DOI: 10.22055/IVJ.2023.387783.2563

بررسی وضعیت آلودگی به *بروسلا ملی‌تنسیس* و مقایسه روش‌های مولکولی و غیر مولکولی تشخیصی آن در یکی از مراکز پرورش سگ اطراف تهران

حمید قاسم‌زاده‌نوا[1*]، سیدعلی آیتی‌نجف‌آبادی[2]، غلامرضا نیکبخت‌بروجنی[3] و ایرج اشرفی‌تمای[4]

[1] دانشیار گروه مامایی و بیماری‌های تولیدمثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[2] دانش‌آموخته دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[3] استاد گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[4] کارشناس گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۹ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۱۲

چکیده

بروسلوز ناشی از *بروسلا ملی‌تنسیس* یکی از بیماری‌های مهم بهداشتی و اقتصادی در ایران است که توجه به آن به عنوان یک بیماری زئونوز بسیار حایز اهمیت می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی وضعیت آلودگی به *بروسلا ملیتنسیس* در یک مرکز پرورش سگ در اطراف تهران و مقایسه روش‌های آزمایشگاهی مختلف برای تشخیص عفونت ناشی از *بروسلا ملیتنسیس* در سگ‌ها و انتخاب بهترین روش(ها) برای تشخیص سریع عارضه بوده است. نمونه‌های خون کامل (برای انجام آزمون PCR و کشت)، سوآب واژن (برای انجام آزمون PCR) و نمونه سرم (برای انجام آزمون‌های سرولوژی رزبنگال، رایت و ۲ مرکاپتواتانول (2ME) از ۱۴ قلاده سگ ماده موجود در یک پرورشگاه سگ اطراف تهران که در آن یک قلاده سگ ماده به علت عفونت با *بروسلا ملیتنسیس* سقط کرده بود، جمع‌آوری شد. افزون بر آن نمونه منی و خون کامل از تنها قلاده سگ نر آن پرورشگاه برای انجام آزمون PCR گرفته شد. کشت تمام نمونه‌های خون منفی بود. در آزمون PCR انجام شده بر روی نمونه‌های خون و سوآب واژن اخذ شده از سگ‌های ماده (۱۴ نمونه) به ترتیب ۷ نمونه (۵۰ درصد) و ۸ نمونه (۵۷/۱ درصد) مثبت مشاهده شد که با استفاده از پرایمرهای طراحی شده گونه به روش مولتی‌پلکس، در تمام موارد *بروسلا ملیتنسیس* تشخیص داده شدند. بر اساس نتایج آزمون سرولوژی از ۱۴ سرم جداسازی شده از سگ‌های ماده برای آزمون غربالگری رزبنگال، هشت نمونه مثبت و در آزمون‌های رایت و ۲ مرکاپتواتانول تنها یک نمونه مثبت مشاهده شد. نتایج حاصله نشان داد که حساسیت و ویژگی نتایج نمونه‌های PCR در نمونه‌های سوآب واژن ۱۰۰ درصد بوده است و عملکرد عالی (ضریب کاپا=۱) بین نتایج آزمون رزبنگال و PCR نمونه‌های سوآب واژن در تشخیص *بروسلا ملیتنسیس* در سگ‌هایی که در مراکز پرورش قرار داشته، وجود دارد. در سگ‌های مشکوک به بیماری بروسلوز توصیه می‌شود ابتدا نمونه‌گیری از خون حیوان جهت انجام تست رزبنگال انجام شود و در صورت مثبت بودن نتیجه، جهت تأیید تشخیص و نیز مشخص کردن سویه *بروسلا*، نمونه سوآب واژن جهت انجام تست PCR اخذ شود.

کلمات کلیدی: *بروسلا ملیتنسیس*، سگ، سرولوژی، PCR، بروسلوز

مقدمه

بروسلوز ناشی از *بروسلا ملیتنسیس* و *بروسلا آبورتوس* یکی از بیماری‌های مهم بهداشتی و اقتصادی در ایران است (Esmaeili et al, 2021). در سگ‌ها بروسلوز اغلب در اثر آلودگی با *بروسلا کنیس* ایجاد می‌شود اما عفونت با سایر

*نویسنده مسئول : حمید قاسم‌زاده‌نوا، دانشیار گروه مامایی و بیماری‌های تولیدمثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
E-mail: hghasem@ut.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

گونه‌های *بروسلا* مانند *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملیتنسیس* نیز ممکن است رخ دهد. این مورد در سگ‌های گله (shepherds) گزارش شده است (Beehan, 2017; Esmaeili et al, 2021; Rezaei-Sadaghiani et al, 1996). از آن جا که سگ‌ها ناقل‌های مکانیکی و بیولوژیکی بیماری هستند و ممکن است عفونت را به سایر حیوانات از جمله نشخوارکنندگان و همچنین انسان منتقل کنند، سگ‌هایی که همراه با گله‌های آلوده نگهداری می‌شوند اغلب به بروسلوز ناشی از *بروسلا ملیتنسیس* مبتلا می‌شوند (Esmaeili et al, 2021; Jamil et al, 2019). افزون بر آن، مصرف احشای نشخوارکنندگان کوچک مانند رحم، بیضه‌ها، طحال و گره-های لنفاوی که ممکن است ارگانیسم در آن‌ها جای گرفته باشد، سبب رخداد عفونت خواهد شد (Esmaeili, 2014). از آن جایی که در ایران سگ‌ها تقریباً همیشه در کنار گله-های نشخوارکنندگان کوچک زندگی می‌کنند و در تماس نزدیک با آن‌ها و انسان هستند (Esmaeili et al, 2021) توجه به این بیماری به عنوان یک بیماری زئونوز بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

اگر چه علایم بالینی بیماری در سگ‌ها معمول نیست و این حیوانات می‌توانند ناقلین بدون علامت باشند، مبتلایان ممکن است سقط جنین، تورم اپیدیدیم و تورم مفاصل را نشان دهند. سقط جنین می‌تواند در فاصله زمانی روزهای ۳۰ تا ۵۷ آبستنی رخ دهد ولی در حدود ۷۵ درصد موارد این اتفاق بین روزهای ۴۵ تا ۵۵ آبستنی رخ می‌دهد. سقط جنین با ترشحات موکوسی، سروزی – خونی، قهوه‌ای یا خاکستری رنگ واژن همراه است (Hollett, 2006; Megid et al, 2010).

