TUMJ مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مهر ۱۳۹۵، دوره ۷۴، شماره ۷، صفحه‌های ۵۱۷ تا ۵۲۱
مقاله اصیل

بررسی آلودگی شیر خام به باکتری بروسلا با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

محمد خلیلی[۱و۲*]
محمد رضا افلاطونیان[۲]
فرزانه سالاری علی‌آبادی[۱]
جلیل آبشناس[۳]

۱- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.
۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

*نویسنده مسئول: کرمان، بلوار ۲۲ بهمن، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی
تلفن: ۰۳۴۳۱۳۲۲۹۰۹
E-mail: mdkhalili1@yahoo.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۰۵ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۹/۰۹ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۸ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۹/۲۹

زمینه و هدف: تب مالت در بسیاری از کشورهای خاورمیانه مانند ایران یک مشکل مهم بهداشت عمومی محسوب می‌شود. در کشورهای در حال توسعه، آلودگی شیر به گونه‌های باکتری بروسلا اصلی‌ترین راه انتقال بیماری در انسان محسوب می‌شود. استاندارد طلایی تشخیص بروسلوز، جداسازی باکتری‌های گونه بروسلا می‌باشد، اما برای این منظور نیاز به تجهیزات با سطح ایمنی زیستی (Biosafety level) سه و مهارت بالا و گذر زمان طولانی است. برای چیرگی بر این مشکلات از روش حساس و با اختصاصیت بالای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده می‌شود. هدف از انجام این پژوهش ردیابی باکتری‌های گونه بروسلا در شیر تحویلی دامداری‌های اطراف شهر کرمان به یکی از کارخانه‌های مهم کرمان با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز است.

روش بررسی: در این مطالعه مقطعی که از مهر تا اسفند ۱۳۹٤ انجام گرفت، از ٤٨ گله گاو شیری مشتمل بر ٤۲۰۰ گاو که شیر خود را تحویل یکی از بزرگترین کارخانه‌های جنوب شرق ایران می‌دادند، نمونه‌های جداگانه تهیه گردید. اسید نوکلییک نمونه‌ها با روش بافر لیزکننده و پروتییناز K استخراج گردید سپس با استفاده از پرایمر جنس بروسلا، ژن IS711 برای بودن اسید نوکلییک بروسلا در شیر با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه‌های مثبت قطعه‌ای به اندازه ۳۱۷ جفت باز از ژنوم باکتری‌های گونه بروسلا تکثیر می‌یافت.

یافته‌ها: چهار نمونه (۸/۳٪) از مجموعه ٤٨ نمونه شیر مخزن از ٤۲۰۰ گاو شیری از نظر وجود ژنوم باکتری‌های گونه بروسلا در شهر کرمان مثبت گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج گویای اندمیک بودن بروسلوز در گله‌های گاوی شیری در شهر کرمان می‌باشد.

کلمات کلیدی: بروسلوز، شیر، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، کرمان.

مقدمه

بروسلوز در ایران، هم در انسان و هم در جمعیت دامی یک بیماری اندمیک مهم محسوب می‌شود. بیماری از طریق خوردن شیر خام و پنیر محلی و به‌ندرت از طریق خراش‌های جلدی و استنشاقی سرایت می‌کند. بروسلوز در انسان طیف بسیار متغیری از علایم بالینی را ایجاد می‌کند.[۱] بروسلوز انسانی اولین‌بار در سال ۱۹۳۲ در ایران تشخیص داده شد و برنامه واکسیناسیون دامی از سال ۱۹٤۹ در ایران آغاز شد.[۳]

بر اساس داده‌های موجود، در سال‌های اخیر بر تعداد موارد ابتلا افزوده شده است و ایران به‌عنوان یک منطقه مهم از نظر شیوع بروسلوز در دنیا مطرح می‌باشد.[٤] در استان کرمان به‌ویژه در شهرستان‌های شهربابک، بردسیر، سیرجان، بافت و رفسنجان آلودگی به نسبت بالایی دارند که شیرهای تولیدی آن‌ها هم به کارخانجات لبنیات ارسال می‌شود و نسبت کمی هم به‌صورت لبنیات محلی تولید و در سطح استان پخش می‌شود. همچنین شیوع سرمی در کارکنان گاوداری‌های صنعتی و نیمه‌صنعتی ۲/۳٪ بوده و سابقه بیماری در خانواده

