

# Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship of Clinical Isolates of *Brucella melitensis* Based on Gene Polymorphism of $\beta$ Subunit of RNA Polymerase (*rpoB*) Gene in Iran

Nasim Bazrgari<sup>1</sup>, Ghasem Ali Garoosi<sup>1</sup>, Maryam Dadar<sup>2\*</sup>

1. Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Engineering & Technology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
2. Razi Vaccines and Serum Research Institute (RVSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

 [10.30699/ijmm.14.5.425](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.5.425)



## ABSTRACT

**Background:** The prevalence of *Brucella* infections in animals and humans has indicated the important need for different regional/local reference laboratories to use valid species-determining approaches to facilitate and compare data exchange. The purpose of current study was to evaluate the RNA Polymerase Beta Subunit (*rpoB*) as a molecular marker in *Brucella* species differentiation and to determine the genotype of *Brucella melitensis* species using single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis.

**Materials & Methods:** In this study, blood and cerebrospinal fluid (CSF) samples were taken from 108 patients with brucellosis. After culturing the samples insupplemented *Brucella* agar, eleven isolates of *Brucella* bacteria were isolated and identified by classical and molecular biotyping methods. Then the complete sequence of their *rpoB* gene was multiplied and sequenced. Sequencing results were analyzed by Mega6 program.

**Results:** According to the results, the *rpoB* gene was able to differentiate between *Brucella* species and other bacteria. Moreover, the *rpoB* typing grouped the majority of Iranian isolates in the *rpoB* type 2, while only one strain belonged to the *rpoB* type 1. Among the 10 isolates of *rpoB* type 2, there are six different isolates with only one unique type-2 SNPs in codon 985, which gives rise to new genotype 2 variants.

**Conclusion:** Our results shown a high discriminative power of *rpoB* gene among *B. melitensis* strains from some regions of Iran, which leads to accurate genotype and identification of these bacteria.

**Keywords:** *rpoB*, *Brucella melitensis*, SNP analysis, Phylogenetic

Received: 2020/07/10; Accepted: 2020/09/14; Published Online: 2020/09/26

**Corresponding Information:** Maryam Dadar, Razi Vaccines and Serum Research Institute (RVSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: [dadar.m77@gmail.com](mailto:dadar.m77@gmail.com)



Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Bazrgari N, Garosi G A, Dadar M. Genetic diversity and phylogenetic relationships of Iranian clinical isolates of *Brucella melitensis* based on RNA Polymerase Beta Subunit (*rpoB*) Polymorphism. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (5) :425-440

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

## Introduction

Brucellosis is the most common zoonotic disease that infects animals and humans through contaminated animals and their products. The disease is caused by an intracellular small gram- coccobacillus of the genus *Brucella*, which has no capsules, flagella and spores cause destructive disease that leads to great economic losses to the livestock industry

by reducing milk production Humans are usually infected through consumption of contaminated dairy products or close contact with infected animals (1). Human infection can lead to a chronic debilitating disease whose nonspecific symptoms affect various organs (2, 3). The genus *Brucella* has six classic species, including: *Brucella abortus*, *Brucella*

*melitensis*, *Brucella ovis*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella canis*, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. canis*, and *B. suis* can cause brucellosis in human (4). In addition, six non-classical species are known as *Brucella* species. Reports published in the last decade in Iran have introduced *B. melitensis* as the main pathogen responsible of brucellosis in human. Although, *B. abortus* was also involved to much lesser extent (6, 5). Rapid and accurate identification of *Brucella* species can indicate geographical and host origin. Currently, differentiation between species and biovars of *Brucella* are done using various analyze according to phage typing, phenotypic characteristics of lipopolysaccharide antigen, color sensitivity, need for carbon dioxide, the production of sulfide-hydrogen gas and metabolic properties (7). Diagnosis and detection of brucellosis based on biochemical tests is inefficient to differentiate *Brucella* species due to the presence of unknown behavioral strains in these experiments (8). Also, these experiments are potentially dangerous, complex and time consuming for laboratory technicians. Furthermore, *Brucella* identification complication can occur due to similar differences between some species and inconstancy in reporting several phenotypic traits (9, 10). The use of genetic characteristics has been investigated using molecular DNA technology to address these shortcomings. Many PCR-based methods have been developed for rapid identification of *Brucella* species. For this purposes, molecular tests of the genome using the BCSP31 gene or 16SrRNA-23S operon are sufficient (11, 12), but for the other aims such as epidemiological tracking, more accurate methods are required. Due to the high DNA homology (above 90%) among *Brucella* species (14, 13), the significant genetic differences are mononucleotide polymorphisms, and regions with high genomic diversity between species are very rare (15). Several PCR-based methods have been used to determine the exact molecular biomarkers to determine *Brucella* molecular type (12). Various studies have reported that the use of the RNA polymerase (*rpoB*)  $\beta$  subunit gene, which is very suitable for phylogenetic analysis and identification *Brucella* strains, especially in highly homologous isolates (8, 15, 16 RpoB-based genotyping also allows the identification of new bacterial species and analysis of the bacterial community (16). It can also describe *rpoB* gene mutations that play a very important role in rifampicin resistance (17). the present study evaluates the effectsof single nucleotide polymorphism (SNP) assays on the *rpoB* gene to show intra-species diversity occurring in different *B. melitensis* strains collected from various regions of Iran. (this part of manuscript is too long).

