تعیین گونه های بروسلا در مناطق مرکزی ایران با تکنیک PCR-RFLP

ابتهاج پیشوا*[۱]، منصور صالحی[۲]، رسول صالحی[۲] و محمدرضا ابراهیمی[۳]

[۱] اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی

[۲] اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک و بیولوژی ملکولی

[۳] تهران، موسسهٔ سرم سازی رازی

تاریخ دریافت:۸٤/۹/۵ تاریخ پذیرش:۸۵/۷/۱۸

چکیده

شیوع بروسلوز در ایران همیشه بالا بوده، ولی از سال ۱۳۸۲ به بعد اپیدمیهای جدیدی بروز کرده است. دامهای عشایر بختیاری از مناطق مرزی عراق به بخش مرکزی ایران وارد می شوند و براحتی ممکن است گونه‌ها و بیوتایپهای جدیدی از بروسلا را به این نواحی وارد کنند. هدف از این مطالعه تعیین گونه ها و بیوتایپهای بروسلا در این نواحی بود. ۱۵۰ باکتری بروسلا جدا شده از جنین‌های سقط شده میش و گاو مورد بررسی قرار گرفت، که پس از تعیین نوع باکتری، DNA آنها استخراج گردید. سپس قطعاتی از ژنهای omp2a و omp2b باکتری با PCR تکثیر شد. محصولات PCR با آنزیم محدود کننده *PstI* هضم و الگوهای RFLP حاصل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با روش ملکولی RFLP ۱۳۵ نمونه متعلق به بروسلا ملی تن سیس بیوتایپ ۱ و ۱۵ نمونه بروسلا ملی تنیس غیر از بیوتایپ ۱ یا آبورتوس با بیوتایپهای نامشخص مشاهده شد، که با توجه به آن می توان نتیجه گرفت: گرچه عامل اصلی بروسلوز در نواحی مرکزی ایران بروسلا ملی‌تن سیس بیوتایپ ۱ است ولی ۱۰ درصد جنینهای سقط شده مربوط به بروسلا های آبورتوس و یا ملی‌تن سیس با بیوتایپهای متفاوت دیگری است که در مطالعات بعدی تعیین خواهد شد.

واژه های کلیدی: بروسلوز – بروسلا ملی تن سیس – بروسلا ابورتوس – همه گیر شناسی مولکولی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۳۱۱ ۷۹۲ ۲٤۱٦، پست الکترونیکی: Pishva@med.mui.ac.ir

مقدمه

بروسلا عامل بروسلوزیس (Brucellosis) در انسان و بسیاری از حیوانات است. این جنس بر اساس خاصیت بیماریزایی، خصوصیات آنتی ژنیک، میزبان اصلی به شش گونه تقسیم بندی شده است. بروسلا آبورتوس *Brucella abortus* (گاو) بروسلا ملی تن سیس *Brucella melitensis* (بز و گوسفند) بروسلا اویس *Brucella ovis* (قوچ) بروسلا کانیس *B.* canis (سگ) بروسلا سوئیس *B. suis* (خوک) و بروسلا نئوتوم/ *B. neotoma* (فقط در نوع بخصوصی از موش صحرائی دیده می شود) و بروسلای جدا شده از حیوانات دریایی *B. marina* که با انواع فوق شباهت ژنوتیپی کامل ندارد (۲، ۷، ۸ و ۱۵). بعضی از انواع بروسلا مثل بروسلا آبورتوس، بروسلا ملی تن سیس و بروسلا سوئیس دارای میزبانهای ویژه می باشند ولیکن در بعضی از کشورها این نوع از بروسلاها عامل بروسلوز در سایر دامهای اهلی نیز هستند.

