نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۹: ۱۰۰-۹۱

# تفکیک و تایپینگ مولکولی گونه های *بروسلا* جداسازی شده از سقط جنین دام‌های اهلی در شمال و شرق ایران

**علی نعمتی[۱]، غلامرضا هاشمی تبار[۲*]، مهرناز راد[۳]**

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد – ایران.

۲- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد – ایران.

۳- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد – ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۸

**چکیده**

بیماری بروسلوز یا تب مالت، همواره از دو بعد اقتصادی و بهداشتی حائز اهمیت بوده به نحوی که هر ساله خسارت‌های اقتصادی فراوانی را برای سرمایه دامی کشور به بار می‌آورد. از سوی دیگر از آنجایی که بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام می‌باشد، اهمیت موضوع از نظر بهداشت عمومی دو چندان می‌شود. بنابراین لازم است با انجام مطالعات اپیدمیولوژیک به عنوان گام اول، به سمت شناسایی عامل بیماری و سپس کنترل و کاهش موارد ابتلا به آن در کشور قدم برداشت. در این مطالعه، ۱۷۰ نمونه سقط جنین مربوط به گوسفند و گاو در طی سال‌های ۹۴ تا ۹۷ از استان‌های گلستان و خراسان رضوی جمع آوری گردید. پس از کالبد شکافی، از ارگان‌های مختلف جنین‌ها در محیط کلمبیا آگار و مک کانکی کشت داده شد و با استفاده از رنگ آمیزی گرم و تست‌های استاندارد بیوشیمیایی، تمام نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع، ۶۰ ایزوله *بروسلا* شناسایی گردید. در نهایت با استفاده از تکنیک‌های مولکولی Bruce-ladder Multiplex PCR و ERIC-PCR، تفکیک گونه و تایپینگ مولکولی ایزوله‌های جداسازی شده انجام پذیرفت. از میان ۶۰ ایزوله شناسایی شده، ۵۹ گونه مربوط به *بروسلا ملی‌تنسیس* و ۱ گونه مربوط به *بروسلا آبورتوس* بود. تمامی ایزوله‌های شناسایی شده، علی‌رغم مناطق جغرافیایی متفاوت، دارای الگوی ژنتیکی مشابهی بودند. تکنیک Bruce-ladder Multiplex PCR به عنوان یک روش سریع، دقیق و ایمن جهت شناسایی *بروسلا* در سطح جنس و گونه بسیار موثر است. با وجود اینکه تکنیک ERIC-PCR در بسیاری از مطالعات روش قدرتمندی در تمایز مولکولی باکتری‌ها بشمار می‌رود، در صورت امکان بهتر است که برای تایید نتایج این مطالعه از تکنیک‌های دقیق‌تر و با قدرت تفکیک بالا همچون MLVA و MLST نیز استفاده گردد.

**کلمات کلیدی: *بروسلا*، دام‌های اهلی، Bruce-ladder Multiplex PCR، ERIC-PCR.**

*نویسنده مسئول: غلامرضا هاشمی تبار

*آدرس: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد – ایران.*

*تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۵۶۵۰*

*پست الکترونیک: hashemit@um.ac.ir*

**مقدمه**

بیماری بروسلوز یا تب مالت یکی از شایع‌ترین و گسترده‌ترین بیماری‌های باکتریایی مشترک بین انسان و دام در دنیا محسوب می‌گردد. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، ۵۰۰ میلیون نفر در دنیا به بیماری تب مالت مبتلا هستند و سالیانه ۵۰۰ هزار نفر به این تعداد افزوده می‌گردد (۱۰،۱۳). این بیماری در اغلب نقاط دنیا و به خصوص در کشورهای در حال توسعه، از لحاظ بهداشت عمومی و تاثیر آن در وضعیت اقتصادی و اجتماعی جامعه از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. بر خلاف کشورهای اروپایی و آمریکای شمالی و سایر کشورهای توسعه یافته، بروسلوز همچنان یک بیماری اندمیک در ایران محسوب می‌گردد (۲۱،۲۳).

سقط جنین، کم شدن شیر دام، ناباروری دام، به دنیا آوردن نوزادان ضعیف و بروز عفونت‌های رحمی در دام‌ها از جمله علائم این بیماری در جمعیت دامی می‌باشد (۸،۱۴). مخزن طبیعی بروسلوز، دام‌های اهلی به خصوص گاو و گوسفند می‌باشد و انسان نیز به طرق مختلف (گوارش، استنشاق، پوست، تزریقات، چشم و مخاطات) به این بیماری مبتلا می‌گردد (۲۷). بروسلوز علاوه بر اینکه یک تهدید جدی برای سلامت جامعه به شمار می‌آید، سالانه زیان‌های اقتصادی فراوانی در زمینه دامپروری و دامداری به کشور تحمیل می‌کند.

عامل این بیماری، باکتری‌های مربوط به جنس *بروسلا* می‌باشند. *بروسلاها* باکتری‌های گرم منفی، کوچک، هوازی (اکثر گونه‌ها)، غیر متحرک، دارای رشد آهسته، فاقد اگزوتوکسین و سایر آنزیم‌های خارج سلولی هستند. به طور کلی فاکتور ویرولانس قابل ملاحظه‌ای در آن‌ها مشاهده نمی‌شود و در اصطلاح، کم حدت (Low virulence) محسوب می‌شوند (۴). *بروسلا*، یک باکتری درون سلولی اختیاری می‌باشد و بر اساس میزبان اختصاصی، خصوصیات بیوشیمیایی و آنتی ژنیک تا به امروز ۱۰ گونه از آن شناسایی و نامگذاری شده است (۹،۱۷). مهمترین گونه‌های بیماریزا برای دام‌های اهلی و انسان در ایران، گونه‌های *بروسلا ملی‌تنسیس* (گوسفند و بز) و *بروسلا آبورتوس* (گاو) می‌باشند (۲۶).