## Materials and Methods

### Sampling and bacteria isolation

In this study, a collection of 106 blood and 2 cerebrospinal fluid samples from patients with

brucellosis symptoms from 2017-2019 were cultured by the Brucellosis Department of Razi Vaccine and Serum Research Institute (Karaj, Iran). All samples were cultured in selective *Brucella* agar medium with Cycloheximide (50.0mg), Vancomycin (10.0mg), polymyxin B (2,500 IU), Bacitracin (12,500 IU), Nystatin (50,000 IU), and Nalidixic acid (2.5mg) (Oxoid, Basingstoke, UK) and 5% of inactivated horse serum. Bacterial cultures were incubated for 10 days at 37 ° C and 10% carbon dioxide. After this steps , the isolated bacteria were identified by classical typing methods (5, 18). *Brucella* isolated from patients and standard bacterium of *B. melitensis* 16M (ATCC 23456) were then used in this study to analyze *rpoB* gene by single nucleotide polymorphism. Genomic DNA extraction was performed based on the manufacturing protocol by a high purity PCR template preparation kit (Roche, Germany) on isolated bacteria. The integrity of DNA was evaluated by 1% agarose gel and the concentration of DNA was assessed at 260/280 nm by a Nanodrop Spectrophotometer (Wilmington, DE, USA). The DNA of bacterial samples were then preserved at - 20 ° C for analysis.

### Molecular confirmation of isolated bacteria

Molecular identification of isolated bacteria in *Brucella* agar-specific medium was performed based on the IS711-based polymerase chain reaction (AMOS-PCR) and Bruce-ladder PCR were carried out on all extracted DNA to analyze the *Brucella* presence in samples. Amos-PCR amplification using 5 primers on the IS711 gene (Table 1) was done in a thermal program of 1 cycle of 95 ° C for 5 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95 ° C for 30 seconds, annealing temperature at 55 ° C for 60 seconds, extension at 72 ° C for 3 minutes and final extension at 72 ° C for 10 minutes (19). Molecular typing also was performed by multiplex PCR (Bruce-ladder) with 16 primers on 8 different *Brucella* genes (Table 1) as follows: 95 ° C for 5 minutes, followed by 30 cycles at 95 ° C for 30 minutes, 56 ° C for 90 seconds, 72 ° C for 3 minutes and at 72 ° C for 10 minutes (4). All reactions of PCR were conducted in a total volume of 25  $\mu$ L including 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate, 0.5 mM of each primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.05 IU of Taq polymerase. The PCR products were run by electrophoresis on the 1.5 % agarose gel. All applied primers in this study are mentioned in the table 1.

### PCR assay on the *rpoB* gene and its genotyping assignment

The PCR amplifications of the *rpoB* gene was done with specific primers using the *B. melitensis* 16M (accession number AE009516) as reference. Upstream primer, 1rB (5-ATGGCTCAGACCCATTCTTTC-3), and a downstream primer, 4134rB (5-TTATTCTGCCGCTCCGGAA-3) were used to amplify the whole length of *rpoB* gene with 4,134-bp (17). PCR amplifications were performed with

25 µL of PCR mixture comprised of 10 mM Tris–HCl (pH 8), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate, 0.05 IU of Taq polymerase, 0.5 mM of each primer and 100 ng of genomic DNA (evaluated by O.D. at 260 nm). To determine the *rpoB* types of different *B. melitensis* phenotypic biovars, the *rpoB* molecular targeting of specific residues on the codons 629, 985, 1249, and 1309 were performed using Mega 6 software (20).