بروسلوز در انسان بیشتر بفرم مزمن با عوارضی خطرناک همراه است و در حیوانات با جایگزینی در دستگاه تولید مثل آنها ممکن است منجر به بچه اندازی و یا عقیمی شود بروسلا ملی تن سیس عامل اصلی تب مالت در انسان توأم با علائم مهم کلینیکی و معمولاً یک بیماری شغلی و

Archive of SID
www.SID.ir

گاه با مصرف فرآورده‌ها و تولیدات دامی غیر پاستوریزه و یا حتی از راه تنفس انتقال می یابد، در ضمن بروسلا بعنوان عامل باکتریایی قابل استفاده در سلاحهای بیولوژیک نیز مطرح می باشد (١٤).

بروسلا آبورتوس ، ملی تن سیس ، سوئیس و بندرت *بروسلا کانیس* و بروسلای پستانداران دریایی باعث آلودگی انسان می شوند ولی باید توجه داشت که بروسلوز مشکل مهمی در کشورهای ناحیه مدیترانه، غرب آسیا و بخش هایی از آفریقا و آمریکای لاتین است (١٢). با تمهیدات بهداشتی شدید در بعضی از کشورهای غربی این بیماری ریشه کن شده ولی همیشه احتمال برگشت این بیماری در این مناطق وجود دارد. گرچه اختلافات موجود بین انواع بروسلاها و بیوتایپهای آن با روشهای مختلف مانند طبقه بندی بر اساس پادتن (Serotyping)، طبقه بندی (تعیین نوع) فاژ (Phage typing)، حساسیت به رنگها، نیاز به CO_2، تولید SH_2 و خصوصیات متابولیکی امکان پذیر است ولی بررسی خصوصیات ظاهری گاهی مشکل و وقت گیر می باشد. بنابراین تعیین نشانگرهای ویژه و ثابت موجود برروی DNA باکتری روش مناسبی در تشخیص دقیق آن میباشد. این نشانگرها در انجام مطالعات اپیدمیولوژیک نیز کاربرد وسیعی دارند (١).

تشابه خیلی زیاد بین DNA انواع بروسلاها باعث شده است که گاه تمام گونه ها را متعلق به یک جنس بدانند بدین لحاظ با شناسایی پلی مرفیسم DNA بروسلا و بکارگیری طبقه بندی(تعیین نوع) ملکولی (molecular typing) انواع بروسلاها، میتوان اختلاف بین بیوتایپهای آنرا مشخص نمود. از بین این تکنیکهای ملکولی شناسایی انواع بروسلا با روش RFLP کاملا" عملی و امکان پذیر است (٥،٦و٧).

بدلیل همگونی زیاد DNA بروسلاهای مختلف گاه در آزمایشهای DNA hybridization اتصال غیر اختصاصی شناساگر (probe) باعث اشتباه در تشخیص می گردد (١٧) که توجیه کننده حساسیت کم این روش در تشخیص بروسلا های مختلف از یکدیگراست ، و لذا گاهی برای تعیین گونه های بروسلا از روشهایی بجز DNA hybridization نظیر شناسایی توالی (sequencing) بازهای 16S rRNA یا روشهای مشابه استفاده می گردد (١٣).

پروتئینهای غشاء خارجی (OMP) outer-membrane جنس بروسلا اخیراً مورد توجه قرار گرفته و می توانند اختلاف بین انواع بروسلاهای بیماریزا و بعضی از بیوتایپهای آنها را مشخص نماید. ساخته شدن پروتئین بزرگ OMP توسط دو ژن omp2a و omp2b در غشا خارجی صورت می گیرد (٥و٦). ژن omp2 در جایگاهی همگون و با اختلاف جزئی در میان گونه‌های بروسلا و بیوتایپهای آن وجود دارد این ژن از دو بخش تحت عناوین omp2a و omp2b تشکیل شده است (٦و٩).

اخیراً با بکارگیری PCR-RFLP و با تعداد زیادی از آنزیمهای محدود کننده (Restriction enzymes) انواع گونه های بروسلای بیماریزا و بیوتایپهای آنرا شناسایی کرده‌اند. ژن Omp25 از جمله ژنهائی است که OMP پروتئین 25KDa غشاء خارجی را کد می نماید. این ژن به خوبی در تفکیک اکثر بروسلاها نقش دارد (٥و١٥).