کلید پیشگیری و کنترل بروسلوز در انسان، ریشه کنی بروسلوز در جمعیت دامی است. یکی از مهمترین راهکارها جهت دست‌یابی به این هدف، بررسی اپیدمیولوژیک بیماری در جمعیت دامی می‌باشد. بررسی‌های اپیدمیولوژیک در کنترل بیماری و اقدامات پیشگیرانه موثر بوده و دارای اهمیت زیادی می‌باشند. به همین جهت طی سال‌های اخیر مطالعات زیادی در زمینه اپیدمیولوژی تب مالت در نقاط مختلف ایران انجام شده است. در این میان، تکنیک‌های مولکولی از نظر دقت، سرعت و ایمن بودن نسبت به سایر روش‌ها، از کارایی بالاتری برخوردار بوده‌اند (۷).

مطالعه حاضر با هدف بررسی اپیدمیولوژی بروسلوز و ارزیابی روند بیماری در جمعیت دام‌های اهلی در طی سال‌های ۹۴ تا ۹۷ با استفاده از تکنیک‌های مولکولی Bruce-ladder Multiplex PCR و ERIC-PCR انجام گرفته است.

## مواد و روش کار

### ۱- جمع آوری نمونه‌ها:

در مجموع ۱۷۰ نمونه، مربوط به جنین‌های سقط شده دام‌های اهلی ارجاعی به قطب مطالعات سقط جنین و مرگ و میر نوزاد دام‌های نشخوارکننده دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، جداسازی گردید. در این میان، ۱۴۸ نمونه، به جنین‌های سقط شده گوسفند و بز و ۲۲ نمونه، به جنین‌های سقط شده در گاوها، مربوط می‌شد. نمونه‌های مذکور، طی سال‌های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۷ از شمال و شرق ایران جداسازی گردید

کـه اکثـراً اسـتان‌هـای گلسـتان و خراسـان رضـوی و همچنین روستاهای اطراف آن‌ها را شامل می‌شد.

**۲- آزمایشات تشخیصی جهت شناسایی جنس *بروسلا*:**

پس از جمع آوری نمونه‌ها (جنین‌های سقط شده) و انتقال آن‌ها به آزمایشگاه، بلافاصله کالبد شکافی آن‌ها صورت پذیرفت و مایع شیردان، کبد، کلیه و ریه مربوط به جنین‌های سقط شده، جداسازی و در محیط کلمبیا آگـار و مـک کـانکی بـه صـورت خطـی، کشـت داده شدند. نمونـه‌هـای کشـت داده شـده در دو شـرایط هوازی و میکرو اِئروفیل بـه مـدت ۴۸ تـا ۷۲ سـاعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. پـس از طـی شـدن دوره انکوباسـیون، خصوصـیات ماکروسـکوپی کلنـی‌هـای رشـد کـرده در محـیط، مـورد بررسـی قـرار گرفت. در مرحله بعد، از این کلنی‌ها جهت انجام رنـگ آمیزی طبق پروتکل رنگ آمیزی گرم، استفاده گردیـد و خصوصـیات میکروسـکوپی آن‌هـا نیـز مـورد بررسـی واقع شد. در نهایـت توسـط مجموعـه‌ای از آزمـون‌هـای استاندارد بیوشیمیایی شامل تست‌های کاتالاز، اکسیداز، اوره آز، O/F و IMViC نسـبت بـه شناسـایی قطعـی ایزوله‌های *بروسلا* در سطح جنس، اقدام شد.

**۳- استخراج DNA:**

پـس از شناسـایی نهـائی جـنس *بروسـلا*، نسـبت بـه اسـتخراج DNA بـاکتری، جهـت انجـام تکنیـک‌هـای مولکولی اقدام شد. برای این منظور، از کیـت اسـتخراج DNA (GeneAll Biotechnology, Korea)، اسـتفاده گردید و مراحـل انجـام آن مطـابق بـا پروتکـل شـرکت سازنده کیت، دنبال شد. غلظت DNA استخراج شـده از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانو دراپ و ژل الکتروفورز آگارز سنجیده شد و جهت انجام آزمایشـات مولکـولی در دمای ۳۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

**٤- پرایمرها و تولید محصولات PCR:**

**آزمایش Bruce-ladder Multiplex PCR**

بـرای انجـام ایـن آزمـایش، از ۷ جفـت پرایمـر (Metabion international AG, Germany) اسـتفاده گردید (جدول ۴-۱). جهت آماده سازی محلول اصـلی به منظـور تولیـد محصـولات PCR، ۱۲/۵ میکرولیتـر از مستر میکس آماده ( Master Mix (2X), Ampliqon, Denmark)، ۱ میکرولیتـر از هـر جفـت پرایمـر (۵/. میکرولیتـر پرایمـر Forward و ۵/. میکرولیتـر پرایمر Reverse)، ۴ میکرولیتر DNA اسـتخراج شـده و ۱/۵ میکرولیتر آب مقطـر اسـتریل در میکروتیـوب‌هـای ۰/۲ میلی‌لیتری عاری از DNase به حجم ۲۵ میکرولیتـر با یکدیگر مخلوط شدند و سپس جهت انجـام واکـنش، در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شدند (جدول ۴-۲). جهت بررسی کیفی این واکنش، از سـویه‌هـای واکسـن Rev.1 و RB51 به عنوان کنتـرل مثبـت و از آب مقطـر استریل به عنوان کنترل منفی، استفاده گردید.

