سطح تا عمق چند میلی‌متری ظاهر می‌سازند. تلقیح عمقی محیط

نیمه‌جامد با سویه‌های بروسلا هیچ نشانه‌ای از حرکت یا رشد بی‌هوازی نشان نمی‌دهد.

به‌طور معمول، پرگنه‌های بروسلا سه روز پس از کشت در محیط جامد قابل رؤیت هستند. لازم است کشت‌ها پس از این مدت بررسی شوند و هر پرگنه مشکوک پیش از رشد آلودگی‌های ثانویه مجدداً کشت گردد. رشد در محیط‌های انتخابی ممکن است چند روز به تأخیر بیفتد؛ بنابراین بررسی رشد باید در هر دو نوع محیط انتخابی و غیر انتخابی ابتدا پس از ۴ یا ۵ روز و سپس مجدداً در روزهای ۸ یا ۱۰ انجام گیرد (۲۶).

خصوصیات رشد باکتری‌های بروسلا: باکتری‌های بروسلا هوازی بوده و بسیاری از سویه‌ها برای رشد به دی‌اکسید کربن (CO_2) نیاز دارند. این باکتری‌ها به کندی رشد کرده و نسبت به سایر باکتری‌های هوازی تا حدی مشکل‌پسند هستند. برای رشد آنها وجود تیامین، نیکوتینامید و بیوتین ضروری است. همچنین، افزودن ۵ تا ۱۰ درصد سرم نرمال می‌تواند رشد باکتری را تحریک کند. در محیط‌های حاوی نمک‌های صفراوی و سلنیت، رشد بروسلا مهار می‌شود. در مشاهده بوآت‌ها تحت منبع نور (ترجیحاً نور غیر مستقیم روز)، پرگنه‌های بروسلا معمولاً ۳ تا ۴ روز پس از کشت به صورت گرد، با قطر ۱ تا ۲ میلی‌متر، شفاف و با حاشیه زردِ کم‌رنگ عسلی دیده می‌شوند. در مراحل بعد، پرگنه‌ها بزرگ‌تر و تیره‌تر شده ولی همچنان شفاف باقی می‌مانند. در مشاهده از بالا، پرگنه‌ها محدب و به رنگ سفید مرواریدی هستند.

در جداسازی اولیه ممکن است پرگنه‌ها به‌طور غیر معمول، در ارتباط با گلبول‌های چربی یا قطعات بافت موجود در محیط کشت مشاهده شوند. جستجوی کامل سطح بوآت ضروری است، زیرا در بسیاری موارد ممکن است تنها یک پرگنه وجود داشته باشد (۱۷، ۲۸).

پرگنه‌های مشکوک به Brucella که نزدیک به کلونی‌های دیگر یا عوامل ثانویه دیده می‌شوند، باید با احتیاط برداشته شده و مجدداً بر روی محیط انتخابی کشت شوند. اگر تنها پرگنه‌های مظنون به بروسلا در یک بوآت وجود داشته باشد، ابتدا باید چند پرگنه بر روی محیط جامد در لوله و محیط پایه در بوآت کشت گردد و سپس این کشت‌ها برای جداسازی تک‌پرگنه‌های خالص مورد استفاده قرار گیرد. پس از ۴ تا ۵ روز انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پرگنه‌های مجزای ایجاد شده در بوآت از نظر ریخت‌شناسی (مطابق توصیفات پیش‌گفته) بررسی شده و با میکروسکوپ با بزرگنمایی کم و نور مورب (oblique illumination) ارزیابی خواهند شد.

تشخیص مولکولی بروسلا: برای شناسایی بروسلا و ارتقای قابلیت‌های تشخیصی، تعداد زیادی آزمون مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توسعه یافته و مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این روش‌ها جنبه‌های مختلف فرآیند تشخیص را هدف قرار می‌دهند. در برخی موارد، هدف صرفاً شناسایی کلی بروسلا بوده است؛ مانند تشخیص بروسلوز انسانی یا آلودگی مواد غذایی، که در این حالت یک آزمون PCR مبتنی بر ژن اختصاصی کافی است. تست‌های اختصاصی ژنی اغلب ساده، پایدار و نسبتاً مقاوم در برابر اثرات محیطی هستند و قادرند بروسلا را در سطح گونه و حتی اخیراً در سطح بیوار شناسایی کنند.

مزایای اصلی روش‌های PCR شامل نیاز حداقلی به کار با باکتری زنده، کاهش خطر آلودگی زیستی، دستیابی به نتایج در زمان کوتاه و توانایی استفاده از خروجی ژنتیکی برای مطالعات اپیدمیولوژیک و کنترل بیماری است. این روش‌ها غالباً کارآمدتر، عملی‌تر و سریع‌تر از روش‌های کلاسیک در شناسایی گونه‌های بروسلا و بررسی شیوع بیماری هستند (۲۹). با این حال، پیش از استفاده از آزمون PCR در تشخیص‌های روتین آزمایشگاهی بروسلوز، لازم است حساسیت، اختصاصیت، کیفیت کنترل و تضمین کیفیت این تست‌ها روی نمونه‌های بالینی به‌طور کامل اعتبارسنجی شود. تا امروز بیش از ۵۰۰ گزارش علمی درباره روش‌های مختلف PCR در تشخیص بروسلوز منتشر شده که عمدتاً مبتنی بر DNA بروسلا استخراج‌شده مستقیم از باکتری‌های کشت‌شده یا از نمونه‌های بافتی بوده‌اند. کیفیت و خلوص DNA تأثیر بالایی بر قابلیت

شناسایی در سطح گونه دارد و وجود مهارکننده‌ها می‌تواند کارایی PCR را کاهش دهد.

نمونه‌هایی که حاوی ترکیباتی نظیر EDTA، RNase، DNase، هموگلوبین، هپارین، فنل، پلی‌آمین‌ها، پلی‌ساکاریدهای گیاهی، ادرار، آلکینات کلسیم یا سایر مواد مداخله‌کننده باشند، ممکن است منجر به نتایج منفی کاذب شوند. همچنین، آلودگی نمونه یا انتقال DNA بین نمونه‌ها می‌تواند باعث بروز نتایج مثبت کاذب شود.

