

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

علی نعمتی<sup>۱</sup>، غلامرضا هاشمی تبار<sup>۲\*</sup>، مهرناز راد<sup>۳</sup>

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 بروسلاز یا تب مالت، همواره از دو بعد اقتصادی و بهداشتی حائز اهمیت بوده به نحوی که هر ساله خسارت های اقتصادی فراوانی را برای سرمایه دامی کشور به بار می آورد. از سوی دیگر از آنجایی که بروسلاز یک بیماری مشترک بین انسان و دام می باشد، اهمیت موضوع از نظر بهداشت عمومی دو چندان می شود. 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 سال های ۹۴ تا ۹۷ از استان های گلستان و خراسان رضوی جمع آوری گردید. پس از کالبد شکافی، از ارگان های مختلف جنین ها در محیط کلمبیا آگار و مک کانکی کشت داده شد و با استفاده از رنگ آمیزی گرم و تست های استاندارد بیوشیمیایی، تمام نمونه ها مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع، ۶۰ ایزوله بروسلا شناسایی گردید. در نهایت با استفاده از تکنیک های مولکولی Bruce-ladder Multiplex PCR و ERIC-PCR، تفکیک گونه و تایپینگ مولکولی ایزوله های جداسازی شده انجام پذیرفت. از میان ۶۰ ایزوله شناسایی شده، ۵۹ گونه مربوط به بروسلا ملی تنسیس و ۱ گونه مربوط به بروسلا آبورتوس بود. تمامی ایزوله های شناسایی شده، علی رغم 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 باکتری ها بشمار می رود، در صورت امکان بهتر است که برای تایید نتایج این مطالعه از تکنیک های دقیق تر و با قدرت تفکیک بالا همچون MLVA و MLST نیز استفاده گردد.

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

\* نویسنده مسئول: غلامرضا هاشمی تبار

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

تلفن: ۰۵۱۳۸۱۰۵۶۵۰

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 سالانه 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، تزیقات، 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 آگزوتوکسین و سایر آنزیم‌های خارج سلولی هستند. به طور کلی فاکتور ویرولانسی 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

DNA (GeneAll Biotechnology, Korea)، استفاده گردید و مراحل انجام آن مطابق با پروتکل شرکت سازنده کیت، دنبال شد. غلظت DNA استخراج شده از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانو دراپ و ژل الکتروفورز آگارز سنجیده شد و جهت انجام آزمایشات مولکولی در دمای ۳۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

#### ۴- پرایمرها و تولید محصولات PCR:

##### آزمایش Bruce-ladder Multiplex PCR

برای انجام این آزمایش، از ۷ جفت پرایمر (Metabion international AG, Germany) استفاده گردید (جدول ۴-۱). جهت آماده سازی محلول اصلی به منظور تولید محصولات PCR، ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس آماده (Master Mix (2X), Ampliqon, Denmark)، ۱ میکرولیتر از هر جفت پرایمر (۵/۰ میکرولیتر پرایمر Forward و ۵/۰ میکرولیتر پرایمر Reverse)، ۴ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۱/۵ 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 ۴-۲). جهت بررسی کیفی این واکنش، از سویه‌های واکنش Rev.1 و RB51 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی، استفاده گردید.

که اکثراً استان‌های گلستان و خراسان رضوی 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 آگار و مک کانکی به صورت خطی، کشت داده شدند. نمونه‌های کشت داده شده در دو شرایط هوازی و میکرو ائرو فیل به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. پس از طی شدن دوره انکوباسیون، خصوصیات ماکروسکوپی کلنی‌های رشد کرده در محیط، مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد، از این کلنی‌ها جهت انجام رنگ آمیزی طبق پروتکل رنگ آمیزی گرم، استفاده گردید و خصوصیات میکروسکوپی آن‌ها نیز مورد بررسی واقع شد. در نهایت توسط مجموعه‌ای از آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی شامل تست‌های کاتالاز، اکسیداز، اوره آز، O/F و IMViC نسبت به شناسایی قطعی ایزوله‌های بروسلا در سطح جنس، اقدام شد.