بروسلوز سگ‌ها را صرفاً با توجه به علایم بالینی نمی-توان تشخیص داد بنابراین استفاده از روش‌های آزمایشگاهی برای تشخیص قطعی بیماری ضروری است. یکی از روش‌های آزمایشگاهی تشخیص قطعی بیماری، جداسازی و کشت میکروارگانیسم از بافت‌های جنینی سقط شده، ترشحات واژینال و یا خون می‌باشد. کشت باکتری زمان‌بر است و به آزمایشگاه‌های با سطح ۳ امنیت زیستی نیاز دارد زیرا این پاتوژن بر اثر انتقال از طریق آئروسل خطرات بالقوه‌ای را برای سلامتی کارکنان آزمایشگاه ایجاد می‌کند (Sam et al, 2012; Santos et al, 2021; Wallach et al, Wanke, 2004). انواع مختلف روش‌های سرولوژی به منظور تشخیص بیماری وجود دارد که از نظر حساسیت و ویژگی متفاوت است و بسته به مرحله بیماری و آنتی‌ژن یا روش مورد استفاده برای آزمایش، منجر به ایجاد موارد مثبت و منفی کاذب می‌شود. علاوه بر روش‌های ذکر شده فوق، استفاده از روش‌های تشخیص مولکولی همانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) که DNA باکتری را شناسایی می‌کند، در چند سال گذشته افزایش یافته است. این روش سریع‌تر از کشت است و تحت تأثیر زنده ماندن باکتری یا آلودگی نمونه قرار نمی‌گیرد. خون کامل نمونه انتخابی برای انجام این آزمایش است. از نمونه‌های بافتی نیز می‌توان استفاده نمود (Santos et al, 2021; Wanke, 2004).

هدف مطالعه حاضر بررسی وضعیت آلودگی در یک مرکز پرورش سگ در اطراف تهران و متعاقباً مقایسه روش-های آزمایشگاهی مختلف برای تشخیص عفونت ناشی از *بروسلا ملیتنسیس* در سگ‌ها و انتخاب بهترین روش(ها) برای تشخیص سریع عارضه بوده است.

مواد و روش کار

در زمستان سال ۱۳۹۹، یک قلاده سگ ماده ۴ ساله از نژاد ژرمن شپرد از منطقه یافت آباد تهران به بیمارستان تخصصی دام‌های کوچک در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ارجاع داده شد. این سگ روز قبل از مراجعه، توله های خود را پس از گذشت ۵۷ روز از زمان جفت‌گیری به شکل مرده دفع کرد (stillbirth)، با این که زایمان‌های قبلی این حیوان موفقیت‌آمیز گزارش شده بود. پس از گرفتن شرح حال از صاحب حیوان مشخص گردید که ایشان از جفت گوسفندان برای تغذیه سگ‌های پرورشگاه خود استفاده نموده است. در معاینات بالینی این حیوان به جز ترشحات واژن، مورد غیر طبیعی دیگری مشاهده نشد. از

سگ مورد اشاره دو نمونه خون وریدی و نمونه سوآب واژینال تهیه شد. در بررسی آزمایشگاهی نخست، با استفاده از سرم حاصل از نمونه خون فاقد ماده ضد انعقاد، آزمایش رزبنگال برای بررسی وجود پادتن‌های ضد *بروسلا* (*بروسلا آبورتوس، بروسلا ملیتنسیس و بروسلا سوئیس*) انجام شد که نتیجه این تست مثبت بود. سپس DNA گونه بروسلا با انجام تست PCR بر روی نمونه‌های خون کامل و سوآب واژینال شناسایی گردید و مشخص شد عامل بیماری *بروسلا ملیتنسیس* بوده است. به علت آن که *بروسلا ملیتنسیس* بیماری‌زاترین گونه *بروسلا* در انسان است، از سایر سگ‌های نگهداری شده در آن مرکز (۱۴ قلاده سگ ماده با سن ۱۰ ماه تا ۵ سال)، پنج میلی‌لیتر خون وریدی بدون ماده ضد انعقاد برای انجام آزمون‌های سرولوژی (رزبنگال، رایت و (۲ مرکاپتواتانول))، دو میلی‌لیتر خون وریدی حاوی ماده ضد انعقاد سیترات سدیم برای انجام PCR و کشت و نیز نمونه سوآب واژن برای انجام PCR و تعیین مرحله دوره فحلی (سیتولوژی) جمع‌آوری گردید. همچنین، از یک قلاده سگ نری که در آن پرورشگاه نگهداری می‌شد، دو میلی‌لیتر خون وریدی حاوی ماده ضد انعقاد سیترات سدیم و نمونه منی برای انجام PCR گرفته شد. سرم نمونه‌های خون به روش سانتریفیوژ کردن (۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) جداسازی شد (Sharma et al, 2018) و تا زمان آزمون سرولوژی در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری شد.

آزمون سرولوژی

با توجه به مثبت شدن آزمایش رزبنگال در یک قلاده سگ ماده فوق‌الذکر، نخست نمونه‌های سرم (۱۴ نمونه اخذ شده از سگ‌های ماده) از نظر وجود پادتن‌های ضد *بروسلا* با استفاده از آزمون رزبنگال (RBPT) بر روی پلیت غربالگری شدند (Gharekhani and Sazmand, 2019). آنتی‌ژن مورد نیاز برای انجام این آزمون از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی ایران تهیه شد. نمونه سرم‌هایی که آزمون رزبنگال آن‌ها مثبت شده بود، با آزمون‌های تکمیلی رایت به روش لوله‌ای و ۲-مرکاپتواتانول بررسی شدند. به منظور انجام این آزمون‌ها از سرم حیوانات رقت-های ۱/۱۰ تا ۱/۶۴۰ در ۷ لوله تهیه شد. روش انجام این دو آزمون مشابه یکدیگر بود اما در آزمون 2ME به جای سرم فیزیولوژی از بافر ۲-مرکاپتواتانول استفاده گردید (Ghorbani et al, 2013; Sadeghi et al, 2022). مواردی که عیار پادتن در آزمون‌های رایت و ۲-مرکاپتواتانول برابر با ۱۲۴ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر یا بیش‌تر بود، طبق روش‌های استاندارد OIE مثبت در نظر گرفته شد (Alamian and Dadar, 2020).

استخراج DNA از نمونه‌های خون، سوآب واژن و منی

برای استخراج DNA از نمونه‌ها از کیت استخراج DNA شرکت سیناکلون (تهران، ایران) استفاده گردید و DNA استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد.