برای استفاده مطمئن از PCR، ایجاد و استفاده از کنترل‌های مثبت و منفی استاندارد، کنترل داخلی، مهارکننده‌ها، استانداردسازی واکنش‌دهنده‌ها، تضمین کیفیت و پیشگیری از آلودگی ضروری است. این روش‌ها قابلیت کاربرد در شناسایی سویه‌های جداشده از فیلد و تأیید هویت سویه‌های واکسن را دارند (۳۰-۳۲).

از جمله کاربردهای تخصصی PCR، تشخیص مولکولی واکسن Rev1 B. melitensis و تمایز همزمان سویه‌های فیلدی و واکسنی از طریق PCR چندگانه بر اساس لوکوس‌های متعدد ژنوم بروسلا است (۳۳، ۳۴). تمایز سویه‌های واکسن از عوامل عفونی در گله‌های واکسینه شده اهمیت بالایی دارد. به همین منظور، شناسایی مبتنی بر PCR برای تمایز سویه‌های واکسن B. abortus و RB51 نیز در مطالعات متعدد مورد استفاده قرار گرفته است (۳۵-۴۰).

نتایج

نمونه‌های ارسالی از سراسر کشور از دامداری‌های راکتور مثبت و از دام‌های ماده کشتار شده در کنار یخ و در ظروف درب پیچ‌دار پلاستیک مخصوص نمونه و قفل‌دار در یونولیت عایق به گرما ارسال شد. مشخصات هر نمونه روی ظروف شامل نوع نمونه، محل جداسازی، نام دامدار، شماره کدلیمز نوشته شده بود. غدد لنفاوی ارسال شده از دام‌های کشتار شده و از ناحیه غدد فوق پستانی بودند، در برخی نمونه‌ها نوع غده مشخص نشده بود. دام‌های کشتار شده همگی دارای تیتر سرولوژی مثبت در رزبنگال و رایت بودند. نمونه‌ها به محض رسیدن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و کشت داده شدند. تعداد دامداری‌ها در جدول ۲ مشخص شده است.

جدول ۲- لیست دامداری‌های راکتور مثبت ارسال کننده غدد لنفاوی از گاوهای ماده شیری

ردیف	استان	تعداد دامداری	تعداد نمونه نمونه ارسالی	جنس دام
۱	قزوین	۶	۲۴	ماده
۲	فارس	۲	۲۸	ماده
۳	تهران	۵	۱۶	ماده
۴	آذربایجان شرقی	۸	۱۶	ماده
۵	البرز	۳	۲۴	ماده
۶	کرمانشاه	۱	۱۰	ماده
۷	اصفهان	۲	۱۷	ماده
۸	اردبیل	۲	۴	ماده
۹	قم	۴	۲۱	ماده
۱۰	کرمان	۲	۷	ماده
۱۱	مرکزی	۱	۷۰	ماده
۱۲	آذربایجان غربی	۱	۱	ماده
۱۳	لرستان	۲	۱۵	ماده
۱۴	چهارمحال و بختیاری	۱	۳	ماده
۱۵	سمنان	۱	۱	ماده
جمع	استان‌های دارای راکتور مثبت	۴۲	۲۵۷	ماده

مجموعاً ۶۲ ایزوله بروسلا از ۲۵۷ نمونه غدد لنفاوی مربوط به ۴۲ دامداری ارجاعی از دامداری‌های راکتور مثبت جداسازی شدند. جزئیات نتایج نمونه‌های کشت داده شده در جدول ۲ نشان داده شده است. باکتری‌های جداشده

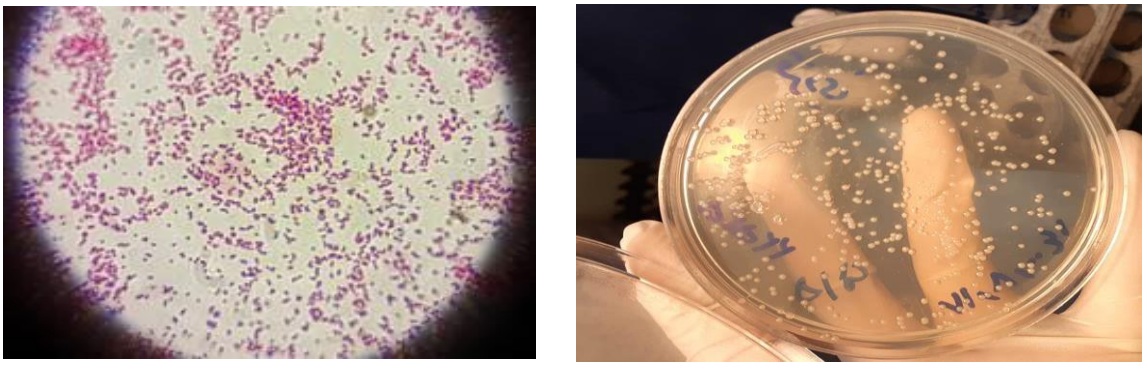
دارای ویژگی‌های فنوتیپی گونه‌های بروسلا بودند. پس از ۵-۱۰ روز انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تمام جدایه‌ها در ۱۰ درصد دی اکسید کربن (CO_2) رشد کردند. باکتری‌های جداشده، گرم منفی بودند و کلنی‌های شیری‌رنگ و براق با سطح صاف تشکیل می‌دادند. جدایه‌ها مورد بررسی تعیین بیوار قرار گرفتند جدایه‌ها همگی به‌عنوان بروسلا ملیتنسیس و بروسلا ابورتوس شناسایی شدند. تعداد سویه‌های جداسازی شده ۲۸ ایزوله *بروسلا ملیتنسیس* بیوار ۱، ۵ ایزوله بروسلا ملیتنسیس بایوار ۳، و تعداد ۲۹ ایزوله بروسلا ابورتوس بایوار ۳ با روش بایوتایپینگ شناسایی شدند.