با توجه به موقعیت منطقه مرکزی ایران و ورود و خروج میلیونها رأس دام عشایر بختیاری و قشقایی از استانهای جنوبی و غربی کشور به این منطقه همیشه این احتمال وجود دارد که گونه‌ها و بیوتایپهای جدیدی از بروسلا به این مناطق وارد شوند. آگاهی از این تغییرات، توانائی ما را در کنترل و درمان این بیماری افزایش می دهد. روشهای مرسوم آزمایشگاهی شناسایی تب مالت در انسان و آلودگیهای دامی نمی تواند گونه هاو بیوتایپهای مختلف را مشخص نماید بنابراین استفاده از مولکولار تایپینگ بویژه روش PCR-RFLP این امکان را بما میدهد که در طی زمان کوتاهی انواع گونه ها و بیوتایپهای مختلف بیماریزا را در بین دامها و انسانهای بیمار مشخص کرده و نسبت به

Archive of SID
www.SID.ir

حذف دامهای آلوده از گله اقدام نمود. همچنین بایداز واکسنهای مناسب برای کنترل این عفونت در دامها نیز استفاده نمود. ضمن آنکه آگاهی سریع پزشک از انواع بروسلاهای بیماریزا در فرد آلوده این امکان را بوجود می آورد که از داروهای مناسب برای درمان انواع مختلف بروسلا استفاده نماید.

پژوهش فعلی ادامه پژوهش قبلی این گروه در شناسایی گونه‌های بروسلا در اصفهان می باشد(۱).

مواد و روشها

کار آزمایشگاهی با باکتری بروسلا بسیار خطرناک است و بمنظور جلوگیری و حفاظت پرسنل باید از قوانین حفاظتی دقیق بهنگام جداسازی باکتری از جنینهای سقط شده استفاده نمود. کشت و تستهای آزمایشگاهی در آزمایشگاهای مجهز انجام پذیرد. بعد از جداسازی باکتری و تعیین اینکه باکتری بروسلا است، با کیتهای استخراج DNA یا با استخراج DNA به روش فنل کلروفورم، DNA باکتری بروسلا استخراج گردید.

جمع آوری نمونه: به اندازه کافی جنین سقط شده گوسفند و گاو مورد بررسی قرار گرفت تا تعداد ۱۰۰ نمونه مربوط به جنین سقط شده بروسلائی گوسفندی و ۵۰ نمونه مربوط به جنین سقط شده بروسلائی گاوی جمع آوری گردید. جنینهای گوسفندی متعلق بود به گوسفندان عشایر بختیاری و قشقایی که از استانهای خوزستان، لرستان و فارس در فصل بهار در مناطق اطراف شهر اصفهان و یا اطراف شهرستانهای شهرضا، فریدن، فریدونشهر و یا پشتکوه کوچ کرده بودند. نمونه های گاوی از دامداریهای صنعتی منطقه اصفهان جمع آوری گردید.

ابتدا از جنینهای سقط شده نمونه گیری انجام شد. سپس باکتری برروی محیط کشت بروسلا آگار در داخل جار محتوی ۱۰ درصد CO_2 بمدت سه روز در حرارت ۳۷ سانتی گراد در گرمخانه کشت داده شد (۲). در نهایت با انجام تستهای بیوشیمیایی و سرولوژی گونه باکتری تعیین گردید.