آزمون PCR برای تشخیص جنس و گونه *بروسلا*

محلول آماده و حاوی بسیاری از اجزای لازم برای تست PCR (PCR Mastermix) از شرکت ویراژن (آمپلیکون، دانمارک) به صورت آماده تهیه شد. آزمون در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتری و با استفاده از ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس آماده، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰پیکومول)، ۳ میکرولیتر از DNA و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر، آماده گردید. پرایمرها، مراحل PCR و نیز برنامه دمایی و زمانی برای جنس بروسلا و گونه های آبورتوس و *ملیتنسیس* در Tables 1 & 2 نشان داده شده است (Sadeghi et al, 2022). از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از سویه‌های مثبت *بروسلا ملیتنسیس* (سویه 16M) و *بروسلا آبورتوس* (سویه ۵۴۴) تهیه شده از کلکسیون میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. مراحل PCR در دستگاه ترموسایکلر TC- 512 تکنو، انگلستان) انجام شد. به منظور خواندن

نتایج PCR، ژل آگارز دو درصد با ولتاژ ۹۰ به مدت ۷۰ دقیقه در بافر TBE 1X الکتروفورز شد. از مارکر ۱۰۰ جفت باز (سیناکلون (Cat. No. SL7031 (PR901644) هم برای تأیید اندازه باندهای اختصاصی استفاده گردید. بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (MR7721C) با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، به صورت باند فلورسنت در دستگاه ترانس ایلومیناتور (بیور، آلمان) مشاهده و ذخیره شد. به منظور تأیید نهایی یکی از موارد مثبت تعیین توالی شده و در بانک ژنی ثبت گردید.

Table 1: Oligonucleotide primer sequences and PCR conditions for Brucella melitensis diagnosis

Primer	Sequence	Molecular weight
B4 B5	F: TGGCTCGGTTGCCAATATCAA R: CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG	223bp
Br.a	F: GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC R: TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	498bp
Br.m	F: AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA R: TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	731bp

Table 3: PCR for detection of Brucella sp. And multiplex PCR for detection of B. abortus and melitensis (temperature and time programes)

Strain	Phase	c°	Time	Cycles
Brucella sp.	Initial denaturation	94	5 min	1
	Denaturation	94	60 sec	
	Annealing	58	45 sec	39
	Extension	72	60 sec	
	Final Extension	72	10 min	1
B. abortus and melitensis	Initial denaturation	94	5 min	1
	Denaturation	94	60 sec	
	Annealing	56	45 sec	34
	Extension	72	60 sec	
	Final Extension	72	2 min	1

کشت از نمونه‌های خون

نمونه‌های خون در محیط انتخابی بروسلا براث همراه با مکمل رشد با آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌میکسین‌ب (۲۵۰۰ واحد بین‌الملل)، باسیتراسین (۱۲۵۰۰ واحد بین‌الملل)، سیکلوهگزامید (۵۰۰۰ میلی‌گرم)، نالیدیکسیک اسید (۲۵۰ میلی‌گرم)، نیستاتین (۵۰۰۰۰ واحد بین‌الملل)، ونکومایسین (۱۰۰۰ میلی‌گرم) (اکسوئید، باسینگ استوک، انگلستان) کشت داده شد و به مدت ۵ روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با دی‌اکسید کربن ۱۰ درصد داخل گرمخانه قرار داده شد. پس از آن به محیط انتخابی بروسلا آگار منتقل گردید و به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با دی‌اکسید کربن ۱۰ درصد نگهداری شد (Dadar et al, 2019).

سیتولوژی واژن

با استفاده از یک سوآب پنبه‌ای و لام میکروسکوپ از مخاط قسمت قدامی واژن اسمیر تهیه گردید و با کمک میکروسکوپ نوری وضعیت جمعیت سلولی آن و مرحله سیکل استروس بررسی شد (Davidson, 2019; Lopate, 2017).

نتایج

نتایج آزمون‌های سرولوژی

از ۱۴ سرم جداسازی شده از سگ‌های ماده برای آزمون غربالگری رزبنگال، هشت نمونه مثبت مشاهده شد که ۳ نمونه آن آگلوتیناسیون با شدت بالا (+۳) را نشان دادند. در آزمون رایت لوله‌ای یک نمونه با عیار پادتن ۳۴ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر، یک نمونه با عیار پادتن ۴۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر، یک نمونه با عیار پادتن ۴۸ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر، یک نمونه با عیار پادتن ۲۱۲ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر و ۴ نمونه نیز بدون عیار پادتن مشاهده شد. در آزمون ۲-مرکاپتواتانول هم ۲ نمونه با عیار پادتن ۳۴ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر، ۱ نمونه با عیار پادتن ۴۸ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر، ۱ نمونه با عیار پادتن ۲۱۲ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر و ۴ نمونه هم بدون عیار پادتن گزارش گردید.

نتایج آزمون PCR

نتایج به دست آمده از این آزمون با استفاده از پرایمرهای B4 و B5 نشان داد که از ۱۴ نمونه خون اخذ شده از سگ‌های ماده، ۷ نمونه (۵۰ درصد) و از ۱۴ نمونه سوآب واژینال، ۸ نمونه (۵۷/۱ درصد) واجد باند ۲۲۳bp بوده که نشان‌دهنده جنس *بروسلا* است (Figure 1). نمونه خون اخذ شده از سگ نر نیز همین نتیجه را نشان داد. در آزمون دوگانه PCR نیز تمامی نمونه‌های مثبت واجد باند ۷۳۱bp بودند که نشان‌دهنده *بروسلا ملیتنسیس* است (Figure 2). نتیجه آزمون PCR نمونه منی اخذ شده از سگ نر، منفی بود.

نتایج کشت

محیط‌های انتخابی بروسلا آگار، پس از یک هفته بررسی شدند. تمامی ۱۴ نمونه خون اخذ شده از سگ‌های ماده از نظر کشت منفی بودند.