جدول ۳- خصوصیات فاژتایپینگ گونه‌های جداسازی شده

code	Spe-cies/biovar	H2S	CO2	A	M	S/R	Fuchsin 1/50000	Fuchsin 1/100000	Thionin 1/50000	Thionin 1/100000	**Tb** RTD	**Tb** RTD*10^4	IZ	PCR-AMOS
1	B. m 1	-	-	-	+	S	+	+	+	+	NL	NL	L	B. m
2	B. m 3	-	-	+	+	S	+	+	+	+	NL	NL	L	B. m
3	B. ab3	+	+	+	-	S	+	+	+	+	L	L	L	B. ab

ارزیابی ریخت‌شناسی کلنی شامل رنگ و اندازه:

به‌طور معمول اندازه کلنی باکتری بروسلا یک تا دو میلی‌متر در کشت ۴۸ ساعته می‌باشد. و به رنگ عسلی دیده می‌شود. در رنگ‌آمیزی گرم به‌صورت کوکوباسیل قرمزرنگ دیده می‌شوند (شکل ۱).



شکل ۱- کلنی باکتری بروسلا یک تا دو میلی‌متر در کشت ۴۸ ساعته و به رنگ عسلی (سمت راست)، در رنگ‌آمیزی گرم به صورت کوکوباسیل قرمزرنگ (سمت چپ)

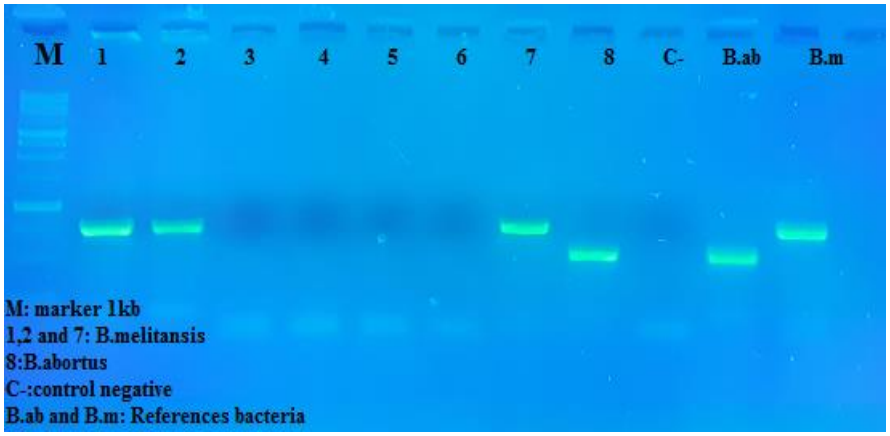
جدول ۴- نتایج کشت، سرولوژی و تایپینگ نمونه‌های غدد لنفاوی

نتایج سرولوژی رزبنگال و رایت	PCR	بایوتیپ	باکتری جداسازی شده	تعداد نمونه‌های مثبت	تعداد نمونه ارسالی	استان	شماره نمونه
مثبت	*بروسلا ملیتنسیس*	۱	*بروسلا ملیتنسیس*	۶	۲۴	قزوین	۱
مثبت	*بروسلا ملیتنسیس*	۱	*بروسلا ملیتنسیس*	۲	۲۸	فارس	۲
مثبت	*بروسلا ابورتوس* *بروسلا ملیتنسیس*	۳ ۱	*بروسلا ابورتوس* *بروسلا ملیتنسیس*	۳ ۲	۱۶	تهران	۳
مثبت	منفی	منفی	منفی	صفر	۱۶	آذربایجان شرقی	۴
مثبت	*بروسلا ملیتنسیس*	۱	*بروسلا ملیتنسیس*	۴	۲۴	البرز	۵
مثبت	*بروسلا ملیتنسیس*	۱	*بروسلا ملیتنسیس*	۶	۱۰	کرمانشاه	۶
مثبت	*بروسلا ابورتوس* *بروسلا ملیتنسیس*	۳ ۳	*بروسلا ابورتوس* *بروسلا ملیتنسیس*	۵ ۲	۱۷	اصفهان	۷

مثبت	*بروسلا ملیتنسیس*	۳	*بروسلا ملیتنسیس*	۱	۴	اردبیل	۸
مثبت	*بروسلا ابورتوس*	۳	*بروسلا ابورتوس*	۱۴	۲۱	قم	۹
مثبت	*بروسلا ملیتنسیس بروسلا ملیتنسیس*	۱ ۳	*بروسلا ملیتنسیس بروسلا ملیتنسیس*	۵ ۲	۷	کرمان	۱۰
مثبت	منفی	منفی	منفی	صفر	۷۰	مرکزی	۱۱
مثبت	*بروسلا ملیتنسیس*	۱	*بروسلا ملیتنسیس*	۱	۱	آذربایجان غربی	۱۲
مثبت	*بروسلا ابورتوس*	۳	*بروسلا ابورتوس*	۶	۱۵	لرستان	۱۳
مثبت	*بروسلا ابورتوس*	۳	*بروسلا ابورتوس*	۱	۳	چهارمحال بختیاری	۱۴
مثبت	*بروسلا ملیتنسیس*	۱	*بروسلا ملیتنسیس*	۱	۱	سمنان	۱۵
مثبت	*بروسلا ابورتوس* *بروسلا ملیتنسیس*		*بروسلا ابورتوس* *بروسلا ملیتنسیس*	۶۱	۲۵۷		جمع

تأیید باکتری‌های جداسازی شده با روش PCR:

در روش مولتی‌پلکس PCR باکتری‌های شناسایی شده، برای بروسلا ابورتوس باند ۴۹۸ بازی و برای بروسلا ملی‌تنسیس باند ۷۳۱ بازی را نشان دادند. (شکل ۲ و ۳).