### Sequence analysis

The purification of PCR products were performed by PCR product purification kit (GeneAll Company, South Korea) and sent to Fazapjoo Company for sequencing. The *rpoB* sequences were then aligned and assembled by the Mega 6 software program (21). In addition, the

amino acids were deduced by the CLUSTAL W method of the Mega 6 program. After that all generated sequences with specific primers and length of 4134 bp, were compared by *rpoB* gene of *B. melitensis* 16M (accession number AE009516) for evaluation of nucleotide diversity. Sequencing was performed twice to confirm the results of reported mutations in this study.

### Phylogenetic analysis

The consensus data of all sequences were evaluated using the NCBI (Blast) alignment search tool to confirm *rpoB* genes matching. A phylogenetic tree was then drawn with Bootstrap 1000 (22). Bootstrap values from 1000 Bootstrap datasets were displayed at the end of the nodes.

**Table 1.** Primers used to identify isolated bacteria and PCR product sizes expected for different types of *Brucella*

Bacterial strains	Primer set	Primer sequence (5-3')	DNA target	size (bp)	References
<i>B. abortus</i>	IS711 AB	TGCCGATCACTTTCAAGGCCTTCAT GACGAACGGAATTTTCCAATCCC	IS711	498	(19)
<i>B. melitensis</i>	IS711 BM	TGCCGATCACTTTCAAGGCCTTCAT AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA	IS711	731	(19)
<i>B. ovis</i>	IS711 <i>B. ovis</i>	TGCCGATCACTTTCAAGGCCTTCAT CGGGTTCTGGCACCATCGTCG	IS711	976	(19)
<i>B. suis</i>	IS711 <i>B. suis</i>	TGCCGATCACTTTCAAGGCCTTCAT GCGCGGTTTTCTGAAGGTTTCAGG	IS711	285	(19)
<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. melitensis</i> <i>Rev.1</i>	BMEI0998f BMEI0997r	ATC CTA TTG CCC CGATAA GG GCT TCG CAT TTT CACTGT AGC	Glycosyltransferase, gene wboA	1,682	(4)
<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. melitensis</i> <i>Rev.1</i>	BMEI0535f BMEI0536r	GCG CAT TCT TCG GTTATG AA CGC AGG CGA AAA CAGCTA TAA	Immunodominant antigen, gene bp26	450	(4)
Deletion of 25,061 bp in BMEI0826– BMEI0850 in <i>B. abortus</i>	BMEI0843f BMEI0844r	TTT ACA CAG GCA ATCCAG CA GCG TCC AGT TGT TGTTGA TG	Outer membrane protein, gene omp31	1071	(4)
<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. melitensis</i> <i>Rev.1</i>	BMEI1436f BMEI1435r	ACG CAG ACG ACC TTCGGTAT TTT ATC CAT CGC CCTGTCAC	Polysaccharide deacetylase	794	(4)
<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. melitensis</i> <i>Rev.1</i>	BMEI0428f BMEI0428r	GCC GCT ATT ATG TGGACT GG AAT GAC TTC ACG GTCGTT CG	Erythritol catabolism, gene eryC (Derythulose- 1-phosphate dehydrogenase)	587	(4)
Deletion of 2,653 bp in BR0951– BR0955 in <i>B.</i> <i>melitensis</i> and <i>B. abortus</i>	BR0953f BR0953r	GGA ACA CTA CGC CACCTT GT GAT GGA GCA AAC GCTGAA G	ABC transporter binding protein	272	(4)
Point mutation in BMEI0752 in <i>B.</i> <i>melitensis</i> Rev.1	BMEI0752f BMEI0752r	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA	Ribosomal protein S12, gene <i>rpsL</i>	218	(4)
<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. melitensis</i> <i>Rev.1</i>	BMEI0987f BMEI0987r	CGC AGA CAG TGA CCATCA AA GTA TTC AGC CCC CGTTAC CT	Transcriptional regulator, CRP family	152	(4)