**جدول ٤-١: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمایش Bruce-ladder Multiplex PCR**

| پرایمر | توالی پرایمر | اندازه باند (bp) | منبع |
|---|---|---|---|
| BMEI0998f<br>BMEI0997r | F: 5'- ATC CTA TTG CCC CGA TAA GG -3'<br>R: 5'- GCT TCG CAT TTT CAC TGT AGC -3' | ۱۶۸۲ | ۱۶ |
| BMEI0535f<br>BMEI0536r | F: 5'- GCG CAT TCT TCG GTT ATG AA -3'<br>R: 5'- CGC AGG CGA AAA CAG CTA TAA -3' | ۴۵۰ | ۱۶ |
| BMEII0843f<br>BMEII0844r | F: 5'- TTT ACA CAG GCA ATC CAG CA -3'<br>R: 5'- GCG TCC AGT TGT TGT TGA TG -3' | ۱۰۷۱ | ۱۶ |
| BMEI1436f<br>BMEI1435r | F: 5'- ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT -3'<br>R: 5'- TTT ATC CAT CGC CCT GTC AC -3' | ۷۹۴ | ۱۶ |
| BMEII0428f<br>BMEII0428r | F: 5'- GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG -3'<br>R: 5'- AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG -3' | ۵۸۷ | ۱۶ |
| BMEII0987f<br>BMEII0987r | F: 5'- CGC AGA CAG TGA CCA TCA AA -3'<br>R: 5'- GTA TTC AGC CCC CGT TAC CT -3' | ۱۵۲ | ۱۶ |
| BMEI0752f<br>BMEI0752r | F: 5'- CAG GCA AAC CCT CAG AAG C -3'<br>R: 5'- GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA -3' | ۲۱۸ | ۱۶ |

**جدول ٤-٢: سیکل و برنامه‌های مربوط به واکنش Bruce-ladder multiplex PCR**

| مرحله | دناتوراسیون اولیه | دناتوراسیون | اتصال | بسط | تعداد سیکل‌ها | بسط نهائی |
|---|---|---|---|---|---|---|
| دما | ۹۵°C | ۹۵°C | ۶۴°C | ۷۲°C | ۲۸ | ۷۲°C |
| زمان | ۵ دقیقه | ۳۵ ثانیه | ۴۵ ثانیه | ۳ دقیقه | | ۵ دقیقه |

## آزمایش ERIC-PCR

برای انجام این آزمایش، از ۱ جفت پرایمر (Metabion international AG, Germany) استفاده گردید (جدول ۴-۳). جهت آماده سازی محلول اصلی به منظور تولید محصولات PCR، ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس آماده ( Master Mix (2X), Ampliqon, Denmark)، ۳ میکرولیتر از پرایمر (۱/۵ میکرولیتر پرایمر Forward و ۱/۵ میکرولیتر پرایمر Reverse)، ۳ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری عاری از DNase به حجم ۲۵ میکرولیتر با یکدیگر مخلوط شدند و سپس جهت انجام واکنش، در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شدند (جدول ۴-۴). جهت بررسی کیفی این واکنش نیز، از سویه‌های واکسن Rev.1 و RB51 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی، استفاده گردید.

**جدول ٤-٣: مشخصات پرایمر مورد استفاده جهت انجام آزمایش ERIC-PCR**

| پرایمر | توالی پرایمر | منبع |
|---|---|---|
| ERIC1<br>ERIC2 | F: 5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C -3'<br>R: 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G -3' | ۱۸ |

**جدول ٤-٤: سیکل و برنامه‌های مربوط به واکنش ERIC-PCR**

| مرحله | دناتوراسیون اولیه | دناتوراسیون | اتصال | بسط | تعداد سیکل‌ها | بسط نهائی |
|---|---|---|---|---|---|---|
| دما | ۹۵°C | ۹۵°C | ۴۵°C | ۷۲°C | ۳۰ | ۷۲°C |
| زمان | ۷ دقیقه | ۳۰ ثانیه | ۱ دقیقه | ۳ دقیقه | | ۱۵ دقیقه |

**۵- الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز:**

جهت انجام هر دو آزمایش مولکولی، از ژل آگارز با غلظت ۲ درصد استفاده گردید که به منظور تهیه آن، از ۲ گرم پودر آگارز (EURx biotechnology, Poland)، ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TAE (50X TAE buffer, Parstous, Iran) همراه با ۸ میکرولیتر رنگ Green viewer (Parstous, Iran) استفاده گردید. به منظور انجام آزمایش Bruce-ladder Multiplex PCR، مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر محصول PCR جهت بارگذاری نمونه ها در چاهک‌ها، استفاده گردید. جهت تعیین اندازه باندهای تشکیل شده، از مارکر 100 bp (Thermo Fisher Scientific, USA)، استفاده شد. در نهایت با ولتاژ بالا و در مدت زمان ۱ ساعت، جریان برقرار و ژل، الکتروفورز گردید. به منظور انجام آزمایش ERIC-PCR نیز مقدار ۸ میکرولیتر از هر محصول PCR استفاده شد و جریان با ولتاژ بالا و در مدت زمان ۱ ساعت و ۴۵ دقیقه در کنار یخ، برقرار و ژل، الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز، جهت مشاهده الگوهای باندی تشکیل شده، ژل مورد نظر در دستگاه ژل داک قرار داده شد و سپس نور UV برای چند ثانیه فعال گردید و تصویر حاصل از باندهای تشکیل شده در ژل، ثبت و نتایج حاصل از آن مورد آنالیز و بررسی قرار گرفت.