استخراج DNA: برای استخراج DNA محیط کشت بروسلا آگار با ۵ml فنل سالین (به ترتیب ۰/۸۵W/V درصد و W/V ۰/۱ درصد) شستشو داده شد تا باکتریها کشته شوند، بعد از جمع آوری باکتریها آنرا بمدت دو ساعت در حرارت ٦۸ سانتی گراد درجه قرار داده، بعد ۲۰ دقیقه با rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ نمودیم. سپس رسوب با ٤mg/ml محلول لیزوزیم (lysozyme) برای ۳۰ دقیقه در ٤ سانتی گراد قرار داده شد. بعد ۲۰۰ میکرو لیتر (0.5% W/V) SDS پروتئیناز K (200mg/ml) اضافه گردید و در ۳۷ سانتی گراد بمدت ۱ ساعت قرار گرفت (۱۰). بعد از خالص سازی DNA استخراج شده از پروتئینهای همراه سلولهای لیز شده یکبار با فنل کلروفورم ایزوامیل الکل (۲۵:۲٤:۱) phenol-chloroform-Isoamyle alcohol و یکبار با فنل–ایزوامیل الکل (۱:۲٤) عمل استخراج DNA تکمیل گردید. در پایان برای افزایش غلظت و خلوص DNA آنرا ابتدا با اتانل رسوب داده، رسوب را با اتانل ۷۰ درصد شسته و با قرار دادن در معرض هوا خشک گردید. برای تشخیص کمیت و کیفیت: نمونه مجدداً در TE بافر (50mM Tris-HCl , 1m EDTA pH8) حل و با اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش (UV spectrophotometer) جذب DNA ($OD_{260/280}$) مشخص شد.

همچنین از الکتروفورز نمونه در ژل (۱ درصد) با یک بافر (20mM Tris-acetate 1mM EDTA) TEA (pH 8.0) 0.5 mg/ml) و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید نیز استفاده گردید. DNA تا زمان استفاده در ٤ سانتی گراد نگهداری شد.

تکثیر DNA با PCR : برای تکثیر ژن مورد نظر با استفاده از دستگاه PCR قطعه‌ای از ژنهای omp2a و omp2b با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده که در خصوص همه بروسلاهای

Archive of SID
www.SID.ir

مورد نظر یکسان می باشد بر اساس رفرانس شماره ۷ و به شرح زیر است .

omp2a F 5'-GGCTATTCAAAATTCTGGCG-3'
omp2a R 5'-ATCGATTCTCACGCTTTCGT-3'
omp2b F 5'-CCTTCAGCCAAATCAGAATG-3'
omp2b R 5'-GGTCAGCATAAAAAGCAAGC-3'

پرایمرها در آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشکده پزشکی با استفاده از دستگاه Alf DNA synthesizer سنتز گردید.

محلولهای مورد نیاز برای واکنش PCR عبارت بودند از: ۱۰mM از هر یک dNTPs، 100ng از DNA نمونه ها، ۱PM از هر یک از الیگونوکلئوتید پرایمرها و ۱ واحد Taq DNA polymerases (سیناژن ایران) 50mM KCl, 1.75mM $MgCl_2$, .0.1% (W/V) Triton X-100 , 0.2 mg/ml of BSA , 10mM Tris –HCl (pH 8.5)

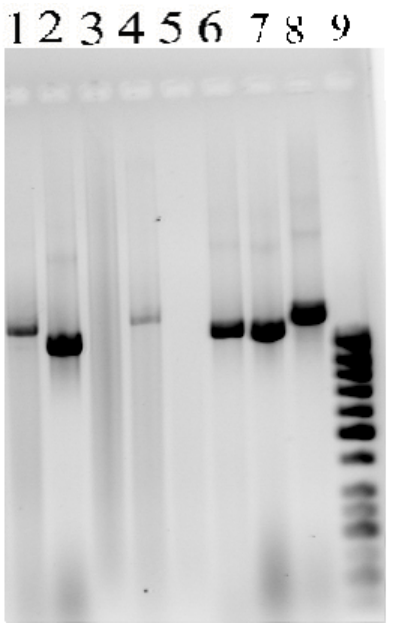
برنامه PCR در سیکل اول شامل ٤٥ ثانیه در ۹۵ سانتی گراد برای واسرشتی اولیه DNA ، یک دقیقه در ۵۰ سانتی گراد برای اتصال پرایمرها به DNA و یک دقیقه در ۷۲ سانتی گراد برای مرحله گسترش DNA با واسطه پلی مراز. این سیکلها با آخرین سیکل در ۷۲ سانتی گراد بمدت ۷ دقیقه به پایان می رسید . بعد از پایان کار، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با الکتروفورز روی ژل ۱/۵ درصد بررسی شد.