## Results

### Isolation and identification of bacteria

In this study, *Brucella* isolates (n=11) were detected from 108 blood samples from cases of brucellosis, 10 bacterial isolates from blood and 1 bacterial isolate from cerebrospinal fluid. Common phenotypic characteristics of *Brucella* species were observed from isolated bacteria including small glossy t shiny, and honey colonies with smooth surface. Eleven bacterial

isolates were grown after 5 days of incubation at 37°C with 10% carbon dioxide. Isolated bacteria were gram-negative in gram staining, did not produce hydrogen sulfide and did not lyse with standard phages in the classic *Brucella* detection method, and also grew on Fuchsin and tione dyes, so according to OIE standard tables for the identification Brucellae at the biovar level, it was identified as belonging to *B. melitensis* bivar 1 and 3 (Table 2).

Table 2. *B. melitensis* isolates and identification using different molecular typing methods.

Isolate	Accession number	Source	Biotype	Bruce-ladder	Amos PCR	year	Place
S1	MK629658	Human blood	<i>B. melitensis</i> bv3	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	2018	Karaj
S2	MK629659	Human blood	<i>B. melitensis</i> bv3	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	2016	Karaj
S3	MK629660	Human blood	<i>B. melitensis</i> bv1	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	2016	Karaj
S4	MK629661	Human blood	<i>B. melitensis</i> bv1	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	2015	Qom
S5	MK790247	Human blood	<i>B. melitensis</i> bv1	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	2019	Kerman
S6	MK790248	Human synovial fluid	<i>B. melitensis</i> bv1	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	2016	Tehran
S7	MK598748	Human blood	<i>B. melitensis</i> bv1	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	2017	Karaj
S8	MK790249	Human blood	<i>B. melitensis</i> bv1	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	2018	Mashhad
S9	MK790250	Human blood	<i>B. melitensis</i> bv1	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	2015	Hamadan
S10	MK790251	Human blood	<i>B. melitensis</i> bv1	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	2019	Kermanshah
S11	MK790252	Human blood	<i>B. melitensis</i> bv1	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	1017	Yazd