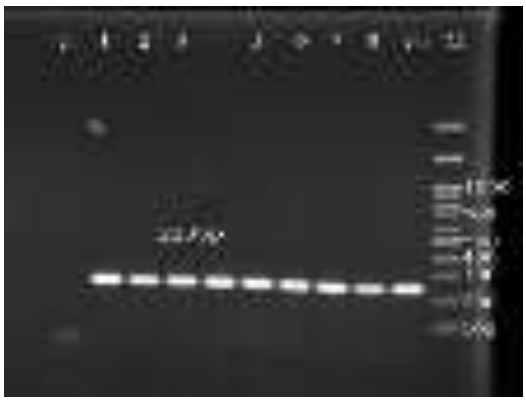

Figure 1: PCR results for identification of *Brucella spp.*

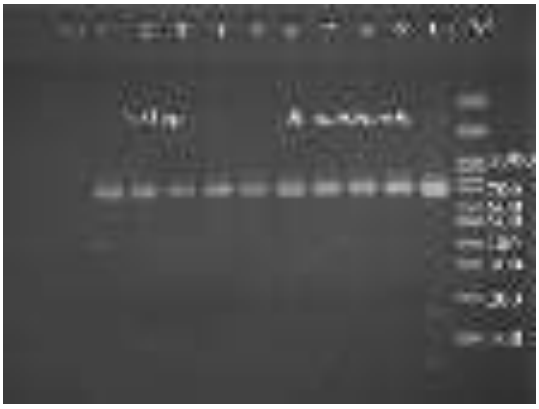

Figure 2: Multiplex PCR results for detection of *B. melitensis.*

سیتولوژی واژن

بررسی اسمیرهای واژن تهیه شده از سگ‌های ماده نشان داد که از هشت قلاده سگی که نتیجه آزمون PCR سوآب واژن آن‌ها مثبت شده بود، یک قلاده در مرحله پرواستروس، دو قلاده در مرحله دی‌استروس و پنج قلاده در مرحله آنستروس سیکل استروس قرار داشتند. تمامی مواردی که نتیجه آزمون PCR سوآب واژن آن‌ها منفی شده بود (۶ مورد)، در مرحله آنستروس چرخه فحلی بودند. نتایج کلی آزمون‌های انجام شده بر روی نمونه‌های اخذ شده از سگ‌های ماده در Table 3 نشان داده شده است.

Table 3: Results of blood, vaginal swab samples and vaginal cytology for antigen detection of Brucella infection of kennel dogs

Sample	Blood Culture	RBPT	Wright	2ME	Blood PCR	Vaginal swab PCR	Vaginal cytology
1	-	+	-	-	+	+	anestrus
2	-	+	34	34	-	+	proestrus
3	-	-	-	-	-	-	anestrus
4	-	+++	212	212	+	+	diestrus
5	-	+++	48	48	+	+	diestrus
6	-	++	-	-	+	+	anestrus
7	-	-	-	-	-	-	anestrus
8	-	-	-	-	-	-	anestrus
9	-	+	-	-	+	+	anestrus
10	-	-	-	-	-	-	anestrus
11	-	+++	40	34	+	+	anestrus
12	-	-	-	-	-	-	anestrus
13	-	++	-	-	+	+	anestrus
14	-	-	-	-	-	-	anestrus

برای محاسبه حساسیت، ویژگی، ارزش پیشگویی مثبت، ارزش پیشگویی منفی و ضریب کاپا، نتایج حاصل از تست-های مختلف تشخیصی با آزمون رزبنگال به عنوان استاندارد طلایی مقایسه شدند. نتایج Table 4 نشان می‌دهد که با وجود بالا بودن درصد ویژگی و ارزش پیشگویی مثبت دو آزمون رایت و ۲-مرکاپتواتانول ، حساسیت این آزمون پایین است. ضمناً ضریب کاپا منفی (۰/۵-) نشان می‌دهد که عملکرد این دو آزمون مناسب نیست و برای ردیابی *بروسلا ملی‌تنسیس* قابلیت ندارد.

Table 4: Results of absolute and relative frequency of samples in Rose-Bengal, Wright and 2-ME tests in a kennel dog in suburb of Tehran- Iran

RBPT / Wright & 2ME	Positive		Negative		Total	
	Frequency	%	Frequency	%	Frequency	%
Positive	1	12.5	0	0	1	7.1
Negative (& Suspected)	7	87.5	6	100	13	92.9
Total	8	100	6	100	14	100

Se (Sensitivity) = 12.5% Sp (Specificity) = 100% PPV (Positive Predictive Value) = 100%
NPV (Negative Predictive Value) = 46.2%
Kappa Coefficient= -0.5

نتایج Table 5 نشان می‌دهد که حساسیت، ویژگی و ارزش پیشگویی مثبت و منفی آزمون PCR خون این آزمون بالا است. ضمناً ضریب کاپا ۰/۸۶ نشان می‌دهد که عملکرد این تست عالی است و برای ردیابی *بروسلا ملیتنسیس* قابلیت بالایی دارد.

Table 5: Results of absolute and relative frequency of samples in Rose-Bengal and blood PCR tests in a kennel dog in suburb of Tehran- Iran

RBPT / Blood PCR	Positive		Negative		Total	
	Frequency	%	Frequency	%	Frequency	%
Positive	7	87.5	0	0	7	50
Negative (& Suspected)	1	12.5	6	100	7	50
Total	8	100	6	100	14	100

Se (Sensitivity) = 87.5% Sp (Specificity) = 100% PPV (Positive Predictive Value) = 100%
NPV (Negative Predictive Value) = 85.7%
Kappa Coefficient= 0.86

نتایج Table 6 نشان می‌دهد که حساسیت، ویژگی و ارزش پیشگویی مثبت و منفی آزمون PCR نمونه‌های سوآب واژن ۱۰۰ درصد است. ضمناً ضریب کاپا ۱ نشان می‌دهد که عملکرد این تست عالی است و برای ردیابی *بروسلا ملیتنسیس قابلیت* بالایی دارد.

Table 6: Results of absolute and relative frequency of samples in Rose-Bengal and Vaginal swab PCR tests in a kennel dog in suburb of Tehran- Iran

RBPT / Vaginal swab PCR	Positive		Negative		Total	
	Frequency	%	Frequency	%	Frequency	%
Positive	8	100	0	0	8	57.1
Negative (& Suspected)	0	0	6	100	6	42.9
Total	8	100	6	100	14	100

Se (Sensitivity) = 100% Sp (Specificity) = 100% PPV (Positive Predictive Value) = 100%
NPV (Negative Predictive Value) = 100%
Kappa Coefficient= 1

بحث

بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی مشترک بین انسان و دام است که اهمیت جهانی دارد. بسیاری از گونه‌های *بروسلا* قادر به آلوده کردن انسان هستند. در حال حاضر *بروسلا ملیتنسیس*، *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا سوئیس* همچنان به عنوان عامل اصلی بیماری بروسلوز در انسان در سراسر جهان در نظر گرفته می‌شود. از میان این عوامل *بروسلا ملیتنسیس* بیماری‌زاترین گونه *بروسلا* در انسان است و بیماری ناشی از آن نیز شدیدتر می‌باشد (Al Jindan, 2021; Golshani & Buozari, 2017; Lingam et al, 2020; Zhu et al, 2020). در مطالعه حاضر، بررسی وضعیت آلودگی در یک مرکز پرورش سگ در اطراف تهران همراه با مقایسه روش‌های آزمایشگاهی مختلف برای تشخیص عفونت با *بروسلا ملیتنسیس* در سگ‌ها مورد مقایسه قرار گرفته است.