#### ۳- استخراج DNA:

پس از شناسایی نهائی جنس بروسلا، نسبت به استخراج DNA باکتری، جهت انجام تکنیک‌های مولکولی اقدام شد. برای این منظور، از کیت استخراج

جدول ۱-۴: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمایش Bruce-ladder Multiplex PCR

پرایمر	توالی پرایمر	اندازه باند (bp)	منبع
BMEI0998f BMEI0997r	F: 5'- ATC CTA TTG CCC CGA TAA GG -3' R: 5'- GCT TCG CAT TTT CAC TGT AGC -3'	۱۶۸۲	۱۶
BMEI0535f BMEI0536r	F: 5'- GCG CAT TCT TCG GTT ATG AA -3' R: 5'- CGC AGG CGA AAA CAG CTA TAA -3'	۴۵۰	۱۶
BMEI0843f BMEI0844r	F: 5'- TTT ACA CAG GCA ATC CAG CA -3' R: 5'- GCG TCC AGT TGT TGT TGA TG -3'	۱۰۷۱	۱۶
BMEI1436f BMEI1435r	F: 5'- ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT -3' R: 5'- TTT ATC CAT CGC CCT GTC AC -3'	۷۹۴	۱۶
BMEI0428f BMEI0428r	F: 5'- GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG -3' R: 5'- AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG -3'	۵۸۷	۱۶
BMEI0987f BMEI0987r	F: 5'- CGC AGA CAG TGA CCA TCA AA -3' R: 5'- GTA TTC AGC CCC CGT TAC CT -3'	۱۵۲	۱۶
BMEI0752f BMEI0752r	F: 5'- CAG GCA AAC CCT CAG AAG C -3' R: 5'- GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA -3'	۲۱۸	۱۶

جدول ۲-۴: سیکل و برنامه‌های مربوط به واکنش Bruce-ladder multiplex PCR

مرحله	دنا تورا سیون اولیه	دنا تورا سیون	اتصال	بسط	تعداد سیکل‌ها	بسط نهایی
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

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 واکنس Rev.1 و RB51 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی، استفاده گردید.

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

جدول ۳-۴: مشخصات پرایمر مورد استفاده جهت انجام آزمایش ERIC-PCR

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

جدول ۴-۴: سیکل و برنامه‌های مربوط به واکنش ERIC-PCR

مرحله	دنا تورا سیون اولیه	دنا تورا سیون	اتصال	بسط	تعداد سیکل‌ها	بسط نهایی
دما	۹۵°C	۹۵°C	۴۵°C	۷۲°C	۳۰	۷۲°C
زمان	۷ دقیقه	۳۰ ثانیه	۱ دقیقه	۳ دقیقه		۱۵ دقیقه

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:

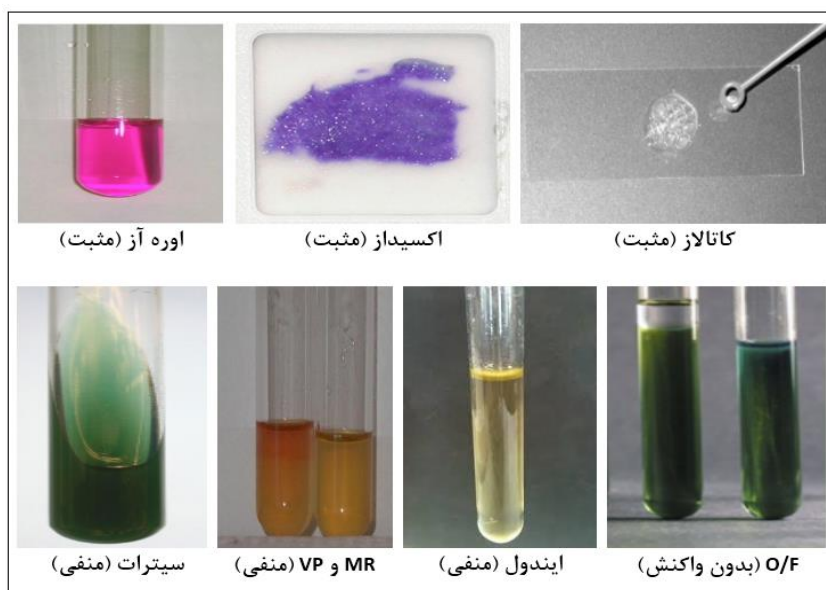
بررسی خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی ایزوله‌های بروسلا نشان داد که پس از کشت باکتری در محیط کلمبیا آگار، کلنی‌های آن به صورت صاف، شفاف، آبی متمایل به سفید تا کهربائی ظاهر شدند. در رنگ آمیزی گرم نیز، باکتری به صورت کوکوباسیل‌های کوچک گرم منفی دیده شد.

