Qom University of Medical Sciences Journal

2023. Volume 17

Research Paper

Detection of *Brucella militensis* in the Serum of Patients Suspected of Brucellosis by the *Omp31* Gene Amplification, Compared to the Serological Diagnostic Tests

Atefeh Aboutalebi[1], *Maryam Mohammadi-Sichani[1], Nafisehsadat Naghavi[1]

1. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Aboutalebi A, Mohammadi-Sichani M, Naghavi1 N . [Detection of Brucella militensis in the Serum of Patients Suspected of Brucellosis by the Omp31 Gene Amplification, Compared to the Serological Diagnostic Tests (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2023; 17:E?. https://doi.org/10.32598/qums.17.44.4

https://doi.org/10.32598/qums.17.44.4

Received: 2022/12/9

Accepted: 2023/03/25

Available Online: ???

Keywords:
Brucellosis, *Brucella millitensis*, Molecular diagnostic techniques, *Omp31* gene, Serological tests

ABSTRACT

Background and Objectives: Brucellosis is one of the most common infectious diseases with a global spread. It has a high prevalence in Iran. This study aims to diagnose brucellosis caused by *Brucella melitensis* in the serum of patients by the amplification of *omp31* gene, compared to the serological tests.

Methods Blood samples were collected from 200 people suspected of brucellosis. The samples were evaluated by serological tests including Rose Bengal test, Wright test, Coombs-Wright test, gel agglutination test, and 2-mercaptoethanol (2ME) test. DNA extraction was done by the phenol/chloroform extraction method. Molecular detection with polymerase chain reaction (PCR) method was done using the specific primers of the *Omp31* gene. Data were analyzed in SPSS software, version 23 using the analysis of variance.

Results Of 200 patients, 122 were female and 78 were male with a mean age of 45.17±17.43 years. The results of PCR test for the *omp31* gene were positive in 14.5% of cases, which was consistent with the results of serological tests (13.8%). The sensitivity of Wright, Coombs-Wright, 2ME, and gel agglutination tests, compared to PCR, was 89.7, 75.9, 55.2 and 55.2%, respectively. Most of the affected people were housekeepers (41.5%) and urban residents (75.5%). Muscle pain (68%) and leg pain (62.3%) were the most common symptoms. Consumption of non-pasteurized dairy products was the highest risk factor (17%).

Conclusion The diagnosis of brucellosis by the *omp31* gene amplification has higher sensitivity and accuracy compared to the serological tests. Considering the importance of rapid and timely diagnosis of brucellosis to control its clinical complications, the molecular diagnosis method is recommended as a diagnostic method.

**** Corresponding Author:***

Maryam Mohammadi-Sichani, PhD.

Address: Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Tel: +98 (913) 3092823

E-Mail: ma.mohammadi1347@iau.ac.ir & mohammadis_m@yahoo.com

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Introduction

Brucellosis is a widespread zoonotic disease transmitted from animals to humans. Although it cannot be transmitted from human to human, it can be acquired through direct contact with infected animals or consumption of unpasteurized and raw dairy products. Different species of Brucella can cause disease in humans, but the most prevalent one is *Brucella melitensis*. Blood culture is considered the gold standard for the laboratory diagnosis of brucellosis, but it has limitations such as requiring specialized culture media, level 3 biological safety, and trained personnel, and has a high false negative rate. Alternative diagnostic methods are serological tests, such as Rose Bengal, serum agglutination, and Coombs test, which are based on the reaction of antibodies against the smooth lipopolysaccharide of the bacterial wall. However, these tests can produce false positive results. Molecular detection techniques have shown to be effective in detecting *Brucella* species. Brucella-specific proteins, especially the third group of outer membrane proteins, including Omp25 and Omp31, have been used in serological and molecular tests. The Omp31 protein is highly conserved in *Brucella* species and plays an essential role in stimulating CD8+ T and CD4+ T cells, with its antibody against *B. melitensis* detected in infected individuals. Using purified and recombinant Omp31 protein, it is possible to detect B. melitensis in the serum of humans and animals with brucellosis using an ELISA kit. The present study aims to use the gene encoding *Omp31* for specific molecular detection of *B. melitensis* in the serum of patients.

Methods

Participants were 200 people suspected of having brucellosis, who had been referred to medical diagnostic laboratories in Isfahan, Iran. After completing a questionnaire and consent form, blood samples were divided into two separate tubes, one with heparin for polymerase chain reaction (PCR) and one without heparin for serum separation and serological tests. Molecular detection using PCR was performed with specially designed primers for precise and final identification of Brucella. DNA extraction was carried out using the phenol/chloroform extraction method. Primers were designed using the *Omp31* gene sequence from *B. melitensis* bacterium with accession number NG-021140.1 obtained from the NCBI database, and synthesized with a melting temperature of 54 degrees Celsius. The forward (5'-GTGGTGTTCAGGCCGGTTAC-3') and reverse (5'-CGCAGACTTGACCTTACCATAG-3') primers were used.

Results

This study examined 200 blood samples from 122 women and 78 men with a mean age of 45.17±17.43 years. Brucellosis was most prevalent in middle-aged patients aged 30-60 (56.5%), housekeepers (41.5%), and urban residents (75.5%). Clinical symptom analysis revealed that muscle pain (68%) was the most common symptom in women, while leg pain (62.3%) was most frequent in men. The PCR test for the *Omp31* gene was positive in 14.5% of cases, which was consistent with the results obtained from serological tests (13.8%). Sensitivity of Wright test, Coombs-Wright test, 2-mercaptoethanol (2ME) test, and gel agglutination test, compared to PCR, was 89.7%, 75.9%, 55.2%, and 55.2%, respectively. The highest risk factor for patients was consumption of non-pasteurized dairy products (17%).

Conclusion

The PCR method is a fast and accurate technique for detecting brucellosis, with many advantages over traditional culture-based methods. It has no limitations related to culture methods and can diagnose the disease in less than one day. It has high sensitivity and repeatability, and poses a lower risk to workers. In this study, 29 out of 200 suspected Brucella samples (13%) tested positive using PCR with primers binding to the *Omp31* gene. These findings demonstrate the accuracy and reliability of PCR for bacterial identification. The PCR technique also allows for rapid detection and differentiation of different *Brucella* species.