### Molecular confirmation of isolated bacteria

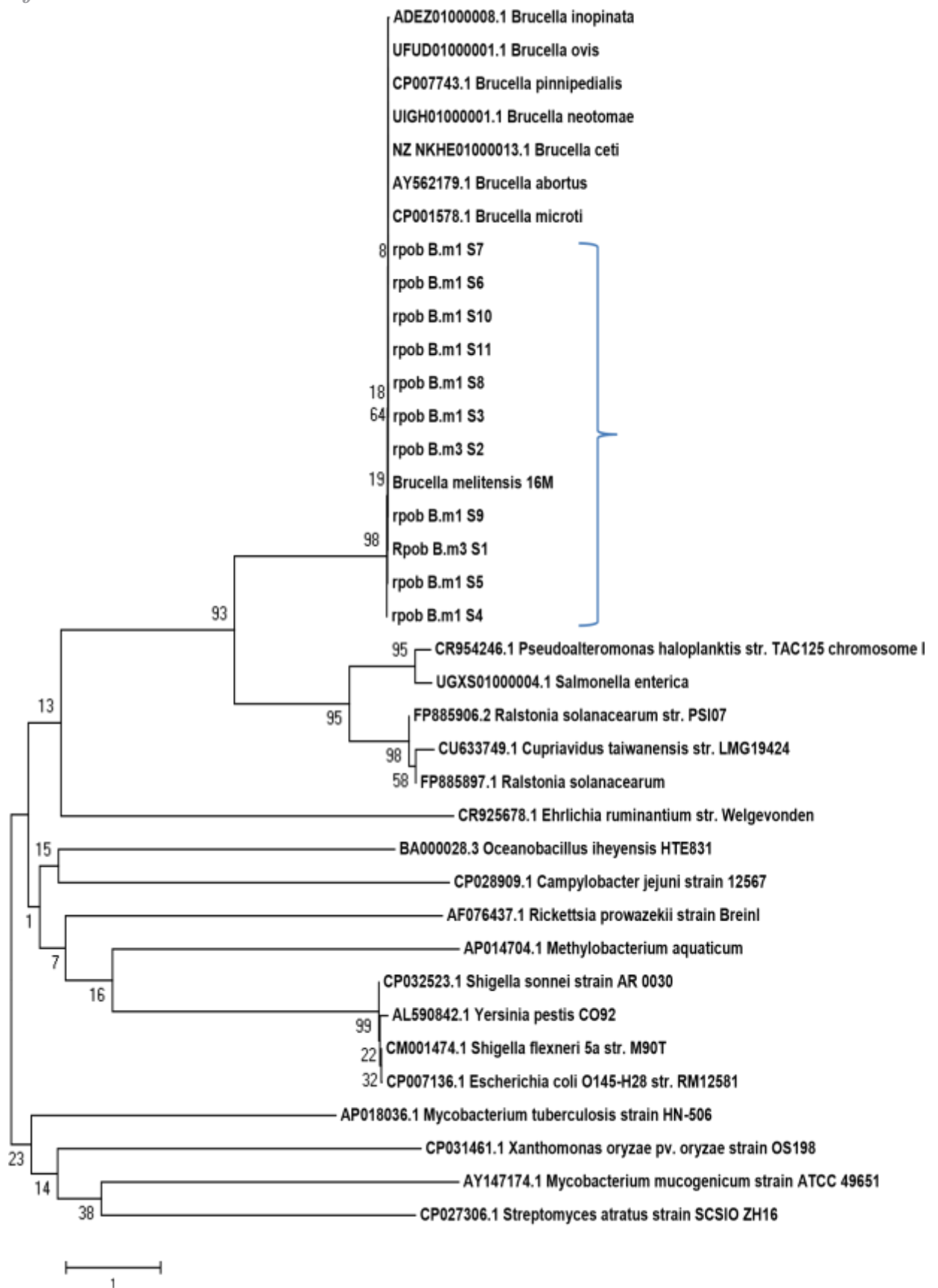
Isolated bacteria were identified and confirmed at the molecular level using AMOC PCR and Bruce-ladder multiplex methods at the species level. In terms of biotype results, it was found that the clinical isolates belonged to *B. melitensis* bivar 1 or 3. For the AMOS-PCR assay, a product of 731 bp for all isolates, indicating the genus *B. melitensis*, was identified. All isolates in Bruce-ladder PCR reaction was also confirmed the amplification of PCR products with 152, 450, 587, 794, 1,071 and 1682 bp as filed type of *B. melitensis*.

### Determination of *Brucella* genotype based on *rpoB* gene analysis

The differentiating power of *rpoB* gene for *Brucella* detection was first confirmed for Iranian *Brucella* isolates using single nucleotide polymorphism analysis of *rpoB* gene, moreover, the results were compared with the sequences recorded in the NCBI database. According to our results, most Iranian isolates in this study were classified as the *rpoB* with 629-Val (GTG), 985-Val (GTC), 1249-Met (ATG) and 1309-Leu (CTA) genomic maps While only one of them belonged to

*rpoB* type 1 with genomic map (629-Ala (GCG), 985-Ala (GCC), 1249-Met (ATG) and 1309-Leu (CTG)). The gene and amino acid sequences were stored in the NCBI database under access numbers MK629658, MK629659, MK629660, MK629661, MK790247, MK790248, MK598748, MK790249, MK790250, MK790251 and MK790252. Also, the ability of *rpoB* gene differentiation to identify *Brucella* Iranian isolates was confirmed for the first time in this study. Most of the Iranian isolates in this study belonged to *rpoB* type 2 and only one of them belonged to *rpoB* type 1. Also, no spatial grouping of *rpoB* type 3 was identified in this study. Of the 10 *rpoB* type 2 strains, six strains with only one single nucleotide polymorphism at codon985, showed different variants, indicating the missense 985 -Ala (GCC) mutation instead of Val (GTC).

Therefore, these strains should be considered as a new variants of genotype 2 (Accession number: MK629658, MK629660, MK629661, MK790247, MK790249 and MK790252) (Fig 1). In the other four isolates, no mutation pattern was observed in codon 985 of type 2 genotype.



**Figure 1.** Phylogenetic relationship using the Neighbor-Joining method shows the power of gene differentiation between *Brucella* species and other bacteria in the figure. The percentages of replications in which related species are grouped in the Bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The Maximum Composite Likelihood method showed evolutionary distances. Evolutionary analysis was performed on MEGA6.