#### 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.

#### 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 (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 نمونه‌ها 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 باندهای تشکیل شده، ژل مورد نظر در دستگاه ژل داک قرار داده شد و سپس نور UV



تصویر ۲-۱: تصاویر مربوط به نتایج تست‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص ایزوله‌های بروسلا

### ۳- نتایج آزمایشات مولکولی:

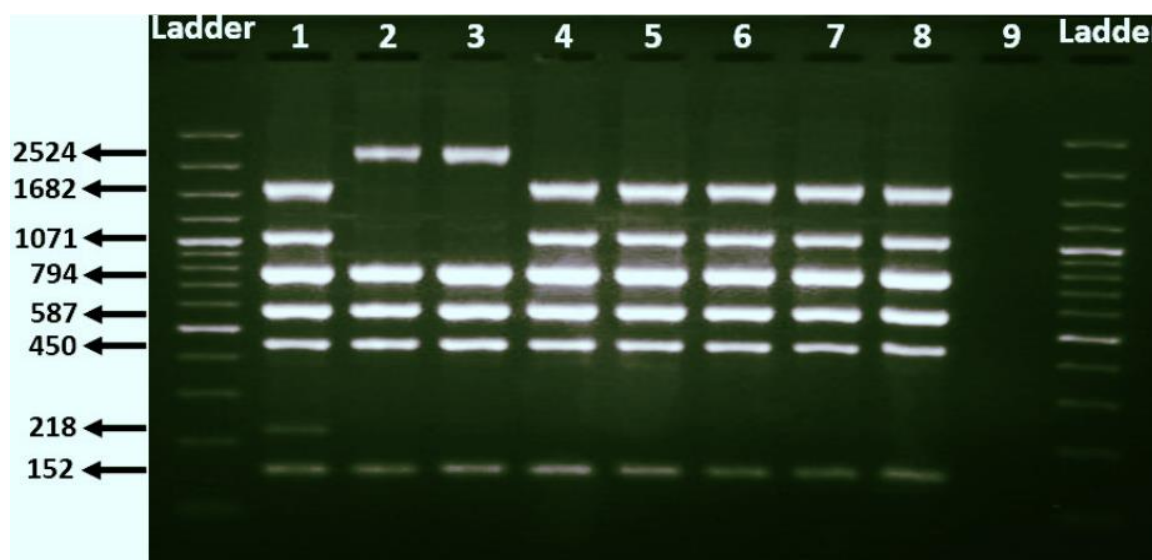
#### آزمایش Bruce-ladder Multiplex PCR

بر اساس جدول زیر و الگوهای بانندی به دست آمده در این آزمایش، مشخص شد که از میان ۶۰ ایزوله بروسلا، ۵۹ ایزوله متعلق به گونه

بروسلا ملی-تنسیس 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 ۱-۳: الگوهای بانندی مربوط به گونه‌های بیماریزا و سویه‌های واکسن بروسلا

گونه‌های بیماریزا و سویه‌های واکسن	باندهای تشکیل شده	متبح
<i>B. abortus</i>	۱۵۲ - ۴۵۰ - ۵۸۷ - ۷۹۴ - ۱۶۸۲	۱۶
<i>B. melitensis</i>	۱۵۲ - ۴۵۰ - ۵۸۷ - ۷۹۴ - ۱۰۷۱ - ۱۶۸۲	۱۶
<i>B. ovis</i>	۱۵۲ - ۴۵۰ - ۵۸۷ - ۷۹۴ - ۱۰۷۱	۱۶
<i>B. abortus S19</i>	۱۵۲ - ۴۵۰ - ۷۹۴ - ۱۶۸۲	۱۶
<i>B. abortus RB51</i>	۲۵۲۴ - ۷۹۴ - ۵۸۷ - ۴۵۰ - ۱۵۲	۱۶
<i>B. melitensis Rev.1</i>	۱۵۲ - ۲۱۸ - ۴۵۰ - ۵۸۷ - ۷۹۴ - ۱۰۷۱ - ۱۶۸۲	۱۶



تصویر ۱-۳: نتایج مربوط به تفکیک گونه‌های بیماریزا و سویه‌های واکسن بروسلا از یکدیگر