Nucleic acid tests such as PCR are considered as next-generation technologies with higher sensitivity than blood culture method and better specificity than serological tests for detecting brucellosis. Gershasbi et al. (2014) reported that the sensitivity and specificity of PCR for detecting brucellosis were 96% and 80.7%, respectively, which is consistent with the findings of this study. Overall, the use of PCR as a diagnostic method for brucellosis is recommended due to its high accuracy and being time effective. The PCR method has a sensitivity and specificity of 98%, which is much higher than other diagnostic methods.

The demographic study of brucellosis diagnosed by PCR in this study is consistent with previous studies in terms of age groups, occupation, and risk factors associated with the disease. However, unlike most previous studies where the prevalence of brucellosis in men was

reported higher than in women, the prevalence of brucellosis in women was higher in this study. This finding suggests the need to investigate the cause of the increased incidence of brucellosis in Iranian women. In addition, public health measures such as promoting the use of pasteurized dairy products should be emphasized to prevent the transmission of brucellosis.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of Falavarjan Branch, Islamic Azad University (Code: IR.IAU.FALA.REC.1399.061).

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors

Authors contributions

All authors contributed equally to preparing this paper.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the official of the Microbiology Laboratory, Falavarjan Branch, Islamic Azad University.

مقاله پژوهشی

تشخیص مولکولی بروسلا ملی‌تنسیس در سرم بیماران مشکوک به تب مالت با بررسی ژن omp31 و مقایسه با نتایج آزمون‌های سرولوژیک

عاطفه ابوطالبی[۱]، *مریم محمدی سیچانی[۱]، نفیسه السادات نقوی[۱]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

Use your device to scan

Citation Aboutalebi A, Mohammadi-Sichani M, Naghavi1 N . [Detection of Brucella militensis in the Serum of Patients Suspected of Brucellosis by the Omp31 Gene Amplification, Compared to the Serological Diagnostic Tests (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2023; 17:E?.

https://doi.org/10.32598/qums.17.

تاریخ دریافت: ۱۸/۹/۱۴۰۱
تاریخ‌پذیرش: ۵/۱/۱۴۰۲
تاریخ انتشار: ؟؟؟

چکیده

زمینه و هدف بروسلوزیس یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام با گسترش جهانی است. این بیماری همواره در ایران بروز بالایی داشته است. هدف از مطالعه حاضر، تشخیص مقایسه‌ای عفونت بروسلوز ناشی از بروسلا ملی‌تنسیس در سرم بیماران در شهر اصفهان، براساس تکثیر ژن omp31 و روش‌های سرولوژیک بود.

روش بررسی نمونه خون از ۲۰۰ فرد مشکوک به بروسلوز گرفته شد. اطلاعات جمعیت‌شناختی بیماران مطابق با پرسش‌نامه، جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به‌وسیله آزمون‌های سرولوژی تشخیص بروسلوز شامل رز بنگال، رایت لوله‌ای و ۲مرکاپتواتانل (2ME) ارزیابی شدند. استخراج DNA به روش فنل/کلروفرم انجام شد و با پرایمرهای اختصاصی ژن omp31 در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورداستفاده قرار گرفت. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳، با تست آنووا تجزیه‌وتحلیل شدند.

یافته‌ها ۲۰۰ نمونه متعلق به ۱۲۲ زن و ۷۸ مرد با میانگین سنی ۱۷/۴۳±۴۵/۱۷ سال بود. تکثیر ژن omp31 در ۱۴/۵ درصد موارد نتیجه مثبت داشت که با نتایج آزمون‌های سرولوژیک هماهنگ بود. حساسیت آزمون‌های رایت، کومبس رایت، 2ME و آگلوتیناسیون بر پایه ژل در مقایسه با PCR به ترتیب ۸۹/۷، ۷۵/۹، ۵۵/۲ و ۵۵/۲ درصد به دست آمد. بیشترین افراد مبتلا خانه‌دار (۳۷/۹ درصد) و شهرنشین (۷۵/۹درصد) بودند. درد عضلانی (۶۸ درصد) شایع‌ترین علامت بالینی و بهترین عامل در مبتلایان مصرف لبنیات غیرپاستوریزه (۱۷/۲ درصد) بود.

نتیجه‌گیری روش تشخیص مولکولی بروسلوز براساس تکثیر ژن omp31 در مقایسه با روش‌های سرولوژیک به‌کاررفته، از حساسیت و دقت بالاتری برخوردار است. باتوجه‌به اهمیت تشخیص سریع بروسلوز و کنترل عوارض بالینی آن، شناسایی ژن omp31 در آزمایشگاه‌های تشخیص مولکولی پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها:
بروسلوز، بروسلا ملی‌تنسیس، روش‌های تشخیص مولکولی، پروتئین omp31، آزمون‌های سرولوژیک

* **نویسنده مسئول:**
مریم محمدی سیچانی
نشانی: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۳۰۹۲۸۲۳ (۹۱۳) ۹۸+
رایانامه: Ma.Mohammadi1347@iau.ac.ir & mohammadis_m@yahoo.com

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

مقدمه

بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام است که معمولاً مصرف‌کنندگان فرآورده‌های شیر خام آلوده، کشاورزان، دامپروران، قصابان و دامپزشکان به آن مبتلا می‌شوند. این بیماری قابل انتقال از انسان به انسان نیست و بر اساس مطالعات صورت‌گرفته، تنها بین انسان و حیوان حامل آن، همچنین از طریق تماس مستقیم با حیوانات آلوده و از طریق مصرف فرآورده‌های لبنی غیرپاستوریزه و خام قابل انتقال است [۱]. گونه‌های مختلفی از بروسلاها توانایی ایجاد بیماری در انسان را دارند اما اصلی‌ترین گونه آلوده‌کننده انسان که شیوع بیشتری در سراسر جهان دارد، بروسلا ملی‌تنسیس است [۲، ۳].