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-20]

این افراد هم بیشتر مشاهده شده است.[۵]

بروسلوز علاوه بر اهمیت بالا در بهداشت عمومی، به‌دلیل ایجاد سقط شدید در دام‌ها از اهمیت اقتصادی بالایی نیز برخوردار است.[۶] از آنجایی‌که موارد انسانی بروسلوز بی‌گمان یک منبع دامی دارد، بنابراین بهترین روش کنترل بیماری با واکسیناسیون در دام‌ها است.[۷] از آنجایی‌که برای جوامع انسانی واکسن مناسبی در دسترس نمی‌باشد، بنابراین کنترل بیماری در سطح دام‌ها و آموزش مناسب بهترین رویکرد برای ریشه‌کنی بیماری است.[۸] هدف از انجام این پژوهش ردیابی باکتری‌های گونه بروسلا در شیر تحویلی دامداری‌های اطراف شهر کرمان به یکی از کارخانه‌های بزرگ آن استان است.

روش بررسی

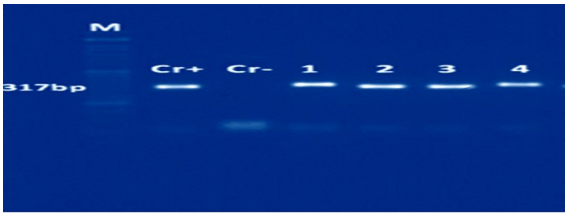
در این مطالعه مقطعی که از اوایل پاییز تا پایان زمستان ۱۳۹٤ انجام گرفت، تعداد ٤۸ نمونه شیر مخزن مشتمل بر ٤۲۰۰ گاو شیرده که شیر خود را به یکی از کارخانه‌های بزرگ کرمان تحویل می‌دادند، نمونه‌گیری انجام شد. این تعداد نمونه شامل ۹۰٪ از کل گله‌های صنعتی و نیمه‌صنعتی از ۱۰ تا ٤۰۰ راس بود که شیر خود را به‌صورت روزانه به کارخانه تحویل می‌دادند. نمونه‌ها بی‌درنگ روی یخ به آزمایشگاه مولکولی مرکزی دانشکده دامپزشکی منتقل گردید. پس از سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ °C، محتویات رسوبی که شامل باکتری‌ها و لکوسیت‌های ترسیب شده بود با ۵۰۰ µl Phosphate buffered saline (PBS) حل شده و دوباره با دور ۸۰۰۰ برای حذف عوامل ممانعت‌کننده واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز سانتریفیوژ گردید در نهایت با ۲۰۰ µl PBS رسوبات محلول گردید و نمونه‌ها تا انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در فریزر ۸۰- °C نگداری شدند. استخراج اسید نوکلییک به‌کمک روش بافر لیزکننده سلولی و پروتییناز K (Bioneer, South Korea) بر اساس پروتکل استاندارد استخراج گردید.[۹] به‌این‌ترتیب که ۵۰۰ µl از نمونه شیر با دور ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید، لایه چربی حاصل حذف شده و سه مرتبه با PBS شستشو انجام شد. به پلیت سلولی حاصل ٦۰۰ µl از بافر لیزکننده سلولی (۱۰ mM Tris-Hcl، EDTA ۱۰ mM، ۰/۱٪ SDS با PH= ۸) افزوده و پس از هموژن کردن پلیت، پروتییناز K افزوده شد و حداقل سه ساعت در ۵۵ °C قرار داده شد. سپس ۲۰۰ µl محلول استات پتاسیم اضافه گردید و ۲۰ ثانیه ورتکس و سپس به‌مدت سه دقیقه در ٤ °C با دور بالا سانتریفیوژ شد. مایع رویی به یک میکروتیوب دیگر منتقل شده و به آن ٦۰۰ µl ایزوپروپانول سرد افزوده و به‌مدت یک دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید، سپس مایع رویی دور ریخته شد و ٦۰۰ µl اتانول ۷۰٪ افزوده و دوباره به‌مدت یک دقیقه سانتریفیوژ گردید و دوباره مایع رویی میکروتیوپ تخلیه و پس از تبخیر کامل اتانول، اسید نوکلییک توسط ۵۰ µl آب مقطر استریل به حالت محلول در آمده و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- °C نگهداری شد. در این مطالعه برای ردیابی باکتری‌های جنس بروسلا ناحیه‌ای از ژن کدکننده IS711 ژنوم بروسلا مورد هدف قرار گرفت (جدول ۱). حجم نهایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۲۵ µl مشتمل بر دو واحد آنزیم پلی‌مراز Taq (Copenhagen, Denmark)، dNTPs۰/۲۵ µl (Bioneer, South Korea)، ۲/۵ µl بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ۱/۵ µl کلرید منیزیوم ۵۰ mmol (Bioneer, South Korea)، پرایمرهای F و R (Copenhagen, Denmark) هر کدام ۱/۵ µl (٤۰ پیکومول)، ۲/۵ µl اسید نوکلییک استخراج شده و در نهایت با ۱۵ µl آب دوبار تقطیر حجم نهایی به ۲۵ µl رسید.