با استفاده از تکنیک مولکولی Bruce-ladder Multiplex PCR

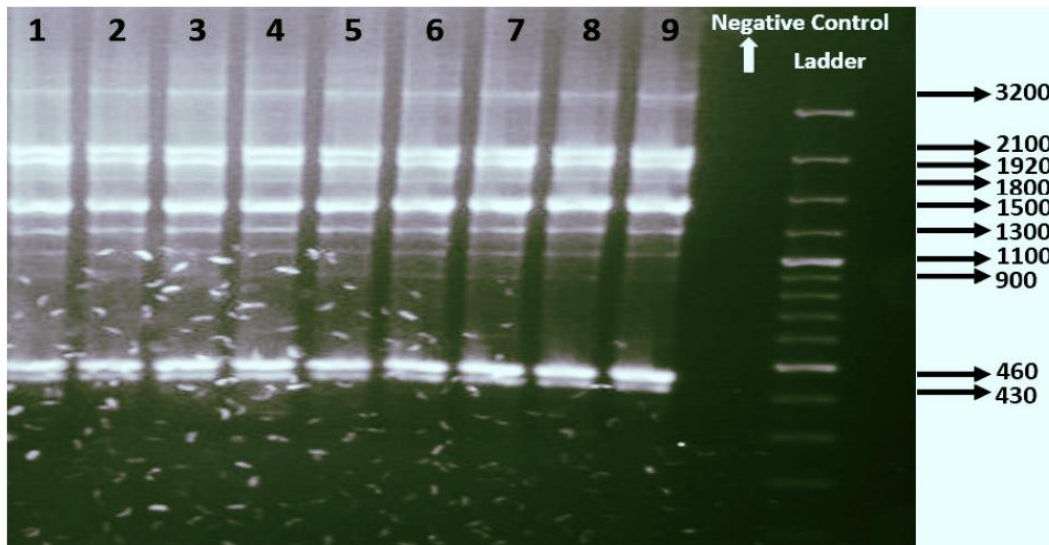
Lane 1: *Brucella melitensis* rev-1 vaccine,  
Lane 2,3: *Brucella abortus* rb51 vaccine,  
Lane 4,5,6,7,8: *Brucella melitensis*, Lane 9: Negative Control

جغرافیایی آن‌ها، استفاده گردید. بررسی و آنالیز الگوهای بانندی 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

#### 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

میان ایزوله های جداسازی شده وجود ندارد و همگی دارای الگوهای بانندی مشابه و منشاء یکسانی می باشند.



تصویر ۳-۲: نتایج مربوط به تایپینگ مولکولی ایزوله های بروسلا با استفاده از تکنیک مولکولی ERIC-PCR

نمونه جمع آوری شده، ۶۰ ایزوله بروسلا (۲۶٪) جداسازی گردید که در این میان، ۵۹ ایزوله (۹۸٪)، متعلق به گونه بروسلا ملی تنسیس و ۱ ایزوله (۲٪)، متعلق به گونه بروسلا آبورتوس بود. در سال ۲۰۱۳، شفيعی و همکاران در مطالعه خود، به شناسایی بروسلا ملی تنسیس و بروسلا آبورتوس در جمعیت گاوها و گوسفندان استان کردستان با استفاده از روش های مولکولی، پرداختند و نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن بود که ۷۰ درصد موارد ابتلا به بیماری، ناشی از گونه بروسلا ملی تنسیس 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 بروسلاز در جمعیت دام های اهلی این استان پرداختند و نتایج پژوهش آن ها نشان داد که ۱۰۰ درصد موارد شناسایی شده، مربوط به گونه بروسلا ملی تنسیس است (۲۴). در سال ۲۰۱۶، عربستانی و همکاران در مطالعه خود با استفاده از تکنیک های مولکولی، به شناسایی

### بحث و نتیجه گیری

بروسلاز یکی از مهم ترین بیماری های مشترک بین انسان و دام در سراسر جهان محسوب می گردد. این بیماری در انسان با نام تب مالت و در حیوانات با نام بروسلاز شناخته می شود (۱۱). با وجود اینکه از شناخت بروسلاز تاکنون بیش از یک قرن سپری شده است اما این بیماری همچنان در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران به عنوان یکی از مهم ترین بیماری های مشترک انسان و دام مطرح می باشد (۱۲). کنترل بروسلاز در حیوانات و به خصوص دام های اهلی، منجر به کاهش چشم گیر بیماری در جمعیت انسانی می گردد. 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 بروسلاز در جمعیت دام های اهلی مربوط به مناطق شمالی و شرقی ایران با استفاده از تکنیک های مولکولی پرداخته شد. بر اساس نتایج به دست آمده، از میان ۱۷۰