هضم محصولات PCR: تولیدات حاصل از PCR نمونه ها با آنزیم *Pst*I مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا بر اساس دستورالعمل سازنده ۸ میکرولیتر از محصول PCR در ۱۲ میکرولیتر حجم محلول واکنش که شامل ۲ میکرولیتر بافر مناسب و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر بود مخلوط گردید. محلول به مدت ۲ ساعت در حرارت ۳۷ سانتی گراد قرار گرفت و سپس روی ژل آگاروز (۲ درصد) الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد.

نتایج و بحث

آلودگی به باکتری بروسلا در تمام ۱۵۰ نمونه جنینهای سقط شده گاو و گوسفند مورد استفاده در این مطالعه با کشت بر روی بروسلا آگار و انجام تستهای بیوشیمیایی و سرولوژی مورد تأیید و تعیین گونه قرار گرفت. کشت نشان داد که هر ۱۵۰ نمونه مورد بررسی آلوده به بروسلا ملی تن سیس بیوتایپ ۱ بوده اند.

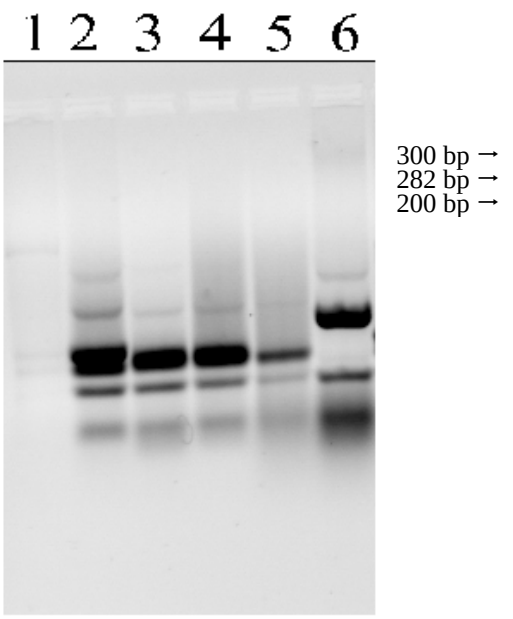
از کشت هر یک از نمونه های فوق الذکر حدود µg ۱۰۰ DNA خالص استخراج گردید و قطعه مورد نظر با PCR تکثیر شد. اندازه هر یک از باندهای omp2b و omp2a در نمونهها بترتیب حدود pb ۱۲۰۰ و ۱۱۰۰ بود (شکل ۱) تولیدات حاصل از PCR با آنزیم *Pst*I هضم شد و نتایج آن با الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۱- الگوی PCR قطعات omp2a و omp2b نمونه های باکتری بروسلا ردیفهای ۱ و ٤ و۸ omp2 b و ردیفهای ۲ ، ٦ و ۷ omp2 a . ردیف ۳ کنترل منفی و در ردیف ۲ PCR کار نکرده است و ردیف ۹ مارکر وزن ملکولی.

www.SID.ir

براساس تکنیک PCR-RFLP و الگوی ناشی از هضم آنزیم *PstI* از مجموع ۱۵۰ نمونه بروسلای جدا شده از جنین‌های سقط شده گوسفند (۱۰۰ نمونه) و گاو (۵۰ نمونه) تعداد ۹۰ نمونه گوسفندی (۹۰ درصد) و تعداد ٤٥ نمونه گاوی (۹۰ درصد) آلوده به *بروسلا ملی تن سیس* بیوتایپ ۱ بودند. و همچنین تعداد ۱۰ نمونه (۱۰درصد) گوسفندی و ۵ نمونه (۱۰درصد) گاوی به بروسلا آبورتوس (بیوتایپ نامشخص) و یا بروسلا ملی تن سیس غیر از بیوتایپ ۱ آلوده بودند.