برنامه دمایی نیز در Thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, USA) شامل یک مرحله پیش دناتوراسیون در ۹۵ °C به‌مدت سه دقیقه، ۳۵ سیکل ۹۵ °C برای ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C برای ۳۰ ثانیه بود و یک مرحله نهایی ۷۲ °C به‌مدت

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن IS 711

اندازه محصول (bp)	توالی (´۳-´۵)	نام پرایمر	هدف
۳۱۷	5′-GAGAAT AAAGCCAACACCCG-3′	IS 711-F	IS 711
	5′-GATGGACGAAACCCACGAAT-3′	IS 711-R	

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-20]



شکل ۱: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نمونه‌های شیر خام کرمان

M: مارکر ۵۰ bp، Cr+: سوش رفرانس Rev1، Cr-: نمونه بدون اسید نوکلییک (NTC)، ٤-۱: نمونه‌های مثبت.

۱۰ دقیقه گذاشته شد. پس از انجام مرحله تکثیر، محصولات با رنگ فلوئوروسنت فلورو (Cinagen, Iran) رنگ‌آمیزی و روی ژل آگاروز (Merck, Germany) ۱/۲٪ در کنار کنترل مثبت و منفی الکتروفورزیس برای مشاهده تکثیر قطعه ۳۱۷ جفت بازی انجام گردید.

برای بررسی وجود آلودگی در حین استخراج، به‌ازای هر پنج نمونه شیر از یک نمونه آب به‌عنوان کنترل استخراج استفاده گردید. برای بررسی اطمینان از نداشتن نمونه‌های منفی کاذب، از دو راهکار استفاده گردید، نخست به نمونه‌های منفی اسید نوکلییک کنترل مثبت با کمترین رقت ممکن (10^{-3}) اضافه گردید تا از عدم وجود مواد ممانعت‌کننده واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اطمینان حاصل شود و یا به‌صورت رندوم اسید نوکلییک‌های استخراج شده برخی نمونه‌ها به‌میزان ۱:۱۰۰ رقیق شد و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دوباره انجام گرفت. از سوش Rev1 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

یافته‌ها

چهار نمونه (۸/۳٪) از مجموعه ٤٨ نمونه شیر مخزن از ٤۲۰۰ گاو شیری با روش IS711-PCR از نظر وجود ژنوم گونه‌های باکتری بروسلا (*Brucella* spp) در شهر کرمان مثبت گردید. تمامی کنترل‌های استخراج و کنترل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز منفی گردید که گویای نبود آلودگی نمونه‌های شیر به اسید نوکلییک یا محصول PCR بود. اسید نوکلییک استخراجی فاقد هر گونه مواد ممانعت‌کننده واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مقادیر موثر بود.

بحث

از آنجایی‌که اصلی‌ترین راه انتقال بیماری تب مالت، مصرف شیر و لبنیات غیرپاستوریزه می‌باشد، بنابراین در این مطالعه باکتری‌های گونه بروسلا در شیر خام گله‌های گاو کرمان با روش مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت ۸/۳٪ از نمونه‌های شیر مثبت گردید.