شکل ۲- نمونه‌های جداسازی شده با روش مولتی پلکس PCR

ستون اول یک مارکر 1Kb ، ستون ۱،۲ و ۷ بروسلا ملیتنسیس، ستون ۳،۴،۵ و ۶ نمونه‌های منفی، ستون ۸ بروسلا آبورتوس، ستون ۹ کنترل منفی، ستون ۱۰ و ۱۱ کنترل مثبت بروسلا آبورتوس و بروسلا ملیتنسیس

بحث و نتیجه‌گیری

بروسلوز بیماری مسری و مشترک بین انسان و دام است که توسط گونه‌های مختلف جنس بروسلا ایجاد می‌شود. باکتری بروسلا بیشترین تمایل را به جفت، مایعات جنینی و دستگاه تناسلی دام‌های نر و ماده دارد و عمدتاً تولیدمثل، بقای نوزادان و تولید شیر را در حیوانات مبتلا تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ لذا ضررهای اقتصادی زیادی را بر صنعت دامپروری وارد می‌سازد. تشخیص بروسلوز به دلیل علائم بالینی متعدد و غیراختصاصی، همواره نیازمند روشی حساس، اختصاصی، سریع و ارزان است (۴۰- ۴۵).

اگرچه کشت، بهترین روش اثبات وجود بیماری محسوب می‌شود، اما روش‌های باکتری‌شناسی زمان‌بر بوده و در موارد تحت‌حاد و مزمن با موارد منفی کاذب فراوان همراه هستند؛ بنابراین، ساده‌ترین و ارزان‌ترین روش تشخیص بروسلوز آزمایش‌های سرولوژیک است. بدیهی است که پیش از استفاده از یک روش تشخیصی باید از اعتبار و اعتماد آن آگاه بود (۴۵- ۵۴).

آزمایش‌های سرولوژیکی مانند الایزا، تست تثبیت کمپلمان (CFT)، آزمایش آگلوتیناسیون سرم و آزمایش حلقه شیر می‌توانند پاسخ‌های غیر اختصاصی داشته باشند،

زیرا واکنش متقاطع با سایر باکتری‌های دارای آنتی‌ژن‌های مشترک در آنها رخ می‌دهد (۵۵-۵۹). همچنین واکنش‌های ایمنی با حساسیت پایین یا بالا، بسته به شیوع تحت بالینی یا بومی بیماری مشاهده می‌شوند (۳۴، ۶۰، ۶۱). محدودیت دیگر تست‌های سرولوژیک این است که نمی‌توانند بین حیوانات آلوده و صرفاً در معرض بیماری تمایز قائل شوند (۶۲-۷۱). در واقع، حیواناتی که تست سرمی مثبت دارند ممکن است واقعاً آلوده باشند، قبلاً آلوده شده و بهبود یافته باشند، یا حیوانات مقاومی باشند که تنها در معرض بروسلا قرار گرفته‌اند. عوامل تعیین‌کننده مقاومت طبیعی در برابر بروسلوز گزارش شده‌اند (۷۲-۷۹، ۱۴).

جداسازی باکتریولوژیکی بروسلا به‌عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص قطعی بیماری محسوب می‌شود (۸۰-۸۳). با این حال، این روش برای تشخیص در مقیاس گسترده، پرزحمت است؛ به‌دلیل زمان طولانی انکوباسیون (۱۰ تا ۱۵ روز) و خطر بالای آلوده شدن پرسنل آزمایشگاهی. علاوه بر این، فقدان محیط انتخابی دقیق باعث رشد بیش از حد آلودگی‌ها بر سطح پلیت‌های باکتری می‌شود.

محدودیت‌های تشخیص بروسلا در شیر گاو همان‌طور که در مقالات منتشر شده گزارش شده است بسیار متفاوت است، از ۲/۸ × ۱۰۴ cfu/mL (۱۰۲) تا ۲ × ۱۰۳ cfu/mL (۱۰۲) و بین ۵ cfu/mL و ۵۰ گزارش شده است. علاوه بر این، محدودیت‌های متفاوتی برای گونه‌های مختلف گزارش شد. به‌عنوان مثال، در یک مطالعه بر روی نمونه‌های شیری که به‌طور مصنوعی با بروسلا ابورتوس یا بروسلا ملیتنسیس استفاده می‌شد، محدودیت‌های تشخیص ۱۰۰ cfu/ml برای بروسلا ابورتوس و ۱۰۰۰ cfu/ml برای بروسلا ملیتنسیس گزارش شده است (۸۲). بنابراین، عوامل مختلفی ممکن است بر حساسیت PCR تأثیر بگذارد، از جمله این موارد می‌توان به اثربخشی پروتکل استخراج DNA، میزان نمونه پردازش شده، سنجش مولکولی مورد استفاده و گونه‌های بروسلای آزمایش شده اشاره کرد.

آزمایش رزبنگال و الایزا به‌ترتیب، آنتی‌بادی بروسلا را در نمونه‌های گاومیش با درصد مثبت ۹/۳۸ و ۶/۹۲ در پاکستان گزارش کردند (۸۴). نمونه خون از ۷۵۰ رأس گاومیش شیرده غیر واکسینه جمع‌آوری شد. در این ارزیابی، بروسلا ملیتنسیس بیوار ۳ از شش گاومیش در مصر جداسازی شد و روش‌های مولکولی نیز وجود آن را در سطح گونه تأیید کردند (۸۵). در مطالعه‌ای دیگر در پاکستان مشخص شد که تب مالت در سطوح بالایی در گاو و گاومیش بومی است؛ به‌طوری که ۱/۱۵ درصد از نشخوارکنندگان بزرگ سرم مثبت داشتند و تقریباً یک‌سوم مزارع لبنی حداقل یک آزمایش مثبت داشتند. در مجموع، ۹/۷ درصد از افراد در تماس مستقیم با دام، سرم مثبت بودند که نشان‌دهنده خطر بالای مواجهه با بروسلا در این گروه است (۸۶-۹۸).