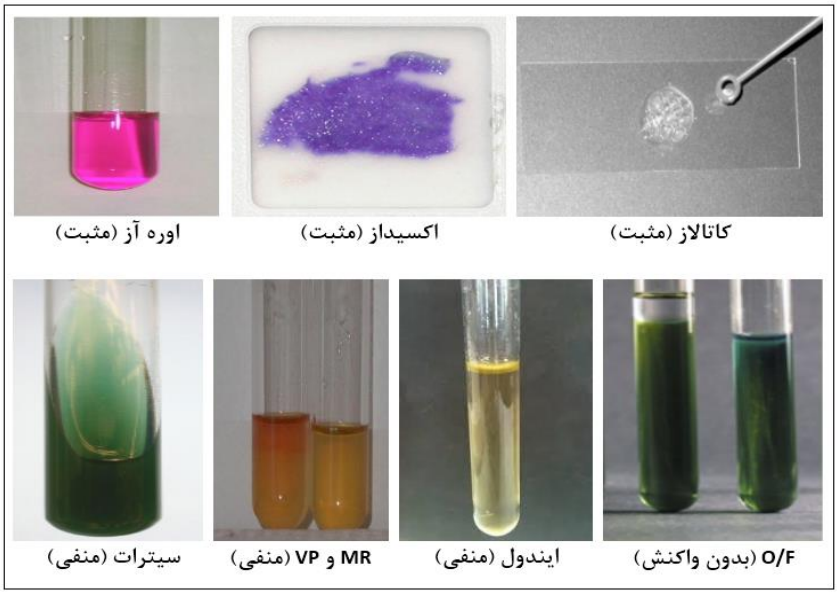
## نتایج

**۱- نتایج آزمایشات ماکروسکوپی و میکروسکوپی:**

بررسی خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی ایزوله‌های *بروسلا* نشان داد که پس از کشت باکتری در محیط کلمبیا آگار، کلنی‌های آن به صورت صاف، شفاف، آبی متمایل به سفید تا کهربائی ظاهر شدند. در رنگ آمیزی گرم نیز، باکتری به صورت کوکوباسیل‌های کوچک گرم منفی دیده شد.

**۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی:**

مجموعه‌ای از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی جهت شناسایی قطعی ایزوله‌های *بروسلا* در سطح جنس، انجام گرفت و نتایج حاصل از آن‌ها نشان داد که تمامی ایزوله‌ها در تست‌های کاتالاز، اکسیداز و اوره آز به صورت مثبت، در تست O/F به صورت بدون واکنش و در تست IMViC به صورت منفی بودند که این نتایج با خصوصیات بیوشیمیایی *بروسلا*، کاملاً مطابقت داشت.




**تصویر۲-۱: تصاویر مربوط به نتایج تست‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص ایزوله‌های بروسلا**

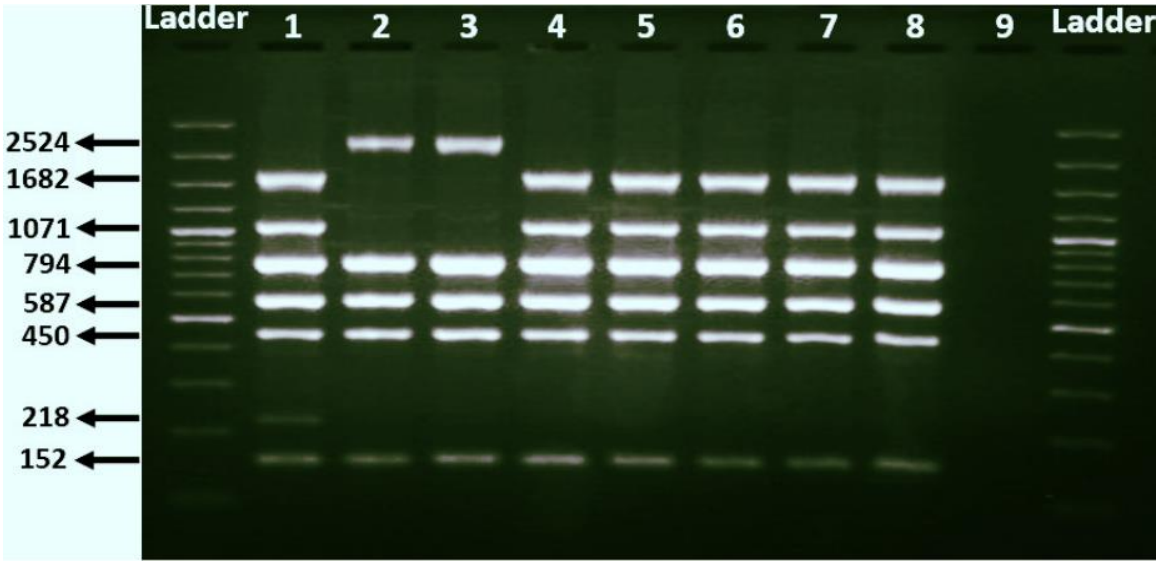
## ۳- نتایج آزمایشات مولکولی:

### آزمایش Bruce-ladder Multiplex PCR

بر اساس جدول زیر و الگوهای باندی به دست آمده در این آزمایش، مشخص شد که از میان ۶۰ ایزوله *بروسلا*، ۵۹ ایزوله متعلق به گونه *بروسلا ملی‌تنسیس* و ۱ ایزوله متعلق به گونه *بروسلا آبورتوس* بود. در میان ۶۰ ایزوله شناسایی شده، ۵۹ مورد از جنین‌های سقط شده در گوسفند و بز و ۱ مورد از جنین‌های سقط شده در گاوها، جداسازی گردید.