کشت خون به‌عنوان استاندارد طلایی در تشخیص بروسلوز شناخته می‌شود، اما این روش محدودیت‌هایی از نظر زمان‌بر بودن، نیاز به محیط کشت اختصاصی، نیاز به ایمنی زیستی سطح ۳ و افراد متخصص دارد و نتایج منفی کاذب آن زیاد است [۴، ۵]. روش‌های جایگزین تشخیصی تب مالت در غیاب امکانات کشت، آزمایش‌های سرولوژی مانند رز بنگال، آگلوتیناسیون سرم و آزمایش کومبس است که براساس واکنش آنتی‌بادی‌ها در برابر لیپوپلی‌ساکارید صاف دیواره باکتری طراحی شده‌اند. به‌طور معمول از آزمون رز بنگال به‌عنوان آزمایش غربالگری استفاده می‌شود و نمونه‌های مثبت با آگلوتیناسیون سرم تأیید می‌شوند [۳].

آزمون کومبس رایت در صورتی انجام می‌شود که تست رایت منفی و پزشک به فاز مزمن این بیماری مشکوک باشد. آزمون کومبس رایت در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی بروسلوز، به‌علت شناسایی انواع IgG مفید است، زیرا این آنتی‌بادی‌های ناقص علی‌رغم ترکیب شدن با آنتی‌ژن‌های سلولی، قادر به ایجاد واکنش آگلوتیناسیون نیستند. آزمون ۲مرکاپتواتانول[1] جهت مشخص کردن کلاس آنتی‌بادی‌های تولیدشده در عفونت با بروسلاها و نیز مشخص شدن مرحله بیماری بروسلوز انجام می‌شود. اساس این آزمایش اندازه‌گیری IgG است زیرا پیوند دی‌سولفیدی موجود در ساختار احیاشده و این آنتی‌بادی به مولکول‌های منومری تفکیک می‌شوند و بنابراین قادر به ایجاد آگلوتیناسیون نخواهند بود. روش آگلوتیناسیون بر پایه ژل نیز به‌دلیل کوتاه‌تر بودن زمان انجام آزمون نسبت به سایر روش‌های سرولوژیک، می‌تواند در موارد اورژانس کاربرد داشته باشد. نتایج این روش معمولاً با نتایج آزمایش کومبس رایت تطابق دارد [۶].

باوجوداین، تکنیک‌های مبتنی بر تشخیص مولکولی ابزار بسیار مؤثری برای تشخیص گونه‌های بروسلا هستند [۷]. آزمایش‌های سرولوژیکی مرسوم، نتایج مثبت کاذب دارند [۸]. بنابراین، تلاش بر این بوده است که از پروتئین‌های اختصاصی بروسلا، به‌خصوص سومین گروه از پروتئین‌های غشای خارجی در تشخیص‌های سرولوژیک و مولکولی آن‌ها استفاده شود. این گروه شامل Omp25 و Omp31 است که ۳۴ درصد هویت مشترک دارند. پروتئین Omp31 در گونه‌های بروسلا بسیار حفاظت شده است. پروتئین Omp31 نقش مهمی در تحریک سلول‌های $CD8^+$ T و $CD4^+$ T دارد و آنتی‌بادی ضد آن علیه بروسلا ملی‌تنسیس در افراد آلوده شناسایی شده است [۹]. با استفاده از پروتئین Omp31 بروسلا ملی‌تنسیس به‌صورت خالص‌شده و نوترکیب، تشخیص این باکتری در سرم انسان و حیوانات مبتلا به بروسلوز به روش سنجش ایمونوسوربنت پیوندی با روش الایزا موفقیت‌آمیز بوده است [۱۰]. به همین دلیل، ژن کدکننده Omp31 در مطالعه حاضر برای تشخیص مولکولی اختصاصی بروسلا ملی‌تنسیس استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۲۰۰ فرد مشکوک به بروسلوز که بنابر توصیه پزشک و براساس علائم بالینی به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی در شهر اصفهان مراجعه کرده بودند، پس از تکمیل فرم پرسش‌نامه و فرم رضایت، نمونه خون گرفته شد. نمونه‌های خون در دو لوله جداگانه، یکی حاوی هپارین جهت انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[2] و دیگری فاقد هپارین به‌منظور جداسازی سرم و انجام آزمایش‌های سرولوژیک، تقسیم و به بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه ارجاع داده شد. سرم نمونه‌ها جدا شدند و جهت انجام آزمون PCR، تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمون سرولوژیک رایت و کومبس رایت

ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سرم با ۵۰ میکرولیتر آنتی‌ژن رز بنگال روی لام گسترده شد. پس از ۲ دقیقه، نتایج آگلوتیناسیون زیر نور چراغ بررسی شد. در صورت مشاهده ذرات آگلوتینه، تست مثبت در نظر گرفته شد. در صورت منفی شدن آزمون رایت لامی، برای بررسی پدیده پروزون، رقت‌های ۱/۲۰، ۱/۴۰ و ۱/۸۰ از سرم بیمار همراه با آنتی‌ژن بروسلایی در ۳ لوله تهیه شد و لوله‌ها ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها با دور ۲۰۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شدند و آگلوتیناسیون موردبررسی قرار گرفت. نتایج آگلوتیناسیون مثبت و منفی هر نمونه ثبت شد. در صورت مثبت شدن آزمون رایت لامی، رقت‌های ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰، ۱/۱۶۰، ۱/۳۲۰ و ۱/۶۴۰ از سرم بیمار همراه با آنتی‌ژن بروسلایی در ۶ لوله تهیه شده و ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌ها با دور ۲۰۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شدند و آگلوتیناسیون

1. 2-Mercaptoethanol

2. Polymerase chain reaction (PCR)

موردبررسی قرار گرفت و نتایج به‌صورت تیتر هر رقت گزارش شد [۱۱]. به‌منظور انجام آزمون کومبس رایت به ۶ لوله آزمون رایت، یک قطره سرم ضدآنتی‌بادی‌های انسانی اضافه شد و مخلوط شدند. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. لوله‌ها با ۲۰۰۰ دور به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شدند و آگلوتیناسیون موردبررسی قرار گرفت [۱۲].

به‌منظور انجام آزمون 2ME، رقت‌های ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰، ۱/۱۶۰، ۱/۳۲۰ و ۱/۶۴۰ از سرم بیمار همراه با آنتی‌ژن بروسلایی مربوط به آزمون 2ME در ۶ لوله تهیه شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌ها با دور ۲۰۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شدند و آگلوتیناسیون موردبررسی قرار گرفت و نتایج به‌صورت تیتر هر رقت گزارش شد [۱۱].