آزمایش حلقه شیر که در گاو بسیار مفید است، در نشخوارکنندگان کوچک بی‌اثر است. در گله‌های بزرگ (بیش از ۱۰۰ گاو شیرده)، حساسیت آن کاهش یافته و احتمال نتایج مثبت کاذب بالا می‌رود؛ عواملی مانند ورم پستان، آغوز، شیر پایان دوره شیردهی، اختلالات هورمونی، پاستوریزاسیون و همگن‌سازی در این امر مؤثرند (۱، ۸۷-۹۲).

در منطقه مدیترانه شرقی، بیوتیپ ۳ بروسلا آبورتوس غالب است. کشت باکتریولوژیک، ایمونوهیستوشیمی، PCR و qPCR روش‌های مستقیم تشخیص بروسلا محسوب می‌شوند. با این حال، به‌دلیل هزینه و نیاز به آزمایشگاه‌های اختصاصی، در اهداف نظارتی بیشتر از آزمون‌های غیر مستقیم استفاده می‌شود (۱۲، ۹۳-۹۸).

سویه‌ی جدا شده در این مطالعه از روز پنجم به بعد شناسایی شد. بیوتیپ‌های بروسلا ملیتنسیس (۱ و ۳) و بروسلا آبورتوس (۱ و ۳) با روش‌های بیوشیمیایی، سرولوژیکی و فاژتایپینگ تعیین شدند. جداسازی B. abortus بیوتیپ I از بوفالوهای وحشی آزاد در پارک ملی کروگر آفریقای جنوبی گزارش شده و منشاء آن احتمالاً از دام‌های اهلی بوده است (۹۹-۱۰۲).

جداسازی بروسلا فرایندی دشوار، خسته‌کننده، پرخطر

و زمان‌بر است، بنابراین بسیاری از مطالعات اخیر از روش‌های مستقل از کشت مانند الایزا و PCR برای تشخیص عفونت استفاده می‌کنند.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و همکاران بخش بروسلوز تشکر می‌شود. این مقاله از طرح پژوهشی با عنوان جداسازی و تعیین بایوار سویه‌های بروسلا در گردش درگاوهای شیری با کد مصوب ۳-۱۸-۱۸۵۷-۰۰۶-۰۱۰۳۳۱ استخراج شده است.

References

1- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: *INRA*; 1988.

2- Alamian S, Amiri K, Bahreinipour A, *et al.* Brucella species circulating in rural and periurban dairy cattle farms: a comparative study in an endemic area. *Trop Anim Health Prod*. 2021; 53(2): 200. [In persian]

3- Alamian S, Dadar M, Afshar E, Bosilkovski M, Alamian MM. Isolation of Brucella melitensis from lumbar vertebrae in patient with initial misdiagnosis: a rare case with spinal epidural abscess, spinal stenosis, and brain lesion.

4- Barton CE, Lomme JR. Reduced-dose whole herd vaccination against brucellosis: a review of recent experience. *J Am Vet Med Assoc*. 1980; 177(12): 1218-1220.

5- Bosseray N. Brucella melitensis Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals*. 1991; 19(4): 355-63.

6- Bosseray N, Plommet M. Brucella suis S2, Brucella melitensis Rev 1 and Brucella abortus S19 living vaccines: residual virulence and immunity induced against three Brucella species challenge strains in mice. *Vaccine*. 1990; 8(5): 462-8.

7- Bosseray N. Brucella melitensis Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals*. 1991; 19(4): 355-63.

8- Cheville NF, Olsen SC, Jensen AE, Stevens MG, Palmer MV, Florance AM. Effects of age at vaccination on efficacy of Brucella abortus strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am J Vet Res*. 1996; 57(8): 1153-56.

9- Confer AW, Hall SM, Faulkner CB, Espe BH, Deyoe BL, Morton RJ, *et al.* Effects of challenge dose on the clinical and immune responses of cattle vaccinated with reduced doses of Brucella abortus strain 19. *Vet Mic*. 1985; 10(6): 561-575.

10- Corner LA, Alton GG. Persistence of Brucella abortus strain 19 infection in adult cattle vaccinated with reduced doses. *Res Vet Sci*. 1981; 31(3): 342-344.

11- European Pharmacopoeia. 7th ed. Brucella abortus & Brucella melitensis. 2012. p. 141-143.

12- Jimenez de Bagues MP, Elzer PH, Jones SM, Blasco JM, Enright FM, Schurig GG, *et al.* Vaccination with Brucella abortus rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of B. abortus, melitensis and ovis. *Infect Immun*. 1994; 62(11): 4990-96.

13- Hasannia E, Soleimani S, Alamian S, Behrozikhah A, Emadi A, Dostdari S. Stability study of Iriba brucellosis full-dose and reduced-dose vaccine produced by Razi institute in Iran. *Arch Razi Inst*. 2015; 70(1): 37-44. [In persian]

14- Stevens MG, Olsen SC, Pugh GW Jr, Brees D. Comparison of immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated with Brucella abortus 19 or RB51. *Infect Immun*. 1995; 63(1): 264-70.

15- de Jager FAO. The quality control of vaccines against Brucellosis. P: 161.

16- Jimenez de Bagues MP, Elzer PH, Jones SM, Blasco JM, Enright FM, Schurig GG, *et al.* Vaccination with Brucella abortus rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of B. abortus, melitensis and ovis. *Infect Immun*. 1994; 62(11): 4990-96.

17- Fensterbank R. Brucellosis in cattle, sheep and goats: diagnosis, control and vaccination. In: Brucellosis in cattle, sheep and goat. Technical Series No. 6. Paris: OIE. 1987; p: 9-35.

18- Leite K, Dorneles EMS, Pauletti RB, Poester FP, Lage AP. Brucella abortus S19 and RB51 vaccine immunogenicity test: evaluation of three mice (BALB/c, Swiss and CD-1) and two challenge strains (544 and 2308). *Vaccine*. 2015; 33(4): 507-511.