در مطالعه‌ای که به منظور مقایسه روش PCR سوآب واژن با PCR خون در تشخیص عفونت با *بروسلا کنیس* انجام شده بود، نشان داده شد که در ۱۹ قلاده از ۶۷ قلاده سگ مشکوک به عفونت، که نتایج کشت میکروبی خون و سوآب واژن آن‌ها منفی بوده است، نتیجه PCR سوآب واژن مثبت بوده در حالی که نتیجه آزمون PCR خون منفی بوده است (Keid et al, 2007a). بر اساس نتایج مطالعه اخیر نشان داده شد که آزمون PCR سوآب واژن تست مناسبی

برای تأیید تشخیص بروسلوز در سگ‌های مشکوک به عفونت، به ویژه آن‌هایی که نتیجه PCR خون آن‌ها منفی شده، است. با توجه به این که حضور باکتری *بروسلا* در خون دوره‌ای است و در عفونت‌های مزمن کاهش می‌یابد، نتایج PCR نمونه خون به این بستگی دارد که حیوان در فاز باکتریمی است یا خیر و آیا عفونت مزمن است یا خیر. علاوه بر آن، نتایج PCR نمونه خون ممکن است تحت تأثیر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها قرار بگیرد (Mol et al, 2020). بر خلاف نتایج مطالعه اخیر، مطالعه حاضر نشان داد که از ۸ مورد مثبت PCR در نمونه‌های سیتولوژی واژن، ۷ نمونه از نظر PCR نمونه‌های خون مثبت بوده‌اند (Table 5) و تنها یک نمونه منفی بوده است. در توجیه این تفاوت می‌توان گفت که احتمالاً فاصله زمان ابتلا به *بروسلا* و زمان نمونه‌گیری از سگ‌ها در مطالعه اخیر طولانی‌تر از مطالعه حاضر بوده (مزمن بودن بیماری در این سگ‌ها) و سرعت پاک شدن *بروسلا* در خون سریع‌تر از مخاطات می‌باشد و لذا عامل این بیماری در زمان نمونه‌گیری از خون پاک شده بود. بنابراین با توجه به حساسیت و ویژگی بالای این تست و نیز ضریب کاپا معادل ۰/۸۶ در نتایج مطالعه حاضر، می‌توان از آن در تشخیص *بروسلا ملیتنسیس* در سگ بهره گرفت.

در مطالعه حاضر نتیجه آزمون PCR بر روی نمونه منی اخذ شده از سگ نر منفی گردید. این در حالی است که در آزمون PCR خون این حیوان، *بروسلا ملی‌تنسیس* تشخیص داده شده بود. در مطالعات مختلف *بروسلا ملیتنسیس* به وسیله آزمون PCR بر روی نمونه منی گاو، گاومیش و قوچ شناسایی شده است (Amin et al, 2001; Dehkordi et al, 2014; Kaushik et al, 2006). *بروسلا کنیس* نیز در مطالعات مختلف از نمونه منی سگ‌ها به وسیله آزمون PCR تشخیص داده شده است (Keid et al, 2007b; Kim et al, 2006; Volkweis et al, 2018). ارزیابی منی توسط PCR برای تشخیص بروسلوز، قبل از اقدام به جفت‌گیری حیوان نر و ماده و نیز انجام تلقیح مصنوعی، بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Keid et al, 2007b). در مطالعه حاضر از آن جایی که عامل ایجاد کننده عفونت *بروسلا ملیتنسیس* بود، با انجام آزمون PCR بر روی نمونه منی سگ نر، نتیجه آن منفی شد. توضیح آن که تا کنون گزارشی مبنی بر جدا شدن *بروسلا ملیتنسیس* از منی سگ نر وجود ندارد و احتمالاً این پاتوژن بر خلاف *بروسلا کنیس* نمی‌تواند وارد دستگاه تناسلی سگ نر شود. با این حال به نظر می‌رسد که مطالعات تجربی برای بررسی حضور انواع سویه‌های *بروسلا* (علاوه بر نوع کنیس) در منی سگ مورد نیاز است.

اگر چه استاندارد طلایی برای تشخیص *بروسلا* روش کشت است، اما به دلیل زمان‌بر بودن و خطرناک بودن این روش، به علاوه وجود نتایج منفی در کشت به دلایل مختلف از جمله دوره‌های متناوب باکتریمی، نیاز به محیط‌های کاملاً اختصاصی مانند محیط‌های دی‌فازیک و کاستاندا، سخت رشد بودن باکتری، وجود آلودگی‌های ثانویه در نمونه‌ها، به کارگیری محیط‌ها و روش‌های نامناسب، مقدار کم باکتری در خون و زنده نبودن باکتری جزء معایب این روش به شمار می‌رود (Volkweis et al, 2018). در مطالعه حاضر، نتایج کشت از نمونه‌های خون همگی منفی گزارش شدند که پایین بودن مقدار باکتری در نمونه، زنده نبودن ارگانیسم و میل باکتری *بروسلا* به حضور در داخل سلول می‌تواند از دلایل منفی شدن آن باشد. این در حالی است که در این مطالعه استفاده از روش‌های دیگر مثل PCR، نتایج متفاوتی را به دنبال داشته است. مطالعات مختلف نیز متفاوت بودن نتایج حاصل از کشت باکتری و سایر روش‌ها مثل PCR و سرولوژی را نشان داده‌اند (Gupta et al, 2006; Ilhan et al, 2008; Sharma et al, 2018). در مطالعه Alikhani و همکاران در سال ۲۰۱۳، نشان داده شد که برای تشخیص بروسلوز در انسان، روش PCR خون حساسیت و ویژگی بالاتری در مقایسه با روش کشت خون دارد. در مطالعه اخیر، از ۱۱ نمونه مثبت PCR خون، ۷ نمونه در محیط کشت جداسازی شده بود. در مطالعه Keid و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز نشان داده شد که در ۲۵ قلاده سگی که نتایج PCR خون و یا اسمیر واژن

آن‌ها از نظر *بروسلا* مثبت شده بود، نتایج کشت خون منفی بوده است.