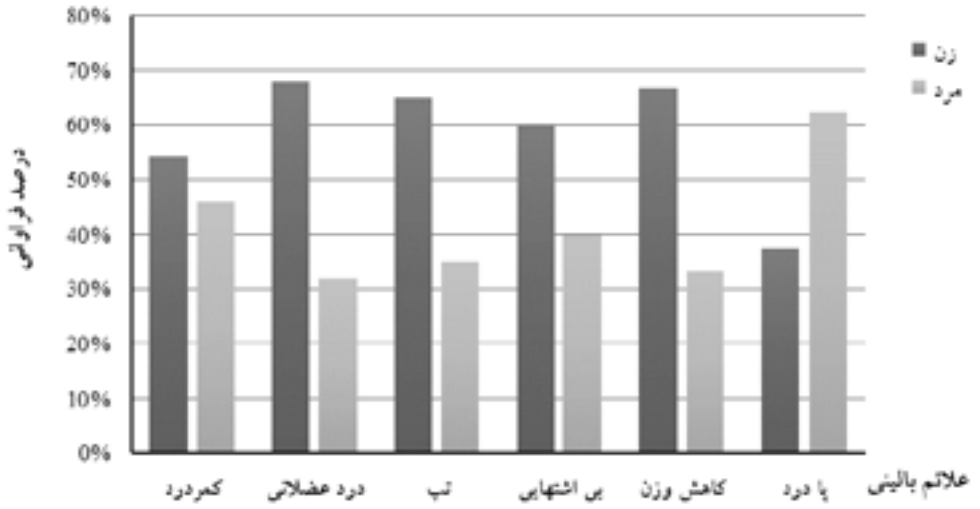
آزمون آگلوتیناسیون بر پایه ژل با کیت تشخیص بروسلوز انستیتو پاستور انجام شد. به‌منظور انجام این آزمایش، رقت‌های ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰، ۱/۱۶۰، ۱/۳۲۰ و ۱/۶۴۰ از سرم بیمار همراه با آنتی‌ژن بروسلایی در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه استریل ته Uشکل تهیه شد و میکروپلیت به‌مدت ۳۰ ثانیه به‌آرامی تکان داده شد و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. تشکیل کمپلکس آنتی‌ژن آنتی‌بادی به‌صورت دایره صورتی‌رنگ در چاهک‌ها موردبررسی قرار گرفت [۱۳].

استخراج DNA

با استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و به‌کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده، شناسایی دقیق و نهایی بروسلا انجام شد. به‌منظور استخراج DNA از روش فنل/کلروفرم استفاده شد. در ابتدا برای از بین رفتن باکتری‌های فعال احتمالی، نمونه‌های سرم جمع‌آوری‌شده به‌مدت ۵ دقیقه جوشانده شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر سرم همراه با ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (Tris ۱۰۰ میلی‌مولار با pH =۷/۶ و EDTA ۲ میلی‌مولار با pH=۸ و SDS ۰/۲ درصد و NaCl با غلظت نهایی ۱۵۰ میلی‌مولار) در یک میکروتیوب استریل مخلوط شدند. در ادامه، ۱۵۰ میکرولیتر فنل و کلروفرم به محتویات میکروتیوب اضافه و مخلوط شد. پس از به دست آمدن محلولی شیری‌رنگ، میکروتیوب به‌مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. میکروتیوب‌ها با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول شفاف رویی حاوی DNA، با دقت جدا شد و هم‌حجم آن اتانول مطلق اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به‌منظور رسوب دادن DNA، میکروتیوب به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. پس از رسوب دادن DNA در میکروتیوب، الکل رویی دور ریخته شد و رسوب با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد و سانتریفیوژ به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، شست‌وشو داده شد. پس از تخلیه الکل رویی، رسوب در دمای اتاق خشک شد. درنهایت، رسوب در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی حل شد و کیفیت DNA استخراج‌شده با الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد در بافر TBE 1X و رنگ‌آمیزی ژل با رنگ Green Viewer موردبررسی قرار گرفت. ایجاد باند در ژل مؤید استخراج DNA با کیفیت بالا بود. DNA استخراج‌شده تا انجام مراحل بعدی پژوهش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۴].

تکثیر ژن Omp31 در بروسلا ملی‌تنسیس با روش PCR

به‌منظور طراحی پرایمرهای مورداستفاده در این تحقیق، ابتدا توالی مربوط به ژن Omp31 از باکتری بروسلا ملی‌تنسیس با



تصویر ۱. فراوانی نسبی علائم بالینی افراد مشکوک به بروسلوز وارد شده در مطالعه

جدول ۱. ویژگی‌های جمعیت‌شناختی افراد مشکوک به بروسلوز واردشده در مطالعه

متغیر	دسته	تعداد (درصد)
جنس	زن	۱۲۲(۶۱)
	مرد	۷۸(۳۹)
سن	زیر ۳۰ سال	۴۲(۲۱)
	۳۰ تا ۶۰ سال	۱۱۳(۵۶/۵)
	بالاتر از ۶۰ سال	۴۵(۲۲/۵)
شغل	خانه‌دار	۸۳(۴۱/۵)
	محصل	۳۱(۱۵/۵)
	کارگر	۴۲(۲۱)
	کارمند	۴۰(۲۰)
	بیکار	۴(۲)
محل سکونت	شهر	۱۵۱(۷۵/۵)
	روستا	۴۹(۲۴/۵)
مصرف لبنیات غیرپاستوریزه	بلی	۳۴(۱۷)
	خیر	۱۶۶(۸۳)

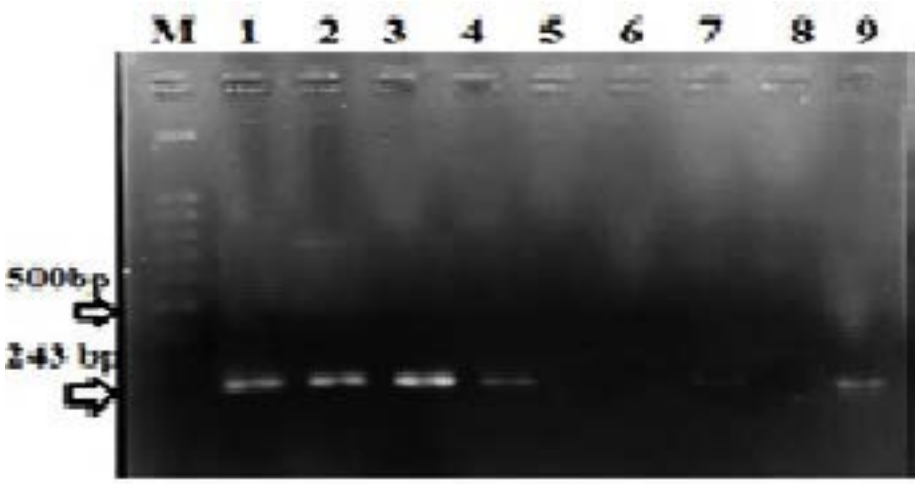
مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