Khalili و همکاران شیوع سرمی بروسلوز را در کارگران کشتارگاه دام کرمان ۵۸/٦٪ گزارش نمودند.[10] Shafei و همکاران در بررسی ٦۰ نمونه شیر گاو مشکوک به بروسلوز، در استان کردستان، ۳۳/٤٪ با روش PCR مثبت گزارش کردند.[11] Abdalla در سودان با روش PCR IS 711 توانست ۲۲/٤٪ از نمونه‌های شیر خام باکتری بروسلا را تشخیص دهد.[12] در مطالعه‌ای که Kaynak و همکاران انجام دادند، ۲٪ از کل نمونه‌ها هم با روش qPCR و هم با روش کشت از نظر وجود باکتری بروسلا آبورتوس مثبت گردید.[13]

اصلی‌ترین ریسک ابتلا به بروسلوز در ایران مصرف شیر و فراورده‌های لبنی غیرپاستوریزه می‌باشد.[14]

از آنجایی‌که تنها منبع پخش آلودگی دام‌های اهلی هستند، بهترین راهکار واکسیناسیون مناسب دام‌ها و حذف دام‌های مثبت است.[4] از سوی دیگر عدم واکسن در درمان‌های دیرهنگام، ناکارآمد بودن تکنیک‌های تشخیصی، عدم وجود علایم اختصاصی، وجود مخازن دامی که نقش انکوباتور را دارد، از جمله مهمترین مشکلات در بهداشت عمومی است. با توجه به کاستی‌های بیان‌شده، ضرورت همکاری نزدیک پزشکی و دامپزشکی در پایش و پیشگیری از بروسلوز و سایر زئونوزها احساس می‌شود.[15] برای پیشگیری از ابتلا به بروسلوز علاوه بر احتمام ویژه به کنترل آن در سطح دام‌ها، بایستی به آحاد جامعه ریسک‌های مصرف شیر و مواد لبنی غیرپاستوریزه را در یک برنامه دایمی آموزش داد.[16]

نتایج این مطالعه گویای وجود گونه‌های باکتری بروسلا در نمونه‌های شیر گاو و احتمال انتقال این گونه‌ها به دام‌های دیگر می‌باشد. افزون بر این برای مطالعه بروسلوز در گاو بایستی از روش‌های مطالعاتی دیگر مبتنی بر به‌کارگیری روش‌های تشخیصی سرولوژی، روش‌های کشت و مولکولی نیز برای به‌کارگیری بهترین روش در مطالعه بروسلوز بهره جست.

همچنین نتایج ایـن بررسی نشان داد مصرف شیر و فراورده‌های

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-20]

لبنی غیرپاستوریزه ریسک بالایی در ابتلا به بروسلوز در این منطقه دارد.

سپاسگزاری: نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی کرمان ابراز می‌دارند.