**جدول ۳-۱: الگوهای باندی مربوط به گونه‌های بیماریزا و سویه‌های واکسن *بروسلا***

| منبع | باندهای تشکیل شده | گونه‌های بیماری‌زا و سویه‌های واکسن |
|---|---|---|
| ۱۶ | ۱۵۲ – ۴۵۰ – ۵۸۷ – ۷۹۴ – ۱۶۸۲ | *B. abortus* |
| ۱۶ | ۱۵۲ – ۴۵۰ – ۵۸۷ – ۷۹۴ – ۱۰۷۱ – ۱۶۸۲ | *B. melitensis* |
| ۱۶ | ۱۵۲ – ۴۵۰ – ۵۸۷ – ۷۹۴ – ۱۰۷۱ | *B. ovis* |
| ۱۶ | ۱۵۲ – ۴۵۰ – ۷۹۴ – ۱۶۸۲ | *B. abortus S19* |
| ۱۶ | ۱۵۲ – ۴۵۰ – ۵۸۷ – ۷۹۴ – ۲۵۲۴ | *B. abortus RB51* |
| ۱۶ | ۱۵۲ – ۲۱۸ – ۴۵۰ – ۵۸۷ – ۷۹۴ – ۱۰۷۱ – ۱۶۸۲ | *B. melitensis Rev.1* |




**تصویر۳-۱: نتایج مربوط به تفکیک گونه‌های بیماریزا و سویه‌های واکسن *بروسلا* از یکدیگر**

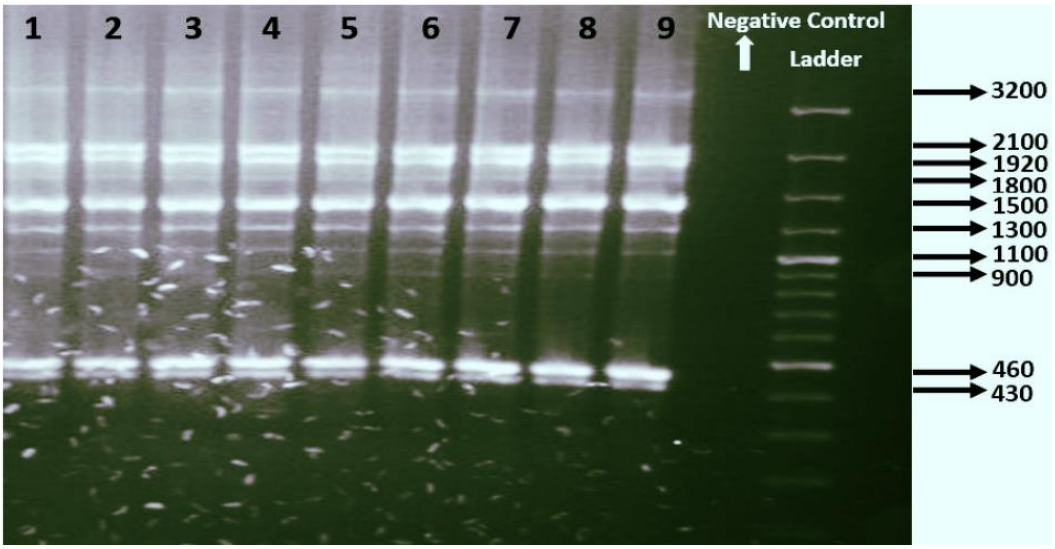
**با استفاده از تکنیک مولکولی Bruce-ladder Multiplex PCR**

Lane 1: *Brucella melitensis* rev-1 vaccine,
Lane 2,3: *Brucella abortus* rb51 vaccine,
Lane 4,5,6,7,8: *Brucella melitensis*, Lane 9: Negative Control

### آزمایش ERIC-PCR

پس از آنکه شناسایی قطعی جنس و گونه‌های مربوط به ایزوله‌های *بروسلا* انجام گرفت، از تکنیک ERIC-PCR جهت تایپینگ مولکولی و انگشت‌نگاری این ایزوله‌ها و به دنبال آن بررسی ارتباطات ژنتیکی و جغرافیایی آن‌ها، استفاده گردید. بررسی و آنالیز الگوهای باندی به دست آمده از ایزوله‌ها نشان داد که محدوده باندهای تشکیل یافته بین 430 bp تا 3200 bp می‌باشد و تنوع ژنتیکی و جغرافیایی قابل ملاحظه ای در

میان ایزوله‌های جداسازی شده وجود ندارد و همگی دارای الگوهای باندی مشابه و منشاء یکسانی می‌باشند.




**تصویر۳-۲: نتایج مربوط به تایپینگ مولکولی ایزوله‌های *بروسلا* با استفاده از تکنیک مولکولی ERIC-PCR**

## بحث و نتیجه‌گیری

بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام در سراسر جهان محسوب می‌گردد. این بیماری در انسان با نام تب مالت و در حیوانات با نام بروسلوز شناخته می‌شود (۱۱). با وجود اینکه از شناخت بروسلوز تاکنون بیش از یک قرن سپری شده است اما این بیماری همچنان در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و دام مطرح می‌باشد (۱۲). کنترل بروسلوز در حیوانات و به خصوص دام‌های اهلی، منجر به کاهش چشم‌گیر بیماری در جمعیت انسانی می‌گردد. برای رسیدن به این هدف می بایست به بررسی اپیدمیولوژیک بیماری و همچنین عوامل موثر در گسترش آن در جمعیت دامی پرداخته شود (۱۹). به همین منظور، در این مطالعه به بررسی اپیدمیولوژیک بروسلوز در جمعیت دام‌های اهلی مربوط به مناطق شمالی و شرقی ایران با استفاده از تکنیک‌های مولکولی پرداخته شد. بر اساس نتایج به دست آمده، از میان ۱۷۰ نمونه جمع آوری شده، ۶۰ ایزوله *بروسلا* (۲۶٪) جداسازی گردید که در این میان، ۵۹ ایزوله (۹۸٪)، متعلق به گونه *بروسلا ملی‌تنسیس* و ۱ ایزوله (۲٪)، متعلق به گونه *بروسلا آبورتوس* بود.