شماره دسترسی NG-021140.1 از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت شد و درنهایت به کمک نرم‌افزار Gene runner پرایمرها طراحی شدند. پرایمر پیشرو (5'-GTGGTGTTCAGGCCGGTTAC-3') و معکوس (5'- CGCAGACTTGACCTTACCATAG-3') با دمای ذوب ۵۴ درجه سانتی‌گراد سنتز شدند [۱۵]. مخلوط PCR شامل بافر PCR (1X)، $MgCl_2$ (۱/۵ میلی‌مولار)، dNTPs (۰/۲ میلی‌مولار)، پرایمرهای پیشرو و معکوس (هرکدام با غلظت ۰/۴ میکرومولار) و DNA پلیمراز (یک واحد در کل مخلوط) تهیه شد. به مخلوط فوق ۳ میکرولیتر DNA الگو اضافه شد و حجم کلی آن با آب دوبار تقطیر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) انجام شد. برنامه دمایی و زمانی مورداستفاده شامل یک مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰۰ ثانیه، ۳۰ چرخه شامل مراحل واسرشت در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک مرحله

جدول ۲. توزیع فراوانی نتایج آزمون‌های سرولوژیک براساس آزمون PCR 200 بیماران مشکوک به بروسلوز واردشده در مطالعه

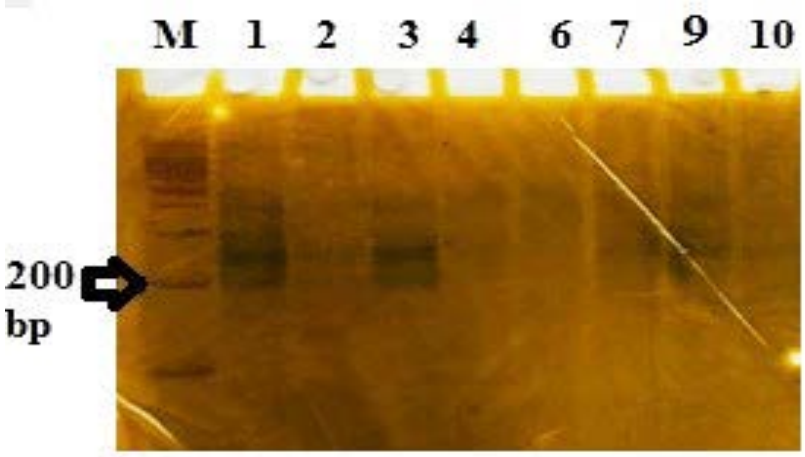
آزمون	تعداد (درصد)		درصد				
	نتایج منفی	نتایج مثبت	حساسیت	ویژگی	مثبت کاذب	منفی کاذب	دقت
PCR	۱۷۱(۸۵/۵)	۲۹(۱۴/۵)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۱۰۰
رایت	۱۷۴(۸۷/۰)	۲۶(۱۳)	۸۹/۷	۱۰۰	۰	۱۰/۳۴	۹۸/۵
کومبس رایت	۱۷۸(۸۹/۰)	۲۲(۱۱)	۷۵/۹	۱۰۰	۰	۲۴/۱۴	۹۶/۵
۲مرکاپتواتانول	۱۸۴(۹۲/۰)	۱۶(۸)	۵۵/۲	۱۰۰	۰	۴۴/۸۳	۹۳/۵
آگلوتیناسیون بر پایه ژل	۱۸۴(۹۲/۰)	۱۶(۸)	۵۵/۲	۱۰۰	۰	۴۴/۸۳	۹۳/۵

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم



تصویر ۲. نمونه نتایج حاصل از الکتروفورز قطعه موردنظر در ژن Omp31 در ژل آگارز

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۳. نمونه نتایج حاصل از الکتروفورز قطعه موردنظر در ژن Omp31 در ژل پلی‌اکریل آمید. نشانگر مورداستفاده، 200 bp و طول قطعه تکثیرشده در باکتری 243 bp است.

تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۲۰ ثانیه بود. پس از اتمام واکنش، باند حاصل از تکثیر ژن با الکتروفورز ژل آگارز یک درصد در بافر TBE 1X پس رنگ‌آمیزی با رنگ Green Viewer، موردارزیابی قرار گرفت. همچنین، به‌منظور افزایش دقت و حساسیت آزمون، از روش الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل آمید نیزبرای تأیید صحت و اندازه قطعات تکثیرشده استفاده شد [۱۶]. در این مطالعه از بروسلا ملی‌تنسیس سویه CIT31 که با شماره دسترسی CP025822 در مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری[3] ثبت شده است به‌عنوان سویه کنترل‌مثبت استفاده شد.

یافته‌ها

ویژگی‌های جمعیت‌شناختی افراد مشکوک به بروسلوز واردشده به مطالعه در جدول شماره ۱ ارائه شده است. در این مطالعه، ۲۰۰ نمونه خون از ۱۲۲ زن و ۷۸ مرد با میانگین سنی ۴۵/۱۷±۱۷/۴۳ سال بررسی شد. بیماری در میانسالان ۳۰ تا ۶۰ساله (۵۶/۵ درصد)، زنان خانه‌دار (۴۱/۵ درصد) و افراد شهرنشین (۷۵/۵ درصد) بیشترین شیوع را داشت. بررسی علائم بالینی در این افراد مطابق تصویر شماره ۱ نشان داد بیشترین فراوانی علائم بالینی بیماری در زنان، درد عضلانی (۶۸ درصد) و در مردان، درد در ناحیه پا (۶۲/۳ درصد) است.