حاکمی 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 ملی تنسیس 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 ملی تنسیس 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 ملی تنسیس به عنوان گونه غالب ایجاد کننده بروسلوز در ایران، محسوب می‌گردد. با مقایسه نتایج این پژوهش و مطالعات خارج از کشور، مشخص شد که علاوه بر ایران، در اکثر کشورهای جهان نیز، گونه بروسلا ملی تنسیس 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،

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 ملی تنسیس 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 ملی تنسیس و ۱۳ درصد موارد نیز، مربوط به گونه بروسلا آبورتوس می‌شد (۳). در سال ۲۰۱۳، آپاریسیو در کشور مکزیک، به بررسی اپیدمیولوژی بروسلوز در دام‌های اهلی پرداخت و نتایج حاصل از مطالعه او نشان داد که به ترتیب گونه‌های بروسلا ملی تنسیس، بروسلا سوئیس و بروسلا آبورتوس از فراوانی و اهمیت بیشتری برخوردار هستند (۱). در سال ۲۰۱۷، اُلوریا و همکاران در کشور برزیل، در مطالعه خود به ارزیابی اپیدمیولوژیکی 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 ملی تنسیس می‌باشد (۶).

مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مربوط به پژوهش‌های صورت گرفته در مناطق مختلف کشور،



همچون MLVA و MLST نیز جهت مقایسه استفاده گردد. موضوعی که در این مطالعه حائز اهمیت است، میزان شیوع بالای گونه ملی تنسیس می باشد که با توجه به اینکه درصد بالایی از نمونه های جمع آوری شده در این مطالعه به جنین های سقط شده گوسفندان مربوط می شد، این موضوع قابل پیش بینی بود. با این حال لازم است نسبت به گونه ملی تنسیس و واکسیناسیون به موقع و هدفمند میزبان های 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 حمایت های بی دریغشان، سپاسگزاری می نمایم.

### 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, Masjedjazi 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*

سرعت و کاربرد بالاتری جهت شناسایی بروسلا در سطح جنس و گونه برخوردار می باشد. در مورد تکنیک ERIC-PCR نیز مطالعه ای مشابه در کشور وجود ندارد. با این حال در مقایسه با مطالعه ای نسبتاً مشابه که توسط مصطفی و همکاران در کشور کویت انجام گرفت (۱۴)، به نظر می رسد که به طور کلی، همانند مطالعه حاضر، جدایه های بروسلا از نظر الگوهای ژنتیکی و تایپینگ مولکولی، از تنوع بالایی برخوردار نیستند و اکثراً دارای الگوهای ژنتیکی مشابهی می باشند. حتی در مقایسه با تکنیک های تایپینگ مولکولی دقیق تر و حساس تر همچون MLVA و MLST که اخیراً از آن ها در مطالعات مختلفی که توسط لیو و همکاران و همچنین پیانو و همکاران در کشور چین استفاده شده است، مشاهده می شود که حتی در این مطالعات نیز، تشابه ژنتیکی جدایه های بروسلا با درصد بالایی وجود دارد که این موضوع در مطالعه حاضر نیز کاملاً مشهود بود، به نحوی که تمامی جدایه ها 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 گونه های آن و همچنین سویه های واکنش در طی یک مرحله واکنش PCR می باشد. بنابراین می توان از این روش به عنوان یک تکنیک تشخیصی بسیار مناسب، در مطالعات اپیدمیولوژیک بروسلا و همچنین در آزمایشگاه های تشخیصی استفاده نمود. با وجود اینکه تکنیک ERIC-PCR در بسیاری از مطالعات روش قدرتمندی در تمایز مولکولی باکتری ها بشمار می رود، در صورت امکان بهتر است که برای تایید نتایج این مطالعه از تکنیک های دقیق تر و با قدرت تفکیک بالا

- (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 Saeed 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

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

Ali Nemati<sup>1</sup>, Gholamreza Hashemi Tabar<sup>\*2</sup>, Mehrnaz Rad<sup>3</sup>

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