شکل ۲- الگوی PCR-RFLP قطعات omp2a نمونهای باکتری بروسلاهضم شده با آنزیم Pst1. ردیف ۱ کنترل منفی . ردیف ۲ بروسلاملی تن سیس بیوتایپ ۱. ردیفهای ۳ – ۵ بروسلاملی تن سیس و بروسلا آبورتوس با بیوتایپ های نامشخص. ردیف ٦ بروسلا آبورتوس با بیوتایپ نامشخص.

از سال ۱۳۸۲ با اشغال کشور عراق بنظر میرسد برنامه های واکسیناسیون دامها در آن کشور متوقف شده ضمن آنکه رفت و آمد افراد و احشام بین دو کشور مورد کنترل دقیق قرار نمی گیرد. لذا ورود گونه ها و بیوتایپها جدید بروسلا به کشور از طریق دامها بسیار محتمل است. با توجه به تفاوت در بیماری زایی گونه ها و حتی بیوتایپهای جنس بروسلا برنامه ریزی جهت پیشگیری از بیماری در دامها بایستی بر اساس نوع بروسلای موجود انجام پذیرد. بطوریکه آگاهی دقیق از گونه‌ها و بیوتایپهای شایع بروسلا مبنای کنترل آلودگی در دامها با انتخاب واکسن مناسب برای پیشگیری این بیماری میباشد. بر اساس نتایج این بررسی گاوها بیشتر به گونه بروسلا ملی تن سیس مبتلا شده اند و لذا استفاده از واکسن S19 بایستی با سایر واکسن ها نظیر واکسن جدید RB51 جایگزین گردد.

تکنیک PCR برای تشخیص بروسلا بطور فراوان مورد استفاده قرار گرفته است (۳،٤و۱۷). اخیراً استفاده توأم آنزیمهای هضم کننده DNA و PCR برای ژنهائی که دارای پلی‌مورفیسم در DNA بروسلا هستند مثل ژنهای کد کننده OMP (۳٦ و ۲۵ کیلو دالتون) پروتئینهای موجود در غشاء خارجی این باکتری مورد توجه قرار گرفته است (۸،٦،۵).

در مطالعهٔ ما بروسلا ملی تن سیس بیوتایپ ۱ و بروسلا آبورتوس در مقایسه با گونه‌های استاندارد موجود در انستیتو رازی، شناسائی شده با روشهای سرولوژی و بیوشیمیایی، قابل مقایسه می باشند. ضمن آنکه یکی از نمونه های گاوی از الگوی PCR-RFLP متفاوت از سروتیپ های شایع کشور است که بایستی در مطالعات آتی مورد بررسی قرار گیرد (شکل۲) (۱، ۵، ٦، ۱۱ ، ۱٦).

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

۱- دکتر ابتهاج پیشوا – دکتر منصور صالحی – ابوالفضل قلی پور گوسفندی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. دوره ششم . شماره ٤ . زمستان ۱۳۸٤. تعیین بیوتایپهای بروسلا ملی تن سیس در ایزوله های انسانی و

isolated from marine mammals. Vet. Microbiol. 57: 373-382.