فراوانی بروسلوز براساس نتایج آزمون PCR

جهت شناسایی بروسلا از پرایمرهای اختصاصی ژن Omp31 بروسلا ملیتنسیس استفاده شد. نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز و ژل پلی‌آکریل آمید محصولات PCR در جدایه‌های

3. ational Center for Biotechnology Information (NCBI)

موردمطالعه به‌ترتیب در تصویر شماره ۲ و تصویر شماره ۳ ارائه شده است.

مقایسه توزیع فراوانی بیماران مشکوک به ابتلا به بروسلوز براساس آزمون‌های سرولوژیک و آزمون PCR

در جدول شماره ۲ توزیع فراوانی بیماران مشکوک به بروسلوز که به مطالعه وارد شدند، براساس آزمون‌های سرولوژیک در مقایسه با آزمون مولکولی PCR ارائه شده است.

بحث

در ایران، بروسلوز همچنان یک معضل بهداشتی اندمیک، هم در انسان و هم در دام به شمار می‌رود و علی‌رغم اجرای طرح ریشه‌کنی این بیماری در دام از دهه ۵۰ خورشیدی، موارد ابتلا به این بیماری در انسان و دام به‌کرات گزارش می‌شود [۱۷]. یکی از بهترین روش‌های تشخیصی بروسلوز در انسان، جداسازی ارگانیسم موردنظر است که این روش نیز دارای محدودیت‌هایی است. ازجمله این محدودیت‌ها، دریافت پاسخ مثبت به‌مدت ۴ تا ۶ روز و حتی ۲ هفته و در مواردی بیش از ۲۷ روز، به‌دلیل دوره انکوباسیون طولانی و همچنین خطر انتقال ارگانیسم به کارکنان آزمایشگاه حین کار کردن با آن است، به‌طوری که ۲ درصد از کل موارد بروسلوز در آزمایشگاه ایجاد می‌شود. از مهم‌ترین محدودیت‌های تست‌های سرولوژیکی نیز می‌توان به مثبت بودن تیتر آنتی‌بادی پس از یک دوره طولانی درمان، منفی بودن تست‌های سرولوژیکی در ابتدای بیماری به‌دلیل ناکافی بودن تیتر آنتی‌بادی و ناکارآمدی این روش‌ها در تشخیص بیماری در موارد عود آن پس از درمان طولانی‌مدت با انواع آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره کرد. ازاین‌رو محققان همواره به‌دنبال راهی برای تشخیص سریع و دقیق بیماری بروسلوز بوده‌اند [۱۸].

روش PCR یکی از سریع‌ترین و دقیق‌ترین روش‌های تشخیص بروسلوز است. استفاده از این روش در دهه‌های اخیر بسیار گسترش یافته است و دارای مزایای بسیاری است. نداشتن محدودیت‌های موجود در روش کشت، تشخیص بیماری در کمتر از یک روز، حساسیت بالا، قدرت و قابلیت تکرار در زمان‌های مختلف و کم‌خطر بودن برای کارکنان از مهم‌ترین خصوصیات این روش است [۱۹]. در تحقیق حاضر از مجموع ۲۰۰ نمونه مشکوک به بروسلا، با روش PCR ۲۹ نمونه با استفاده از پرایمرهای متصل‌شونده به ژن Omp31، مثبت ارزیابی شد که معادل ۱۳ درصد نمونه‌ها بود. به‌طورکلی، نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد شناسایی باکتری با استفاده از PCR روشی بسیار دقیق و قابل اعتماد است. علاوه بر این، یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های تکنیک PCR تشخیص سریع و تمایز گونه‌های مختلف است [۲۰]. محققان بیان کردند که آزمایش‌های اسیدنوکلئیک مانند PCR فناوری‌های نسل جدید هستند که حساسیت بالاتری نسبت به کشت خون و ویژگی بهتری نسبت به آزمایش‌های سرولوژیک برای شناسایی عفونت بروسلوز دارند که با مطالعه حاضر مطابقت دارد [۲۱]. گرشاسبی و همکاران گزارش کردند که حساسیت و ویژگی تکنیک PCR برای شناسایی بروسلوز به‌ترتیب ۹۶ و ۸۰/۷ درصد بود که با مطالعه حاضر مطابقت دارد [۲۱].

بررسی نتایج مطالعه حاضر نشان داد زنان بیشتر از مردان به بروسلوز مبتلا می‌شوند. این نتیجه با مطالعه زینلی مطابقت دارد [۲۲]. هرچند در مطالعه حمزوی و همکاران نشان داده شده است که مردان بیشتر از زنان مبتلا شده‌اند [۲۳]. همچنین امرو و همکاران بیان کردند که بروز بروسلوز در مردان ۷۵/۱ درصد و نسبت مرد به زن ۳ به ۱ است [۲۴] که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. با بررسی همه نتایج مشخص شده است که شیوع این بیماری در مردان به‌دلیل فعالیت بیشتر در دامپروری‌ها بیشتر است.

میانگین سنی افراد مبتلا به بروسلوز در پژوهش حاضر ۳۰ تا ۶۰ سال بود که با مطالعه محمدیان و همکاران همخوانی دارد [۲۵]. باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده، احتمال دارد علت این امر این باشد که این بیماری بیشتر در گروه سنی فعالان جامعه رخ می‌دهد. علاوه بر این نشان داده شده که این بیماری در دهه‌های دوم و سوم زندگی شیوع بیشتری دارد. این نتایج با مطالعه حوزوی و همکاران مطابقت دارد [۲۳]. در مطالعه امرو و همکاران میزان بروز بروسلوز در گروه سنی ۱۱ تا ۲۰ سال ۲۹ درصد گزارش شد که با مطالعه حاضر که در سنین بالاتر بروز بیشتری رخ داده بود مطابقت ندارد [۲۴]. بررسی وضعیت اشتغال نشان داد اکثراً مبتلایان به بروسلوز خانه‌دار بوده‌اند. نتایج مطالعات متعددی با نتایج مطالعه حاضر همسو ست. به نظر می‌رسد شغل به‌عنوان یک عامل خطر بسیار مهم به وضعیت ارتباط فرد با دام وابسته است [۲۶].