از دیگر نتایج مورد توجه مطالعه حاضر که برای اولین بار اعلام می‌شود، تست مثبت PCR از نمونه سوآب واژن در تمامی مراحل سیکل فحلی (پرواستروس، استروس، دی‌استروس و آنستروس) سگ می‌باشد (Table 3). این به آن معناست که محدودیتی از نظر نمونه‌گیری در فازهای مختلف سیکل فحلی برای انجام تست PCR این باکتری وجود ندارد که خود تأیید دیگری بر استفاده از نمونه سوآب واژن به عنوان یک تست مطلوب با کارایی بالا در تشخیص *بروسلا ملیتنسیس* است. نکته قابل توجه این که برای جدا کردن باکتری *تایلورلا اکویی‌جنیتالیس* در مادیان مشکوک به این عفونت، بهترین زمان نمونه‌گیری از ترشحات دستگاه تناسلی، فاز استروس می‌باشد چرا که در سایر فازها احتمال منفی کاذب وجود دارد (McKinnon et al, 2011).

تشخیص بروسلوز با روش‌های سرولوژی مانند رزبنگال، رایت و ۲ مرکاپتواتانول از قدیم مورد توجه بوده است. موارد مثبت کاذب ممکن است به علت وجود آنتی-ژن‌های مشترک برخی از باکتری‌ها با *بروسلا* مانند *یرسینیا انتروکولیتیکا*، *بوردتلا برونشی‌سپتیکا* و *سالمونلا* ایجاد شوند (Gall and Nielsen, 2004; Ilhan et al, 2008). در مواردی نیز مانند اوایل بیماری، زمان زایمان، وجود نقص سیستم ایمنی و تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها، نتایج منفی کاذب مشاهده می‌شود (Quinn et al, 2011). مطالعات مختلفی روش‌های سرولوژی و مولکولی را در تشخیص بروسلوز در حیوانات مختلف با یکدیگر مقایسه نموده‌اند. در مطالعه Mol و همکاران در سال ۲۰۲۰، نتیجه آزمون رزبنگال همراه با ۲-مرکاپتواتانول سگ‌های آلوده به بروسلا کنیس که در آزمون PCR خون نتیجه مثبت را نشان داده بودند، منفی شد. در مطالعه Al-Garadi و همکاران در سال ۲۰۱۱، نشان داده شد که حساسیت آزمون PCR برای تشخیص *بروسلا ملیتنسیس* در بزها بیش‌تر از آزمون رزبنگال می‌باشد اما ویژگی آن کم‌تر است. در مطالعه Talebkhan-Garoussi و همکاران در سال ۱۹۹۷ آلودگی به بروسلا در سگ‌های گله گاوداری‌های مشهد و نیز در سال ۲۰۱۸ آلودگی با *بروسلا* در گربه توسط آزمون‌های سرولوژی (رزبنگال، رایت و ۲-مرکاپتواتانول) در گربه‌های ولگرد و گربه‌های موجود در گاوداری‌ها و نیز مراکز پرورش گوسفند در اطراف مشهد نشان داده شد. در این مطالعه گربه‌های خانگی از نظر تیتر سرمی *بروسلا* منفی اما سگ‌های موجود در مراکز پرورش سنتی گوسفند، آلوده به بروسلا *ملیتنسیس* بودند. این موضوع اهمیت بهداشت در عدم آلودگی حیوانات خانگی را نشان می‌دهد.

در مطالعه حاضر در مواردی که نتیجه آزمون PCR سوآب واژن مثبت شده بود، نتیجه آزمون رزبنگال نیز مثبت شد. بنابراین حساسیت و ویژگی این دو آزمون در این مطالعه با یکدیگر برابر است (Table 6). سایر تست‌های سرولوژی نتایج متفاوتی با نتیجه آزمون PCR سوآب واژن داشته‌اند. برابر نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، فقط در یک مورد از مواردی که آزمون رزبنگال آن‌ها مثبت شده بود، عیار پادتن در آزمون‌های رایت و ۲-مرکاپتواتانول از ۱۲۴ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر بیش‌تر شده بود و مثبت در نظر گرفته شد. مواردی که در آزمون رایت سگ‌ها عیار پادتن ۴۰ و ۴۸ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر بود، به عنوان مورد مشکوک تفسیر شدند و تنها موردی که در آزمون رایت و ۲-مرکاپتواتانول آن عیار پادتن ۳۴ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر بود، منفی در نظر گرفته شد. عیار پادتن به دست آمده در آزمون رایت مربوط به IgM و IgG می‌باشد، در حالی که در آزمون ۲-مرکاپتواتانول که از بافر ۲-مرکاپتواتانول استفاده می‌شود، مولکول‌های IgM از بین می‌روند و تنها IgG اندازه‌گیری می‌شود. بنابراین هم‌اندازه بودن عیار پادتن در آزمون رایت و ۲-مرکاپتواتانول) بیان‌گر این موضوع است که تمام ایمونوگلوبولین‌های موجود در نمونه IgG بوده است و بیماری یک بیماری مزمن می‌باشد (Hajia, 2018). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دو تست آزمایشگاهی رایت و ۲-مرکاپتواتانول) برای تشخیص *بروسلا ملیتنسیس* در سگ، از حساسیت مطلوبی برخوردار

نیستند و ضریب کاپا معادل ۰/۵- نشان می‌دهد که عملکرد این دو تست مناسب نیست و برای ردیابی *بروسلا ملیتنسیس* قابلیت ندارد.

با توجه به نتایج به دست آمده از تست‌های مختلف در این مطالعه پیشنهاد می‌گردد که در سگ‌های مشکوک به بیماری بروسلوز، ابتدا نمونه‌گیری از خون حیوان جهت تست رزبنگال انجام شود و در صورت مثبت بودن نتیجه، جهت تأیید تشخیص و نیز مشخص کردن سویه *بروسلا*، نمونه سوآب واژن جهت انجام تست PCR اخذ شود. در ضمن، از آن جایی که برای مثبت شدن کشت نمونه خون باید حیوان در فاز حاد بیماری باشد و به دلیل آن که ممکن است مدت زمان زیادی از شروع درگیری گذشته باشد (حالت مزمن بیماری) و اطلاعاتی از زمان شروع بیماری در دسترس نباشد و از طرفی به علت آن که انجام کشت خون زمان‌بر است، این روش تشخیصی جزء اولویت‌های تشخیص بیماری بروسلوز در سگ نمی‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی که در این تحقیق مشارکت فعال داشته‌اند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. همچنین از سرکار خانم دکتر شمس‌الملوک خواجه‌نصیری (بنیان‌گذار نخستین آزمایشگاه دامپزشکی کشور) به خاطر همکاری بی‌منتشان در انجام برخی آزمایشات تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

منابع مالی

هزینه‌های انجام آزمایشات از گرنت اساتید مشارکت کننده در پژوهش پرداخت شده است.