در سال ۲۰۱۳، شفیعی و همکاران در مطالعه خود، به شناسایی *بروسلا ملی‌تنسیس* و *بروسلا آبورتوس* در جمعیت گاوها و گوسفندان استان کردستان با استفاده از روش‌های مولکولی، پرداختند و نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن بود که ۷۰ درصد موارد ابتلا به بیماری، ناشی از گونه *بروسلا ملی‌تنسیس* و ۳۰ درصد موارد، ناشی از گونه *بروسلا آبورتوس* است (۲۵). در سال ۲۰۱۴، صادقی و همکاران در پژوهشی که در استان مازندران انجام شد، به بررسی اپیدمیولوژیک بروسلوز در جمعیت دام‌های اهلی این استان پرداختند و نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که ۱۰۰ درصد موارد شناسایی شده، مربوط به گونه *بروسلا ملی‌تنسیس* است (۲۴). در سال ۲۰۱۶، عربستانی و همکاران در مطالعه خود با استفاده از تکنیک‌های مولکولی، به شناسایی

گونه‌های بیماریزا مهم *بروسلا* در استان همدان، پرداختند و با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، ۹۰ درصد موارد شناسایی شده مربوط به گونه *بروسلا ملی تنسیس* بود (۲). در سال ۲۰۱۷، بروجنی و همکاران در استان چهارمحال و بختیاری، به ارزیابی اپیدمیولوژیکی بروسلوز در جمعیت گاوها، گوسفندان و بزهای شهرستان بروجن، پرداختند و نتایج این مطالعه نشان داد که ۹۹ درصد موارد، مربوط به *بروسلا ملی‌تنسیس* می‌باشد (۵). در سال ۲۰۱۸، بهمنی و همکاران در استان تهران و همدان، به بررسی میزان شیوع بروسلوز در جمعیت دام‌های اهلی این استان‌ها پرداختند و نتایج مطالعه آن‌ها بیانگر آن بود که از میان نمونه‌های جمع آوری شده، ۸۷ درصد موارد مربوط به گونه *بروسلا ملی‌تنسیس* و ۱۳ درصد موارد نیز، مربوط به گونه *بروسلا آبورتوس* می‌شد (۳). در سال ۲۰۱۳، آپاریسیو در کشور مکزیک، به بررسی اپیدمیلوژی بروسلوز در دام‌های اهلی پرداخت و نتایج حاصل از مطالعه او نشان داد که به ترتیب گونه‌های *بروسلا ملی‌تنسیس*، *بروسلا سوئیس* و *بروسلا آبورتوس* از فراوانی و اهمیت بیشتری برخوردار هستند (۱). در سال ۲۰۱۷، اُلیوِریا و همکاران در کشور برزیل، در مطالعه خود به ارزیابی اپیدمیولوژیک بروسلوز با استفاده از روش‌های مولکولی پرداختند و نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن بود که گونه *بروسلا آبورتوس* از فراوانی بیشتری نسبت به سایر گونه‌ها برخوردار است (۲۰). در سال ۲۰۱۸، کائو و همکاران در کشور چین، به بررسی میزان شیوع بروسلوز در جمعیت دامی این کشور پرداختند و نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اکثر موارد ابتلا به بروسلوز، مربوط به گوسفندان و گونه *بروسلا ملی‌تنسیس* می‌باشد (۶).

مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مربوط به پژوهش‌های صورت گرفته در مناطق مختلف کشور، حاکی از ارتباط نزدیک و همخوانی کامل آن‌ها با یکدیگر است. به نحوی که در تمام مطالعات و همچنین در مطالعه حاضر، درصد بالایی از موارد ابتلا به بروسلوز در جمعیت دام‌های اهلی کشور، مربوط به گونه *بروسلا ملی‌تنسیس* می‌شد. از طرفی فراوانی یک گونه بیماریزا در هر منطقه، بستگی به نوع دام‌های آن منطقه دارد. به این ترتیب که بر اساس نتایج این مطالعه، از آنجایی که تراکم جمعیت گوسفند و بز در مناطق شمال و شرق کشور نسبت به سایر دام‌ها، بیشتر است لذا گونه *بروسلا ملی‌تنسیس* که میزبان طبیعی آن، گوسفند و بز می‌باشد، از فراوانی بیشتری نسبت به سایر گونه‌های بیماریزا *بروسلا*، برخوردار می‌باشد. شایان ذکر است که این وضعیت برای سایر مناطق کشور نیز به همین صورت می‌باشد، به نحوی که بر اساس نتایج به دست آمده، گونه *بروسلا ملی‌تنسیس* به عنوان گونه غالب ایجاد کننده بروسلوز در ایران، محسوب می گردد. با مقایسه نتایج این پژوهش و مطالعات خارج از کشور، مشخص شد که علاوه بر ایران، در اکثر کشورهای جهان نیز، گونه *بروسلا ملی‌تنسیس* از فراوانی بیشتری نسبت به سایر گونه‌های بیماریزای *بروسلا* برخوردار است. با این حال از تفاوت‌هایی که در میان مطالعات داخل و خارج از کشور وجود دارد، می‌توان به اهمیت بیماری زایی *بروسلا سوئیس* در جمعیت انسانی کشورهای خارج اشاره کرد، موضوعی که در ایران اهمیت چندانی ندارد.