2. Bricker, B. J., D. R. Ewalt, A. P. Macmillan, G. Foster, and S. Brew. 2000. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. J. Clin. Microbiol. 38: 1258-1262.
3. Bricker, B. J. 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Vet. Microbiol. 90: 435-446.
4. Bricker, B. J., and Halling, S. M. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J. Clin. Microbiol. 32: 2660-2666.
5. Cloeckaert, A., J. M. Verger, M. Garyon, and O. Grépinet. 1995. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 and 36kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. Microbiology 141: 2111-2121.
6. Cloeckaert, A., J. M. Verger, M. Garyon, and N. Vizcaíno. 1996. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. FEMS Microbiol. Lett. 145: 1-8.
7. Cloeckaert, A., M. Grayon, O. Grepinet, and K. S. Boumedine. 2003. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. Microbes Infect. 5: 593-602.
8. Corbel, M. J. 1997. Brucellosis: an overview. Emerg. Infec. Dis. 3: 213-221.
9. Gandara, B., A. L. Merino, M. A. Rogel, and E. Martinez-Romero. 2001. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. J. Clin. Microbiol. 39: 235-240.
10. Jahans, K. L., G. Foster, and E. S. Broughton. 1997. The characterization of *Brucella* strains
11. Michaux-Charachon, S., G. Bourg, E. Jumas-Bilak, P. Guigue-Talet, A. Allardet-Servent, D. O'Callaghan, D., and M. Ramuz. 1997. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. J. Bacteriol. 179: 3244-3249.
12. Moreno, E., A. Cloeckaert, and I. Moriyon. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy Vet. Microbiol. 90: 209-227.
13. Ouahrani, S., S. Michaux, J. Sri Widada, G. Bourg, R. Tournebize, M. Ramuz, and J. P. Liautard. 1993. Identification and sequence analysis of IS*6501*, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS*6501* copies. J. Gen. Microbiol. 139: 3265-3273.
14. Rotz, L. D., A. S. Khan, S. R. Lillibridge, S. M. Ostroff, and J. M. Hughes. 2002. Public health assessment of potential biological terrorism agents. Emerg. Infect. Dis. 8: 225-230.
15. Sifuentes-Rincon, A. M., A. Revol, and H. A. Barrera-Saldana. 1997. Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. Mol. Med. 3: 734-739.
16. Velasco, J., C. Romero, I. Lopez-Goni, J. Leiva, R. Diaz, and I. Moriyon. 1998. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 759-768.
17. Verger, J., F. Grimond, P. A. D. Grimond, and M. Grayon. 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. 35: 292-295.

Archive of SID

www.SID.ir

Identification of Brucella spp in central region of Iran

Pishva A[1]., Salehi M[2]., Salehi R[2]. and Ebrahimi M. R[3].

[1] **Microbiology and Virology Dept., Medical School, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. of Iran**

[2] **Genetics and Molecular Biology Dept., Medical School, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. of Iran**

[3] **Razi Institute, Hesarak, Karaj, I.R. of Iran**

Abstract

Brucellosis has always high incidence in Iran, especially we are facing a new outbreak of the disease since 2002. Bakhtiiari tribe sheep enter to the central region of Iran from Iraq border, and therefore can easily introduce new species and/or biotypes of Brucella SPP to these regions. The aim of this study was to determine the species and biotypes of Brucellae that are present in the central region of Iran. We studied 150 Brucella isolates from aborted fetuses of sheep and cow. After identification of species of the bacteria, DNA was extracted and then parts of omp2a and omp2b genes of the bacteria were PCR amplified. The PCR products were digested by PstI restriction enzyme and the produced patterns of RFLP were analysed. Molecular technique of RFLP results demonstrated that only 135 samples were infected with Brucella melitensis biotype I and 15 samples demonstrated RFLP pattern similar to B. abortus (uncharacterized biotypes) or B. melitensis SPP (biotypes other than biotype 1). Our results demonstrated that although B. melitensis biotype I is the main Brucella in central region of Iran but about 10% of the aborted fetuses were infected with different biotypes of either B. abortus or B. melitensis. We are going to further characterize these biotypes in our next study.

Keywords: Brucellosis, B. Melitensis, B. Abortus, Molecular epidemiology

Archive of SID

www.SID.ir