علاوه بر این، در مطالعه حاضر مشخص شد مصرف لبنیات غیرپاستوریزه به‌خصوص پنیر و شیر بیشترین فراوانی را در بروز بروسلوز دارد. تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند تماس با دام و مصرف شیر و پنیر غیرپاستوریزه بیشترین فراوانی را در بین عوامل خطر داشته است. همچنین مشخص شده است در بسیاری از مناطق کنترل مؤثر بروسلوز گوسفند به‌طور قابل‌توجهی خطر ابتلا به بروسلوز انسانی را کاهش می‌دهد [۲۷]. سادات و همکاران در مطالعه خود توصیه کردند که تشخیص بروسلوز با استفاده از تست الایزای غیرمستقیم، به‌دلیل ویژگی و حساسیت بالای این تست انجام شود [۲۸].

علائم سیستمیک و غیراختصاصی بروسلوز و تشابه علائم بالینی آن با برخی بیماری‌های دیگر ضرورت تشخیص بالینی آن را دوچندان کرده است [۱۶]. روش تشخیص مولکولی ارائه‌شده در مطالعه حاضر برای تشخیص این بیماری، با حساسیت و

ویژگی ۱۰۰ درصد برای تهیه کیت‌های آزمایشگاهی جهت استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی پیشنهاد می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند سویه‌های بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی‌تنسیس از طریق تجارت حیوانات به سراسر جهان منتقل شده‌اند و در برنامه‌های کنترل عوامل عفونی آتی مهم خواهند بود [۲۹]. بنابراین، پیشرفت‌ها در فناوری تشخیص مولکولی نوین از طریق تکثیر نواحی اختصاصی در ژنوم، می‌تواند به تایپینگ از طریق توالی‌یابی لوکوس‌های ژنی چندگانه در ژنوم بروسلا، در مناطق اندمیک مختلف مانند ایران منجر شود [۳۰].

نتیجه‌گیری

بروسلوز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام همراه با گسترش جهانی است. این بیماری یک مشکل اساسی در بهداشت نیز به شمار می‌رود زیرا نه‌تنها به ایجاد عوارض بالینی منجر می‌شود بلکه عامل زیان‌های اقتصادی بسیار زیادی است و همواره در ایران بروز بالایی داشته است. امروزه چند آزمون سرولوژیک وجود دارد که آزمایشگاه‌های مختلف از آن‌ها برای تشخیص بروسلوز استفاده می‌کنند، اما با وجود مشکلات و محدودیت‌هایی که استفاده از این آزمون‌ها به‌همراه دارند، روش‌های دیگری همچون تشخیص مولکولی به‌عنوان روشی ساده، سریع و بسیار حساس به‌منظور تشخیص بروسلوز موردتوجه قرار گرفته است. باتوجه‌به نتایج حاصل از این تحقیق و تحقیقات مشابه دیگر، تشخیص عوامل عفونی با استفاده از آزمایش PCR در مقایسه با روش‌های سنتی می‌تواند روشی سریع و قابل اطمینان به شمار آید. حساسیت و اختصاصی بودن روش PCR در تشخیص بروسلوزیس ۹۸ درصد است که بسیار بیشتر از سایر روش‌های تشخیصی است. مطالعه جمعیت‌شناختی بروسلوز تشخیص داده‌شده با روش PCR در بررسی حاضر از نظر گروه‌های سنی و شغلی مبتلایان و عوامل خطر مؤثر در ابتلا، با مطالعات قبلی همسو بود، اما علی‌رغم اینکه در اکثر مطالعات قبلی میزان شیوع در مردان بیشتر از زنان گزارش شده بود، در مطالعه حاضر نسبت ابتلای زنان در میان افراد موردمطالعه بیشتر از مردان بود که می‌تواند زنگ خطری برای علت‌یابی افزایش بروز بروسلوز در زنان باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه دارای تأییدیه از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان به شماره IR.IAU.FALA.REC.1399.061 است.

حامی مالی

این تحقیق هیچ کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از همکاری مدیر آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

[1] Tulu D. Bovine brucellosis: Epidemiology, public health implications, and status of brucellosis in Ethiopia. Vet Med. 2022; 13:21-30. [DOI:10.2147/VMRR.S347337] [PMID] [PMCID]

[2] Kydyshov K, Usenbaev N, Sharshenbekov A, Aitkuluev N, Abdyraev M, Chegirov S, et al. Brucellosis in humans and animals in Kyrgyzstan. Microorganisms. 2022; 10(7):1293. [DOI:10.3390/microorganisms10071293] [PMID] [PMCID]

[3] Golshani M, Buozari S. A review of brucellosis in Iran: Epidemiology, risk factors, diagnosis, control, and prevention. Iran Biomed J. 2017; 21(6):349-59. [DOI:10.18869/acadpub.ibj.21.6.349] [PMID] [PMCID]

[4] Głowacka P, Żakowska D, Naylor K, Niemcewicz M, Bielawska-Drózd A. Brucella - virulence factors, pathogenesis and treatment. Pol J Microbiol. 2018; 67(2):151-61. [DOI:10.21307/pjm-2018-029] [PMID] [PMCID]

[5] Waktole H, Aden M, Ashenafi H. Seroepidemiology of camel brucellosis in and around Dire Dawa, Eastern Ethiopia. Vet Med Int. 2022; 2022:6624293. [DOI:10.1155/2022/6624293] [PMID] [PMCID]

[6] Lukambagire AS, Mendes ÂJ, Bodenham RF, McGiven JA, Mkenda NA, Mathew C, et al. Performance characteristics and costs of serological tests for brucellosis in a pastoralist community of northern Tanzania. Sci Rep. 2021; 11(1):5480. [DOI:10.1038/s41598-021-82906-w] [PMID] [PMCID]

[7] Ma X, Sun GQ, Wang ZH, Chu YM, Jin Z, Li BL. Transmission dynamics of brucellosis in Jilin province, China. Commun Nonlinear Sci Numer Simul. 2022; 114:106702. [DOI:10.1016/j.cnsns.2022.106702]

[8] Trotta A, Marinaro M, Cirilli M, Sposato A, Adone R, Beverelli M, et al. Brucella melitensis B115-based ELISA to unravel false positive serologic reactions in bovine brucellosis: A field study. BMC Vet Res. 2020; 16(1):50. [DOI:10.1186/s12917-020-02278-7] [PMID] [PMCID]