با وجود اینکه تا کنون مطالعه‌ای مشابه با این پژوهش در ایران انجام نشده است، با این حال با مقایسه این پژوهش با مطالعاتی که در زمینه اپیدمیولوژی بروسلوز در کشور انجام شده است، به نظر می‌رسد که تکنیک Bruce-ladder که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، نسبت به سایر تکنیک‌های مولکولی انجام شده در مطالعات دیگران، از حساسیت، قدرت تمایز، دقت،

سرعت و کاربرد بالاتری جهت شناسایی *بروسلا* در سطح جنس و گونه برخوردار می‌باشد. در مورد تکنیک ERIC-PCR نیز مطالعه‌ای مشابه در کشور وجود ندارد. با این حال در مقایسه با مطالعه‌ای نسبتاً مشابه که توسط مصطفی و همکاران در کشور کویت انجام گرفت (۱۴)، به نظر می‌رسد که به طور کلی، همانند مطالعه حاضر، جدایه‌های *بروسلا* از نظر الگوهای ژنتیکی و تایپینگ مولکولی، از تنوع بالایی برخوردار نیستند و اکثراً دارای الگوهای ژنتیکی مشابهی می‌باشند. حتی در مقایسه با تکنیک‌های تایپینگ مولکولی دقیق‌تر و حساس‌تری همچون MLVA و MLST که اخیراً از آن‌ها در مطالعات مختلفی که توسط لیو و همکاران و همچنین پیائو و همکاران در کشور چین استفاده شده است، مشاهده می‌شود که حتی در این مطالعات نیز، تشابه ژنتیکی جدایه‌های *بروسلا* با درصد بالایی وجود دارد که این موضوع در مطالعه حاضر نیز کاملاً مشهود بود، به نحوی که تمامی جدایه‌ها دارای الگوی ژنتیکی مشابهی بودند (۲۲،۱۵).

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد، که تکنیک Bruce-ladder یک روش سریع، ایمن و کاربردی جهت شناسایی جنس *بروسلا* و تمام گونه‌های آن و همچنین سویه‌های واکسن در طی یک مرحله واکنش PCR می‌باشد. بنابراین می‌توان از این روش به عنوان یک تکنیک تشخیصی بسیار مناسب، در مطالعات اپیدمیولوژیک بروسلوز و همچنین در آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده نمود. با وجود اینکه تکنیک ERIC-PCR در بسیاری از مطالعات روش قدرتمندی در تمایز مولکولی باکتری‌ها بشمار می‌رود، در صورت امکان بهتر است که برای تایید نتایج این مطالعه از تکنیک‌های دقیق‌تر و با قدرت تفکیک بالا همچون MLVA و MLST نیز جهت مقایسه استفاده گردد. موضوعی که در این مطالعه حائز اهمیت است، میزان شیوع بالای گونه *ملی‌تنسیس* می‌باشد که با توجه به اینکه درصد بالایی از نمونه‌های جمع آوری شده در این مطالعه به جنین‌های سقط شده گوسفندان مربوط می‌شد، این موضوع قابل پیش بینی بود. با این حال لازم است نسبت به گونه *ملی‌تنسیس* و واکسیناسیون به موقع و هدفمند میزبان‌های اصلی آن، توجه بیشتری مبذول گردد.

## تشکر و قدردانی

با احترام فراوان از جناب آقای دکتر مهدی عسکری، خانم دکتر فاضل، خانم دکتر رحمانی، خانم مهندس باقر زاده، آقای دکتر زواری و همچنین جناب آقای دکتر سیفی به خاطر کمک و حمایت‌های بی دریغشان، سپاسگزاری می‌نماییم.

## منابع

1. Aparicio ED. (2013). Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *International Office of Epizootics.* **32:** 53-60.

2. Arabestani MR, Gholami A, Alikhani MY, Bahmani N, Hashemi SH. (2016). Evaluation of Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction in Detecting Common Species of *Brucella*. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences.* **27:** 97-107.

3. Bahmani N, Hashemi SH, Arabestani MR, Mirnejad R, Masjedianjazi F, Keramat F. (2018). Molecular Typing of *Brucella* Species Isolated from Humans and Animals Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Technique. *Archives of Clinical Infectious Diseases.* (In Press).

4. Boluki Z, Bahonar A, Amiri K, Akbarin H, Sharifi H, Akbari Sari A. (2017). Estimation of Economic Direct Losses due to Livestock Brucellosis in Iran (2003-2014). *Iranian Journal of Epidemiology*. **12:** 12-21.

5. Boroujeni H, Boroujeni S, Kaboli H. Epidemiological Evaluation of Brucellosis Disease in Borujen. *1st National Congress on*

(Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *Journal of Clinical Microbiology.* **46:** 3484-7.
17. McDermott J, Grace D, Zinsstag J. (2013). Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Revue Scientifique Et Technique.* **32:** 249-61.
18. Mustafa AS, Habibi N, Osman A, Shaheed F, Khan MW. (2017). Species identification and molecular typing of human *Brucella* isolates from Kuwait. *Plos One.* **12:** 111-30.
19. Ntirandekura JB, Matemba LE, Kimera SI, Muma JB, Karimuribo ED. (2018). Association of Brucellosis with Abortion Prevalence in Humans and Animals in Africa: A Review. *African Journal of Reproductive Health.* **22:** 120-36.
20. Oliveira MS, Dorneles EM, Soares PM, Junior AA, Orzil L, de Souza PG. (2017). Molecular epidemiology of *Brucella abortus* isolated from cattle in Brazil, 2009–2013. *Acta Tropica.* **166:** 106-13.
21. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet infectious diseases.* **6:** 91-9.
22. Piao DR, Liu X, Di DD, Xiao P, Zhao ZZ, Xu LQ. (2018). Genetic polymorphisms identify in species/biovars of *Brucella* isolated in China between 1953 and 2013 by MLST. *BioMed Central Microbiology*. **18:** 7-14.
23. Ramin B, MacPherson P. (2010). Human brucellosis. *British Medical Journal*. **341:** c4545.
24. Sadeghi A, Rezaei Pour V, Mokhtari Sang Cheshmeh M. (2014). Seroepidemiological study of brucellosis in sheep and goat population of Mazandaran province during 2006-2010. *Veterinary Researches and Biological Products.* **27:** 17-24.
25. Shafiee B, Ahmadi M, Dashtmalchi Saee H. (2013). Diagnosis of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in milk of cattle and sheep in Kurdistan province using polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Microbiology.* **2:** 127-35.
26. Yoon H, Moon OK, Lee SH, Lee WC, Her M, Jeong W. (2014). Epidemiology of brucellosis among cattle in Korea from 2001 to 2011. *Journal of Veterinary Science.* **15:** 537-43.
27. Yumuk Z, O'Callaghan D. (2012). Brucellosis in Turkey—an overview. *International Journal of Infectious Diseases.* **16:** 228-35.