19- OIE. World Organisation for Animal Health. Brucellosis (Brucella abortus, B. melitensis and B. suis). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2016; Chapter 2.1.4.

20- Olsen SC. Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of Brucella abortus strain RB51. *Res Vet Sci*. 2000; 69(2): 135-140.

21- Palmer MV, Olsen SC, Cheville NF. Safety and immunogenicity of Brucella abortus strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am J Vet Res*. 1997; 58(5): 472-477.

22- Pugh GW Jr, Zehr ES, Meador VP, Phillips M, McDonald TJ, Deyoe BL. Immunologic, histopathologic, and bacteriologic responses of five strains of mice to Brucella abortus strain 2308. *Am J Vet Res*. 1989; 50(3): 323-28.

23- Palmer MV, Olsen SC, Cheville NF. Safety and immunogenicity of Brucella abortus strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am J Vet Res*. 1997; 58(5): 472-77.

24- Stevens MG, Olsen SC, Pugh GW Jr, Brees D. Comparison of immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated with Brucella abortus 19 or RB51. *Infect Immun*. 1995; 63(1): 264-70.

25- Olsen SC. Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of Brucella abortus strain RB51. *Res Vet Sci*. 2000; 69(2): 135-140.

26- Bosseray N, Plommet M, Pinoit J. Brucella melitensis Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals*. 1991; 19(4): 355-363.

27- Uzal F, Samartino L, Schurig G, Carrasco A, Nielsen K, Cabrera R, *et al*. Effect of vaccination with Brucella abortus strain RB51 on heifers and pregnant cattle. *Vet Res Comm*. 2000; 24(3): 143-151.

28- Bosseray N. Brucella melitensis Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals*. 1991; 19(4): 355-63.

29- Suárez-Esquivel M, Ruiz-Villalobos N, Jiménez-Rojas C, Barquero-Calvo E, Chacón-Díaz C, Víquez-Ruiz E, *et al*. Brucella neotomae infection in humans, Costa Rica. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(6): 997.

30- Jimenez de Bagues MP, Elzer PH, Jones SM, Blasco JM, Enright FM, Schurig GG, *et al*. Vaccination with Brucella abortus rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of Brucella abortus, Brucella melitensis, and Brucella ovis. *Infect Immun*. 1994; 62(11): 4990-96.

31- Olsen SC. Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of Brucella abortus Strain RB51. *Res Vet Sci*. 2000; 69(2): 135-140.

32- Xavier MN, Paixão TA, den Hartigh AB, Tsolis RM, Santos RL. Pathogenesis of Brucella spp. *Open Vet Sci J*. 2010; 4(1): 109-18.

33- Nicoletti P. An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (Bubalus bubalis). *Trop Anim Health Prod*. 1992; 24(1): 40-44.

34- Sousa MG, Salvarani FM, Bomjardim HA, Brito MF, Barbosa JD. Brucellosis in water buffaloes. *Pesq Vet Bras*. 2017; 37: 234-40.

35- Khurana SK, Sehrawat A, Tiwari R, Prasad M, Gulati B, Shabbir MZ, *et al*. Bovine brucellosis–a comprehensive review. *Vet Q*. 2021; 41(1): 61-88.

36- Das V, Paranjape V, Corbel M. Investigation of brucellosis-associated abortion in dairy buffaloes and cows in Bombay. *Indian J Anim Sci*. 1990; 60(10): 1193-94.

37- Fosgate GT, Diptee MD, Ramnanan A, Adesiyun AA. Brucellosis in domestic water buffalo (Bubalus bubalis) of Trinidad and Tobago with comparative epidemiology to cattle. *Trop Anim Health Prod*. 2011; 43(8): 1479-86.

38- Adams LG, Templeton JW. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Rev Sci Tech*. 1998; 17(1): 200-19.

39- Borriello G, Capparelli R, Bianco M, Fenizia D, Alfano F, Capuano F, *et al*. Genetic resistance to Brucella abortus in the water buffalo (Bubalus bubalis). *Infect Immun*. 2006; 74(4): 2115-20.

40- Dehkordi F, Khamesipour F, Momeni M. 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 Univ Vet Fak Derg*. 2014; 20(6): 821-28. [In persian]

41- Wyatt HV. How did Sir David Bruce forget Zammit and his goats? *J Maltese Hist*. 2014; 4(1): 45.

42- Blankenship RM, Sanford JP. Brucella canis: a cause of undulant fever. *Am J Med*. 1975; 59(3): 424-26.

43- Zowghi E, Ebadi A, Yarahmadi M. Isolation and identification of Brucella organisms in Iran. *Iran J Clin Infect Dis*. 2008; 3(4): 185-88.

44- Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis–new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol*. 2005; 98(6): 1270-81.

45- Köse Ş, Kiliç S, Özbel Y. Identification of Brucella species isolated from proven brucellosis patients in Izmir, Turkey. *J Basic Microbiol*. 2005; 45(4): 323-27.

46- Maadi H, Moharamnejad M, Haghi M. Prevalence of brucellosis in cattle in Urmia, Iran. *Pak Vet J*. 2011; 31(1): 81-2.

47- Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. Brucella abortus 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Bacteriol*. 1990; 172(7): 3569-76.

48- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clin Vaccine Immun*. 2008; 15(2): 293-96.

49- Whatmore AM, Koylass MS, Muchowski J, Edwards-Smallbone J, Gopaul KK, Perrett LL. Extended multilocus sequence analysis to describe the global population structure of the genus Brucella: phylogeography and relationship to biovars. *Front Microbiol*. 2016; 7: 2049.

50- Sánchez-Sarmiento AM, Carvalho VL, Díaz-Delgado J, Ressio RA, Fernandes NC, Guerra JM, *et al*. Molecular, serological, pathological, immunohistochemical and microbiological investigation of Brucella spp. in marine mammals of Brazil reveals new cetacean hosts. *Transbound Emerg Dis*. 2020; 67(1): 169-83.