[9] Cassataro J, Pasquevich K, Bruno L, Wallach JC, Fossati CA, Baldi PC. Antibody reactivity to Omp31 from Brucella melitensis in human and animal infections by smooth and rough Brucellae. Clin Diagn Lab Immunol. 2004; 11(1):111-4. [DOI:10.1128/CDLI.11.1.111-114.2004] [PMID] [PMCID]

[10] Bulashev AK, Ingirbay BK, Mukantayev KN, Syzdykova AS. Evaluation of chimeric proteins for serological diagnosis of brucellosis in cattle. Vet World. 2021; 14(8):2187-96. [DOI:10.14202/vetworld.2021.2187-2196] [PMID] [PMCID]

[11] Erfanian M, Seyyed Nouzadi SM, Jarahi L. Evaluation of diagnostic sensitivity of wright, coombs wright and 2-Mercapto Ethanol in diagnosis of brucellosis. Evidence Based Care. 2013; 2(4):69-74. [DOI:10.22038/ebcj.2013.488]

[12] Haghdoost M, Ansari L, Owaysee Osquee H. Brucellacapt test, wright and coombs wright in diagnosis of brucellosis. J Res Clin Med. 2021; 9(15):1-5. [DOI:10.34172/jrcm.2021.0015]

[13] Borsa BA, Aldag ME, Yilmaz M, Dalar ZG, Ozalp VC. Comparison of a novel test (ODAK brucella coombs gel test) with commonly used serological tests in human brucellosis. Clin Lab. 2016; 62(9):1671-4. [DOI:10.7754/Clin.Lab.2016.160120] [PMID]

[14] Wang Y, Wang Z, Zhang Y, Bai L, Zhao Y, Liu C, et al. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of human brucellosis. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014; 13:31. [DOI:10.1186/s12941-014-0031-7] [PMID] [PMCID]

[15] Moulana Z, Roushan MR, Marashi SM. Evaluation of different primers for detection of brucella by using PCR method. Electron Physician. 2016; 8(11):3222-7. [DOI:10.19082/3222] [PMID] [PMCID]

[16] Delam H, Keshtkaran Z, Rezaei B, Soufi O, Bazrafshan MR. Changing patterns in epidemiology of brucellosis in the south of Iran (2015-2020): Based on cochrane-armitage trend test. Ann Glob Health. 2022; 88(1):11. [DOI:10.5334/aogh.3474] [PMID] [PMCID]

[17] Adabi M, Karami M, Keramat F, Alikhani MY, Bakhtiari S. Serological and molecular investigation of human brucellosis in participants of Famenin brucellosis cohort study, Hamadan, Iran. Iran J Microbiol. 2021; 13(3):319-24. [DOI:10.18502/ijm.v13i3.6394] [PMID] [PMCID]

[18] Di Bonaventura G, Angeletti S, Ianni A, Petitti T, Gherardi G. Microbiological laboratory diagnosis of human brucellosis: An overview. Pathogens. 2021; 10(12):1623. [DOI:10.3390/pathogens10121623] [PMID] [PMCID]

[19] Al Dahouk S, Nöckler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. Expert Rev Anti Infect Ther. 2011; 9(7):833-45. [DOI:10.1586/eri.11.55] [PMID]

[20] Dadar M, Alamian S, Behrozikhah AM, Yazdani F, Kalantari A, Etemadi A, et al. Molecular identification of brucella species and biovars associated with animal and human infection in Iran. Vet Res Forum. 2019; 10(4): 315-21. [DOI:10.30466/vrf.2018.89680.2171] [PMID] [PMCID]

[21] Garshasbi M, Ramazani A, Sorouri R, Javani S, Moradi S. Molecular detection of Brucella species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Iran. Braz J Microbiol. 2014; 45(2):533-8. [DOI:10.1590/S1517-83822014005000048] [PMID] [PMCID]

[22] Zeinali A. [A review on the serological and allergical diagnostic methods of brucellosis (Persian)]. Vet Res Bio Pro. 1994; 7(1):145-7. [Link]

[23] Hamzavi Y, Khademi N, Ghazi Zadeh MM, Janbakhsh A. [Epidemiology of malt fever in Kermanshah province in 2011 (Persian)]. J Kermanshah Uni Med Sci. 2014; 18(2):e74170. [DOI:10.22110/jkums.v18i2.1604]

[24] Amro A, Mansoor B, Hamarsheh O, Hjaija D. Recent trends in human brucellosis in the West Bank, Palestine. Int J Infect Dis. 2021; 106:308-313. [DOI:10.1016/j.ijid.2021.04.037] [PMID]

[25] Mohammadian M, Salehiniya H, Kazaei S, Ramazanpour J, Mohammadian-Hafshejani A. [Epidemiological characteristics and incidence rate of brucellosis in Isfahan Province, Iran, 2012 (Persian)]. J Isfahan Med Sch. 2015; 33(355):1784-95. [Link]

[26] Soodejani Taheri M, Lotfi M, Ghaderi A, Reisi A, Mohannadzadeh M. [Epidemiology of brucellosis in Shahr-e- Kord

during the years 2010 to 2014 (Persian)]. Pars J Med Sci. 2016; 14(1):1-7. [DOI:10.29252/jmj.14.1.1]

[27] Lai S, Chen Q, Li Z. Human brucellosis: An ongoing global health challenge. China CDC Wkly. 2021; 3(6):120-3. [DOI:10.46234/ccdcw2021.031] [PMID] [PMCID]

[28] Saadat S, Mardaneh J, Ahouran M, Mohammadzadeh A, Ardebili A, Yousefi M, et al. Diagnosis of cattle brucellosis by PCR and serological methods: Comparison of diagnostic tests. Biomed Pharmacol J. 2017; 10(2):881-8. [DOI:10.13005/bpj/1181]

[29] Allen AR, Milne G, Drees K, Presho E, Graham J, McAdam P, et al. Genomic epizootiology of a Brucella abortus outbreak in Northern Ireland (1997-2012). Infect Genet Evol. 2020; 81:104235. [DOI:10.1016/j.meegid.2020.104235] [PMID]

[30] O'Callaghan D. Human brucellosis: Recent advances and future challenges. Infect Dis Poverty. 2020; 9(1):101. [DOI:10.1186/s40249-020-00715-1] [PMID] [PMCID]