*Zoonoses, Isfahan, Isfahan Veterinary Organization.* **1:** 59-60.
6. Cao X, Li S, Li Z, Liu Z, Ma J, Lou Z. (2018). Enzootic situation and molecular epidemiology of *Brucella* in livestock from 2011 to 2015 in Qingyang, China. *Emerging Microbes & Infections.* **7:** 58-67.
7. Christopher S, Umapathy BL, Ravikumar KL. (2010). Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *Journal of Laboratory Physicians.* **2:** 55-60.
8. Godfroid J. (2018). *Brucella* spp. at the Wildlife-Livestock Interface: An Evolutionary Trajectory through a Livestock-to-Wildlife "Host Jump"?. *Veterinary Sciences.* **5:** 81-90.
9. Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. (2010). Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian Medical Journal.* **51:** 296-305.
10. Haran M, Agarwal A, Kupfer Y, Seneviratne C, Chawla K, Tessler S. (2011). Brucellosis presenting as septic shock. *British Medical Journal case reports.* **2011:** bcr1220103586.
11. Hashemifar I, Yadegar A, Jazi FM, Amirmozafari N. (2017). Molecular prevalence of putative virulence-associated genes in *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* isolates from human and livestock specimens in Iran. *Microbial Pathogenesis.* **105:** 334-9.
12. Júnior GN, Megid J, Mathias LA, Paulin L, Vicente AF, Cortez A. (2017). Performance of microbiological, serological, molecular, and modified seminal plasma methods in the diagnosis of *Brucella abortus* in semen and serum of bovine bulls. *Biologicals.* **48:** 6-9.
13. Leylabadlo HE, Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. (2015). Brucellosis in Iran: why not eradicated?. *Clinical Infectious Diseases.* **61:** 1629-30.
14. Linares M, Hicks C, Bowman AS, Hoet A, Stull JW. (2018). Infectious agents in feral swine in Ohio, USA (2009-2015): a low but evolving risk to agriculture and public health. *Veterinary and Animal Science*. **6:** 81-85.
15. Liu ZG, Di DD, Wang M, Liu RH, Zhao HY, Piao DR. (2017). MLVA genotyping characteristics of human *Brucella melitensis* isolated from Ulanqab of Inner Mongolia, *China. Frontiers in Microbiology.* **8:** 6-16.

16. López-Goñi I, García-Yoldi D, Marin CM, De Miguel MJ, Munoz PM, Blasco JM. (2008). Evaluation of a multiplex PCR assay

*Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 2, 2019*

# Differentiation and molecular typing of *Brucella* species isolated from aborted of livestock in the North and East of Iran

***Ali Nemati[1], Gholamreza Hashemi Tabar[*2], Mehrnaz Rad[3]***

*1- BSc, MSc, Ph.D student of Bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad.*

*2- DVM, Ph.D, Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad.*

*3- DVM, Ph.D, Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad.*

*Received: 23 April 2019* *Accepted: 17 February 2020*

***Abstract***

*Brucellosis has always been among the most important economic and public health issues, somehow, each year it causes huge economic losses for the livestock industries. On the other hand, since brucellosis is a zoonotic disease, the importance of the issue in terms of public health is doubled. Therefore, it is necessary that by conducting epidemiological studies as a first step, identify the agent and then control and reduce the incidence of the disease. In this study, 170 samples were collected from aborted livestock in sheep, goats and cattle in the Golestan and Razavi Khorasan provinces, between 2015-2018. After the autopsy, different organs of the fetuses were cultured on the Columbia agar and MacConkey agar and then all of the samples were examined by using gram staining and standard biochemical tests. Overall, 60 Brucella spp. isolates were recovered and eventually, molecular typing and identification of Brucella spp. were conducted by using molecular techniques including Bruce-ladder Multiplex PCR and ERIC-PCR. Out of 60 Brucella spp. isolates, 59 strains were identified as Brucella melitensis and 1 strain as Brucella abortus, also all isolates despite their different geographic locations, had the same genetic patterns. The Bruce-ladder Multiplex PCR seemed to be a quick, safe and cost-effective method for molecular identification of Brucella isolates at the genus and species level. Although the ERIC-PCR technique in many studies is a powerful method for molecular differentiation of bacteria, it is better to use more precise and high-resolution techniques such as MLVA and MLST for confirmation the results of this study.*

***Keywords: Brucella*, Livestock, Bruce-ladder Multiplex PCR, ERIC-PCR.**

** Corresponding Author: Gholamreza Hashemi Tabar*

*Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.*

*Tel: 051 3880 5650*

*E-mail: hashemit@um.ac.ir*