51- Suárez-Esquivel M, Ruiz-Villalobos N, Hernández-Mora G, González-Barrientos R, Palacios-Alfaro JD, Barquero-Calvo E, *et al*. Brucella sequence Type 27 isolated from Dwarf Sperm Whale (Kogia sima) stranded in the Costa Rican Pacific Coast. *Access Microbiol*. 2019; 1(1A): e000002.

52- Greenfield RA, Drevets DA, Machado LJ, Voskuhl GW, Cornea P, Bronze MS. Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. *Am J Med Sci*. 2002; 323(6): 299-315.

53- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the Brucellosis laboratory. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique; 1988.

54- Andriopoulos P, Kalogerakou A, Rebelou D, Gil APR, Zyga S, Gennimata V, *et al*. Prevalence of Brucella antibodies on a previously acute brucellosis infected population: sensitivity, specificity and predictive values of Rose Bengal and Wright standard tube agglutination tests. *Infection*. 2015; 43(3): 325-30.

55- Dohoo IR, Wright PF, Ruckerbauer GM, Samagh BS, Robertson FJ, Forbes LB. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. *Can J Vet Res*. 1986; 50(4): 485-93.

56- Alton GG, Maw J, Rogerson BA, McPherson GG. The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose bengal tests. *Aust Vet J*. 1975; 51(2): 57-63.

57- Greiner M, Verloo D, de Massis F. Meta-analytical equivalence studies on diagnostic tests for bovine brucellosis allowing assessment of a test against a group of comparative tests. *Prev Vet Med*. 2009; 92(4): 373-81.

58- Emmerzaal A, De Wit J, Dijkstra T, Bakker D, Van Zijderveld F. The Dutch Brucella abortus monitoring programme for cattle: the impact of false-positive serological reactions and comparison of serological tests. *Vet Q*. 2002; 24(1): 40-46.

59- Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J*. 2010; 51(4): 296-305.

60- Nielsen K, Kelly L, Gall D, Nicoletti P, Kelly W. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995; 46(3-4): 285-91.

61- Sutherland SS. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of cattle infected with Brucella abortus. *Vet Mic*. 1984; 10(1): 23-32.

62- Bercovich Z, Moerman A. Non-specific positive milk ring test(s) in tank milk and Estrumate in the treatment of cattle. *Tijdschr Diergeneeskd*. 1979; 104(18): 713-16.

63- Al-Mashhadany DA. The significance of milk ring test for identifying brucella antibodies in cows and buffaloes' raw milk at Erbil governorate, Iraq. *Iraqi J Vet Sci*. 2019; 33(2): 395-400.

64- Erkmen O. Microbiological analysis of foods and food processing environments. Academic Press; 2021; p. 69.

65- Yagupsky P. Detection of Brucellae in blood cultures. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(11): 3437-42.

66- Büyükcangaz E, Şen A, Kahya S. Isolation and biotyping of Brucella melitensis from aborted sheep and goat fetuses. *Turk J Vet Anim Sci*. 2009; 33(4): 311-6.

67- Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol*. 2002; 90(1-4): 435-46.

68- Yu WL, Nielsen K. Review of detection of Brucella spp. by polymerase chain reaction. *Croat Med J*. 2010; 51(4): 306-13.

69- Ali S, Ali Q, Melzer F, Khan I, Akhter S, Neubauer H, *et al*. Isolation and identification of bovine Brucella isolates from Pakistan by biochemical tests and PCR. *Trop Anim Health Prod*. 2014; 46(1): 73-78.

70- Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of Brucella abortus bv. 1, 2, and 4, Brucella melitensis, Brucella ovis, and Brucella suis bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994; 32(11): 2660-66.

71- Jiang H, Fan M, Chen J, Mi J, Yu R, Zhao H, *et al*. MLVA genotyping of Chinese human Brucella melitensis biovar 1, 2 and 3 isolates. *BMC Microbiol*. 2011; 11(1): 256.

72- Richtzenhain LJ, Cortez A, Heinemann MB, Soares RM, Sakamoto SM, Vasconcellos SA, *et al*. A multiplex PCR for the detection of Brucella spp. and Leptospira spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Vet Microbiol*. 2002; 87(2): 139-47.

73- Memish ZA, Balkhy HH. Brucellosis and international travel. *J Travel Med*. 2004; 11(1): 49-55.

74- Ezama A, Gonzalez JP, Majalija S, Bajunirwe F. Assessing short evolution brucellosis in a highly brucella endemic cattle keeping population of Western Uganda: a complementary use of Rose Bengal test and IgM rapid diagnostic test. *BMC Public Health*. 2018; 18(1): 315.

75- Shoukat S, Wani H, Ali U, Para PA, Ara S, Ganguly S. Brucellosis: a current review update on zoonosis. *J Immunol Immunopathol*. 2017; 19(2): 61-9.

76- Sofian M, Sheikholeslami M, Mahdaviani FA, Aghakhani A, Banifazl M, Eslamifar A, *et al*. Low prevalence of Brucella agglutinins in blood donors in central province of Iran. *Iran J Microbiol*. 2013; 5(1): 24-7. [In persian]

77- Alavi SM, Rafiei A, Nikkhooi A. The effect of lifestyle on brucellosis among nomads in Khuzestan province of Iran. *Pak J Med Sci*. 2007; 23(3): 358. [In persian]

78- Ashrafganjooyi S, Saedadeli N, Alamian S, Khalili M, Shirazi Z. Isolation and biotyping of Brucella spp. from sheep and goats raw milk in southeastern Iran. *Trop Biomed*. 2017; 34(3): 507-11. [In persian]

79- Beheshti S, Rezaian G, Azad F, Faghiri Z, Taheri F. Seroprevalence of brucellosis and risk factors related to high risk occupational groups in Kazeroon, South of Iran. *Int J Occup Environ Med*. 2010; 1(2): 70-6. [In persian]

80- Dastjerdi MZ, Nobari RF, Ramazanpour J. Epidemiological features of human brucellosis in central Iran, 2006–2011. *Public Health*. 2012; 126(12): 1058-62. [In persian]

81- Sofian M, Aghakhani A, Velayati AA, Banifazl M, Eslamifar A, Ramezani A. Risk factors for human brucellosis in Iran: a case–control study. *Int J Infect Dis*. 2008; 12(2): 157-61. [In persian]

82- Khan TI, Ehtisham-ul-Haque S, Waheed U, Khan I, Younus M, Ali S. Milk Indirect-ELISA and Milk Ring Test for screening of brucellosis in buffaloes, goats and bulk tank milk samples collected from two districts of Punjab, Pakistan. *Pak Vet J*. 2018; 38(1): 37-41.