References

1. Dean AS, Crump L, Greter H, Schelling E, Zinsstag J. Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(10):e1865.
2. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. *N Engl J Med* 2005;352(22):2325-36.
3. Kafil HS, Baha Hosseini S, Sohrabi M, Asgharzadeh M. Brucellosis: presence of zoonosis infection 3500 years ago in north of Iran. *Asian Pac J Trop Dis* 2014;4(Suppl 2):S684-6.
4. Leylabadlo HE, Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Brucellosis in Iran: Why Not Eradicated? *Clin Infect Dis* 2015;61(10):1629-30.
5. Mohammadkhani M, Sharifi H, Rashidi H, Nabipour A, Jahanshahi M. Seroepidemiology of brucellosis in industrial and semi-industrial dairy personnel and veterinary network staff in kerman, 2012. *Iran J Epidemiol* 2015;10(4):54-61.
6. Askarian M, Mansour Ghanaie R, Karimi A, Habibzadeh F. Infectious diseases in Iran: a bird's eye view. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(11):1081-8.
7. Goodwin ZI, Pascual DW. Brucellosis vaccines for livestock. *Vet Immunol Immunopathol* 2016;181:51-8.
8. Esmaeili H. Brucellosis in Islamic Republic of Iran. *J Med Bacteriol* 2014;3(3-4):47-57.
9. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. P. 1244-9.
10. Khalili M, Sami M, Aflatoonian MR, Shahabi-Nejad N. Seroprevalence of brucellosis in slaughterhouse workers in Kerman city, Iran. *Asian Pac J Trop Dis* 2012;2(6):448-50.
11. Shafei B, Ahmadi M. Dastmalchi Saei H. Diagnosis of brucellaabortus and brucellamelitensis in the milk of cattle and sheep in Kordestan province by polymerase chain reaction. *Vet Res* 2013;8(2):127-35.
12. Abdalla A, Hamid ME. Comparison of conventional and non-conventional techniques for the diagnosis of bovine brucellosis in Sudan. *Trop Anim Health Prod* 2012;44(6):1151-5.
13. Kaynak-Onurdag F, Okten S, Sen B. Screening Brucella spp. in bovine raw milk by real-time quantitative PCR and conventional methods in a pilot region of vaccination, Edirne, Turkey. *J Dairy Sci* 2016;99(5):3351-7.
14. Hasanjani Roushan MR, Mohrez M, Smailnejad Gangi SM, Soleimani Amiri MJ, Hajiahmadi M. Epidemiological features and clinical manifestations in 469 adult patients with brucellosis in Babol, Northern Iran. *Epidemiol Infect* 2004;132(6):1109-14.
15. Khalili M. Q Fever: Future Epidemics in Iran.19th Iranian Veterinary Congress, Apr 2016, Tehran, Iran.
16. Rasouli J, HolakoueiNaeini K, Forouzanfar MH, SalarilakSh, Bahonar M, Rashidian A. Cost effectiveness of livestock vaccination for brucellosis in West Azerbayjan province. *J Urmia Univ Med Sci* 2009;20(1):13-20.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-20]

TUMJ Tehran University Medical Journal, October 2016; Vol. 74, No. 7: 517-521 Original Article

Brucella contamination in raw milk by polymerase chain reaction

Mohammad Khalili Ph.D.[1,2*]
Mohammad Reza Aflatoonian Ph.D.[2]
Farzaneh Salari Aliabadi D.V.M.[1]
Jalil Abshenas Ph.D.[3]

1- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2- Research Center for Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

[*] Corresponding author: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, 22 Bahman Blvd., Kerman, Iran.
Tel: +98 34 31322909
E-mail: mdkhalili1@yahoo.com

Abstract

Received: 26 Sep. 2016 Revised: 29 Nov. 2016 Accepted: 18 Dec. 2016 Available online: 19 Dec. 2016

Background: Human brucellosis is a significant public health problem in many middle east countries including Iran. Brucella organisms, which are small aerobic, facultative intracellular coccobacilli, localize in the reproductive organs of host animals, causing abortions and sterility. They are shed in large numbers in the animal's urine, milk, placental fluid, and other fluids. Dairy product from raw milk are a potential threat to public health in endemic developing countries. The gold standard for the diagnosis of brucellosis is isolation of Brucella species. However, isolation Brucella species is time consuming and needed to level 3 biocontainment facilities and highly skilled technical personnel to handle samples and live bacteria for eventual identification. Handling Brucella species increase risk of laboratory infection. Polymerase chain reaction (PCR) with high sensitivity and specifity overcomed to these disadvantages. The aim of this study was to detect Brucella species in milk from dairy cattle farms in Kerman province, Iran by PCR technique.

Methods: Forty and eight bulk tank milk (BTM) were collected from October 2015 to March 2016 from 48 dairy cattle farm including 4200 cows. DNA of milk samples extracted by lysis buffer and proteinase K method. All milk samples were examined by PCR to detect Brucella-specific DNA targeting IS 711. Positive samples must be showed 317 bp amplified, corresponding to the expected size of the IS 711 genome region in all Brucella species.

Results: Using IS711 primer were detected in 4 samples (8.3%) Brucella spp. from 48 BTM samples in this area.

Conclusion: The results indicate that brucellosis by Brucella species is endemic in the Kerman province dairy farms. Consumption of raw milk dairy products by individual farmers operating under poor hygienic conditions represents an high risk to public health. The need for implementing control measures and raising public awareness on zoonotic transmission of brucellosis are recommended. Vaccination of cattle is recommended for control of bovine brucellosis in enzootic areas with high prevalence rates.

Keywords: Brucellosis, Iran, milk, polymerase chain reaction.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-05-20]