منابع

Al-Garadi, M. A., Khairani-Bejo, S., Zunita, Z., Omar, A. R. (2011). Detection of *Brucella melitensis* in blood samples collected from goats. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(11), 1437-1444. doi: 10.3923/javaa.2011.1437.1444

Al Jindan, R. (2021). Scenario of pathogenesis and socioeconomic burden of human brucellosis in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(1), 272-279. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.09.059

Alamian, S., & Dadar, M. (2020). Brucella melitensis infection in dog: a critical issue in the control of brucellosis in ruminant farms. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *73*, 101554. doi: 10.1016/j.cimid.2020.101554

Alikhani, M. Y., Hashemi, S. H., Naseri, Z., Farajnia, S., Peeri, D. H. (2013) Diagnosis of human brucellosis by blood culture (BACTEC) and PCR method via whole blood and serum. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(3), 248-251. doi: 10.5812/jjm.5073

Amin, A. S., Hamdy, M. E., & Ibrahim, A. K. (2001). Detection of Brucella melitensis in semen using the polymerase chain reaction assay. *Veterinary microbiology*, *83*(1), 37-44. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00401-1

Beehan D. P. (2017) Brucellosis. In S. J, Ettinger, E. C, Feldman, E, Cote (Eds.). *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (8th ed., pp. 2290-2294). Elsevier Saunders. Philadelphia, USA.

Dadar, M., Alamian, S., Behrozikhah, A. M., Yazdani, F., Kalantari, A., Etemadi, A., & Whatmore, A. M. (2019). Molecular identification of Brucella species and biovars associated with animal and human infection in Iran. *Veterinary research forum*, 10(4), 315-321. doi: 10.30466/VRF.2018.89680.2171

Davidson A. P. (2019) The practice of theriogenology. In R. W, Nelson, C. G, Couto (Eds.). *Small animal internal medicine* (6th ed., pp. 935-952). Elsevier. Amsterdam.

Dehkordi, F. S., Khamesipour, F., & Momeni, M. (2014). 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 Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 20(6), 821-828. doi: 10.9775/kvfd.2014.10827

Esmaeili, H., Mahdavi, A. S, Hamedi, M. (2021). Efficacy of Rev-1 Vaccine Against *Brucella melitensis* Infection in Dog. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 15(4), 387-394. doi: 10.22059/IJVM.2021.309899.1005126

Esmaeili, H. (2014). Brucellosis in Islamic republic of Iran. *Journal of medical bacteriology*, *3*(3-4), 47-57.

Gall, D., & Nielsen, K. (2004). Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Revue scientifique et technique*, *23*(3), 989-1002. doi: 10.20506/rst.23.3.1545

Gharekhani, J., & Sazmand, A. (2019). Detection of Brucella antibodies in dogs from rural regions of Hamedan, Iran. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, *6*(4), 122-126. doi: 10.34172/ajcmi.2019.22

Ghorbani, A., Rabbani Khorasgani, M., Zarkesh-Esfahani, H., Sharifiyazdi, H., Kashani, A. D., & Emami, H. (2013). Comparison of serology, culture, and PCR for detection of brucellosis in slaughtered camels in Iran. *Comparative Clinical Pathology*, *22*, 913-917. doi: 10.1007/s00580-012-1499-1

Golshani, M., & Buozari, S. (2017). A review of brucellosis in Iran: epidemiology, risk factors, diagnosis, control, and prevention. *Iranian biomedical journal*, *21*(6), 349. doi: 10.18869/acadpub.ibj.21.6.349

Gupta, V. K., Verma, D. K., Rout, P. K., Singh, S. V., & Vihan, V. S. (2006). Polymerase chain reaction (PCR) for detection of Brucella melitensis in goat milk. *Small Ruminant Research*, *65*(1-2), 79-84. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.05.024

Hajia, M. (2018). The Challenges in Diagnosis of Brucellosis Serological Tests and Available Approaches. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, *12*(1), 1-5.

Hollett, R. B. (2006). Canine brucellosis: outbreaks and compliance. *Theriogenology*, *66*(3), 575-587. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.04.011

Ilhan, Z., Boynukara, B., Solmaz, H., Ekin, I. H., Aksakal, A., & Gulhan, T. (2008). Detection of Brucella melitensis DNA in the milk of sheep after abortion by PCR assay. *Archivos de medicina veterinaria*, *40*(2), 141-146. doi: 10.4067/S0301-732X2008000200005

Jamil, T., Melzer, F., Khan, I., Iqbal, M., Saqib, M., Hammad Hussain, M., ... & Neubauer, H. (2019). Serological and molecular investigation of Brucella species in dogs in Pakistan. *Pathogens*, *8*(4), 294. doi: 10.3390/pathogens8040294

Kaushik, P., Singh, D. K., Tiwari, A. K., & Kataria, R. S. (2006). Rapid detection of Brucella species in cattle semen by PCR. *Journal of Applied Animal Research*, *30*(1), 25-28. doi: 10.1080/09712119.2006.9706818

Keid, L. B., Soares, R. M., Vasconcellos, S. A., Chiebao, D. P., Salgado, V. R., Megid, J., & Richtzenhain, L. J. (2007a). A polymerase chain reaction for detection of Brucella canis in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology*, *68*(9), 1260-1270. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.08.021

Keid, L. B., Soares, R. M., Vasconcellos, S. A., Chiebao, D. P., Megid, J., Salgado, V. R., & Richtzenhain, L. J. (2007b). A polymerase chain reaction for the detection of Brucella canis in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology*, *67*(7), 1203-1210. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.01.003

Keid, L. B., Soares, R. M., Vasconcellos, S. A., Megid, J., Salgado, V. R., & Richtzenhain, L. J. (2009). Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Research in veterinary science*, *86*(1), 22-26. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.05.012

Kim, S., Lee, D. S., Suzuki, H., & Watarai, M. (2006). Detection of Brucella canis and Leptospira interrogans in canine semen by multiplex nested PCR. *Journal of Veterinary Medical Science*, *68*(6), 615-618. doi: 10.1292/jvms.68.615

Lingam, G. S., Kumar, A. V., Singh, S., Kumar, M. S., & Krishnaiah, N. (2020). Sero occurence of brucellosis in dogs of Telangana state. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, *9*, 452-455.

Lopate, C. (2017) Vaginoscopy and vaginal cytology in Dogs. In S. J, Ettinger, E. C, Feldman, E, Cote (Eds.). *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (8th ed., pp. 1263-1269). Elsevier Saunders. Philadelphia, USA.

McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W.E., Varner, D. D. (2011). *Equine Reproduction* (2nd ed.). Wiley-Blackwell. New Jersey, USA.

Megid, J., Mathias, L. A., & Robles, C. A. (2010). Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. *The Open Veterinary Science Journal*, 4, 119-126. doi: 10.2174/1874318801004010119

Mol, J. P., Guedes, A. C., Eckstein, C., Quintal, A. P., Souza, T. D., Mathias, L. A., ... & Santos, R. L. (2020). Diagnosis of canine brucellosis: comparison of various serologic tests and PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *32*(1), 77-86. doi: 10.1177/1040638719891083

Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S., & Fitzpatrick, E. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease* (2nd ed.). Wiley-Blackwell. New Jersey, USA.

Rezaei-Sadaghiani, R., Zowghi, E., Marhemati-Khamene, B., Mahpeikar, H. A. (1996). *Brucella melitensis* infection in sheep-dogs in Iran. *Arch Razi Inst*, 46(47), 1-7. doi: 10.22092/ARI.1996.109149

Sadeghi, H., Ashrafi Tamai, I., Vodjgani, M., Gharagozlou, F., Zahraei Salehi, T. (2022). Isolation and Identification of *Brucella melitensis* Biovar 1 using Bacteriological, Serological, and Molecular Tools from Saanen Goats (*Capra aegagrus hircus*) in Alborz, *Iranian Journal of Veterinary Research*, 77(2), 107-115. doi: 10.22059/jvr.2021.318798.3133

Sam, I. C., Karunakaran, R., Kamarulzaman, A., Ponnampalavanar, S., Omar, S. S., Ng, K. P., ... & AbuBakar, S. (2012). A large exposure to Brucella melitensis in a diagnostic laboratory. *Journal of Hospital Infection*, *80*(4), 321-325. doi: 10.1016/j.jhin.2011.12.004

Santos, R. L., Souza, T. D., Mol, J. P., Eckstein, C., & Paíxão, T. A. (2021). Canine brucellosis: an update. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*, 594291. doi: 10.3389/fvets.2021.594291

Sharma, D., Bhardwaj, B., Chouhan, H., Chandel, B., Joseph, B., & Barolia, S. (2018). Isolation and molecular characterization of Brucella melitensis from abortion storms in sheep with its zoonotic implications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(10), 1348-1356. doi: 10.20546/ijcmas.2018.710.150

Talebkhan-Garoussi, M., Mehrzad, J., Baniassadi, A., Khoshnegah, J. (2018). Seroprevalence of brucellosis in different kinds of feline population in north-east of Iran. *Comp Clin Pathol*, 27, 1155–1160. doi: 10.1007/s00580-018-2714-5

Talebkhan Garroussi, M. Firoozi, S., Nowrozian. I. (1997). The serological survey of Brucella abortus and melitensis in shepherd dogs around Mashhad farms. Journal of Faculty of Veterinary Medicine. University of Tehran. (Abstract in English). 51, 3&4: 63-72

Volkweis, F. S., Cavalcanti, L. C., Blume, H., Júnior, H. L. S., Lazzari, A., & Mulinari, F. (2018). Detection of Brucella canis in blood, urine and seminal fluid of a naturally infected dog by PCR. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, *40*(1), e002718-e002718. doi: 10.29374/2527-2179.bjvm002718

Wallach, J. C., Giambartolomei, G. H., Baldi, P. C., & Fossati, C. A. (2004). Human infection with M-strain of Brucella canis. *Emerging infectious diseases*, *10*(1), 146. doi: 10.3201/eid1001.020622

Wanke, M. M. (2004). Canine brucellosis. *Animal reproduction science*, *82*, 195-207. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.05.005

Zhu, X., Zhao, Z., Ma, S., Guo, Z., Wang, M., Li, Z., & Liu, Z. (2020). Brucella melitensis, a latent "travel bacterium," continual spread and expansion from Northern to Southern China and its relationship to worldwide lineages. *Emerging Microbes & Infections*, *9*(1), 1618-1627. doi: 10.1080/22221751.2020.1788995

Received: 28.02.2023
Accepted: 03.07.2023

Vol. 19, No. 4, Winter, 2024 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2023.387783.2563

Investigating the status of *Brucella melitensis* contamination and comparing different molecular and non-molecular diagnosis methods in one of Kennel dogs in suburb of Tehran- Iran

Hamid Ghasemzadeh-nava[1*], Seyed Ali Ayati Najafabadi[2], Gholamreza Nikbakht Brujeni[3] and Iradj Ashrafi Tamai[4]

[1] Associate Professor, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[2] DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[3] Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[4] Expert, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 28.02.2023 Accepted: 03.07.2023

Abstract

Brucellosis caused by *Brucella melitensis* is one of the important health and economic diseases in Iran is very important to pay attention to it as a zoonotic disease. The aim of the study was to investigate *B. melitensis* infection in a kennel dog and also to compare different laboratory methods to diagnose *Brucella melitensis* infection in dogs. In this study, the whole blood samples (for PCR and culture), vaginal swabs samples (for PCR tests) and serum samples (for Rose Bengal, Wright and 2 mercaptoethanol tests) were obtained from 14 bitches at a kennel, in which a bitch had been aborted due to *Brucella melitensis* infection. Also, the whole blood sample and semen sample were obtained from the only male dog of this kennel for PCR test. Finally, the data obtained from these tests were analyzed by calculating the sensitivity and specificity as well as the Kappa coefficient. Bacteriological culture results of all blood samples were negative. The PCR results of seven blood samples (%50) and eight vaginal swab samples (%57.1) obtained from 14 bitches were positive. By using PCR primers, *B. melitensis* were identified in all positive samples. In the serological test, out of 14 sera obtained from bitches for the Rose Bengal screening test, eight positive samples were observed, but only one positive sample was observed in Wright and 2 mercaptoethanol tests. The results showed that the sensitivity and specificity of PCR test in vaginal swab samples was 100% and there is an excellent performance (kappa coefficient = 1) between the results of the Rose Bengal test and PCR of vaginal swab samples in the diagnosis of *Brucella melitensis* in dogs. In dogs suspected of brucellosis, at first it is recommended to take a sample of the animal's blood to perform the Rose Bengal test, and if the result is positive, to confirm the diagnosis and to determine the strain of *Brucella*, then a vaginal swab sample should be taken to perform the PCR test.

Key words: *Brucella melitensis*, Dog, Serology, PCR, Brucellosis

[*] **Corresponding Author**: Hamid Ghasemzadeh-nava, Associate Professor, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
E-mail: hghasem@ut.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).