83- Patel P, Modi L, Patel S, Jadhav K, Falguni M. Seroprevalence of Brucellosis in buffalo bulls used for natural service in Mehsana milk shed area, Gujarat. *JIVA*. 2011; 9(2): 64-5.

84- Patel KB, Chauhan H, Patel S, Patel B, Shrimali M, Chandel B. Molecular detection of Brucella abortus using bscp31 and IS711 gene based pcr assay in cattle and buffalo. *Buffalo Bull*. 2018; 37(1): 71-80.

85- Amoroso MG, Salzano C, Cioffi B, Napoletano M, Garofalo F, Guarino A, *et al*. Validation of a Real-time PCR assay for fast and sensitive quantification of Brucella spp. in water buffalo milk. *Food Control*. 2011; 22(8): 1466-70.

86- Ewalt DR, Bricker BJ. Validation of the abbreviated Brucella AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of Brucella abortus field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(8): 3085-6.

87- Benkirane A. Ovine and caprine brucellosis: World distribution and control/eradication strategies in West Asia/North Africa region. *Small Rumin Res*. 2006; 62(1-2): 19-25.

88- Ducrotoy M, Bertu W, Matope G, Cadmus S, Conde-Álvarez R, Gusi AM, *et al*. Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control. *Acta Trop*. 2017; 165: 179-93.

89- Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, Jensen AE. Evaluation of the Brucella abortus species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the Brucella AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest*. 2003; 15(4): 374-8.

90- Lopez-Goñi I, Garcia-Yoldi D, Marin CM, de Miguel MJ, Munoz PM, Blasco JM, *et al*.

Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all Brucella species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(10): 3484-7.

91- Price RE, Templeton JW, Smith R 3rd, Adams LG. Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control in vitro intracellular survival of Brucella abortus. *Infect Immun*. 1990; 58(4): 879-86.

92- Blasco JM, Marin C, Jiménez de Bagués M, Barberan M, Hernandez A, Molina L, *et al*. Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing Brucella melitensis infection in sheep. *J Clin Microbiol*. 1994; 32(8): 1835-40.

93- Dobson A, Meagher M. The population dynamics of brucellosis in the Yellowstone National Park. *Ecology*. 1996; 77(4): 1026-36.

94- OIE. Bovine brucellosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2004; Part 2: Section 2.3.

95- Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63(10): 3741-51.

96- Hamdy ME, Amin AS. Detection of Brucella species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels.

97- Hussain I, Arshad MI, Mahmood MS, Akhtar M. Seroprevalence of brucellosis in human, cattle, and buffalo populations in Pakistan. *Turk J Vet Anim Sci*. 2008; 32(4): 315-8.

98- Hosein HI, Zaki HM, Safwat NM, Menshawy AM, Rouby SR, Mahrous A, *et al*. Evaluation of the General Organization of Veterinary Services control program of animal brucellosis in Egypt: an outbreak investigation of brucellosis in buffalo. *Vet World*. 2018; 11(6): 748-54.

99- Gül K, Boynukara B, Ilhan Z, Ekin IH, Gül Y. Comparison of the dot-immunobinding assay with the serum agglutination test, the rose bengal plate test and the milk ring test for the detection of Brucella antibodies in bovine sera and milk. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 1999; 46(5): 279-85.

100- Chand P, Rajpurohit BS, Malhotra A, Poonia JS. Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep. *Vet Microbiol*. 2005; 108(3-4): 305-11.

101- Renukaradhya GJ, Isloor S, Rajasekhar M. Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. *Vet Microbiol*. 2002; 90(1-4): 183-95.

102- Abbas BA, Aldeewan AAH. Occurrence and epidemiology of Brucella spp. in raw milk samples at Basrah province, Iraq. *Bulg J Vet Med*. 2009; 12(2): 113-20.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 3, Autumn 2025, pages: 1-16

Isolation and Biovar Determination of *Brucella* Strains in Dairy Cattle of Iran

Saeed Alamian*

Associate professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Receive: September 23, 2024; Revise: October 29, 2024; Accept: November 12, 2024

10.22034/nfvm.2025.479246.1259

Summary

Brucellosis is a widespread zoonotic disease with a global distribution. The control and prevention of this disease require the assessment and monitoring of infection in the country's livestock, as the transmission of this bacterial species from its primary host to other animals is of significant epidemiological importance. Therefore, determining the dominant species and biovars in various geographical areas is a key component of the strategy to combat this disease. In this regard, 257 lymph node samples from reactor-positive cattle, collected from 42 dairy farms across 15 provinces of Iran, were sent to the Brucellosis Department of the Razi Vaccine and Serum Research Institute. Samples were cultured, and the identity of the isolates was confirmed by multiplex PCR. In total, 62 Brucella isolates were recovered and identified as follows: 28 Brucella melitensis biovar 1, 5 Brucella melitensis biovar 3, and 29 Brucella abortus biovar 3. This study describes the prevalence of these biovars in different regions of Iran and emphasizes that brucellosis remains a significant risk to public health.

Keywords: *Brucella melitensis, Brucella abortus, Diagnosis, Lymph Nodes, Positive Reactor*