## Discussion

Identification of *Brucella* species is one of the most important programs in brucellosis eradication and control issues as well as epidemiological trace analysis in human and animal. The worldwide distribution of *Brucella* infections in animals and humans highlights the vital need of different regional/local reference laboratories to use the same typing methods of *Brucella* bacteria in order to facilitate comparison and data exchange. At present, the identification of *Brucella* species and subspecies according to the different characterization's analysis consisting of biochemical phenotype, growth needs and serology. These tests are time consuming and increase the risk of infection for laboratory staff. In addition, the limited diversity of some *Brucella* species and biovars in biochemical properties may lead to conflicting data and complex interpretations (23). In some studies, it has been shown that clinical strains of *B. melitensis* isolated from human specimens show unusual phenotypic patterns in fuchsin and tione dye sensitivity tests (15, 16). More recently, the *B. melitensis* biovar types 1, 2, and 3 have been isolated from numerous studies in African, Asian, South American, and European countries that differ in color sensitivity (24). Moreover, the biotypical characteristics of *Brucella* spp. isolates in Israel were serologically known as *B. melitensis* biovar 1, but showed unusual sensitivity to penicillin, and the dyes of fuchsin and tione (9). Recent observations, however, indicate that differences between the species of *B. melitensis* are not limited to the agglutination pattern. Color sensitivity, while indicating a phenotypic feature, is also a factor for the *B. abortus* biovars identification (25). Hence, various molecular methods have been designed to identify *Brucella* species, for example, it has been shown that PCR-RFLP method is a fast and practical technique, particularly for differentiation and identification between different *Brucella* species and biovars of *B. abortus* and *B. melitensis* in human blood samples (26). In a further study, pulse-field gel electrophoresis (PFGE) was found to be a more reliable and useful method for the molecular typing of *Brucella* strains and the determination of genetic similarity between *Brucella* isolates in humans and animals than PCR RFLP (27). Also, optimized molecular hybrid methods are able to simultaneously identify and differentiate *B. abortus* and *B. melitensis* species with high specificity and sensitivity in clinical specimens (28). Furthermore, detection and differentiation of *B. melitensis* and *B. abortus* species by real-time PCR and high resolution melting analysis (HRM) curves in human blood has been expressed as a useful method compared to PCR-RFLP (29). In this study, comparison of *B. melitensis* *rpoB* sequences led to molecular and phylogenetic classification of 11 clinical isolates from different provinces of Iran (Figure

1). *RpoB*-based molecular typing enables us to determine and differentiate *Brucella* intraspecific genotypes and to analyze *Brucella* species from each other simultaneously based on a single nucleotide polymorphic analysis on the *rpoB* gene, which is not possible simultaneously in other molecular differentiation methods. Various studies have reported that the analysis of phylogenetic relationships based on *rpoB* gene was approximately three times more accurate than that obtained with 16S rRNA analyses in identifying highly homologous species of *Brucella* (8, 15, 30). Also, the 16S rRNA locus lacks sufficient sequence diversity to differentiate *Brucella* species (30).

Furthermore, New identification methods have recently been reported by targeting the *rpoB* gene fragment located between positions 625, 985, 1249, and 1390 to identify *Brucella* species.

Using this approach makes it possible to identify and differentiation closely identical bacteria with high homology in the genome. This method also revealed high sensitivity in differentiating *Brucella* spp. genotypes by *rpoB* gene sequencing (8, 31). Different genotypes of *B. melitensis* have been identified based on *rpoB* types due to the combination of mononucleotide polymorphisms (SNPs) in codons 629, 985, 1249 and 1309 (16). Up to now, 3 important genotypes according to the *B. melitensis* *rpoB* type have been demonstrated in different countries, including the *rpoB* type 1, 629-Ala (GCG), 985-Ala (GCC), 1249-Met (ATG) and 1309-Leu (CTG); the *rpoB* type 2, 629-Val (GTG), 985-Val (GTC), 1249-Met (ATG) and 1309-Leu (CTA); and the *rpoB* type 3, 629-Ala (GCG), 985-Ala (GCC), 1249-Ile (ATA) and 1309-Leu (CTG) (16, 20). The findings of the current study are consistent with the findings of a Spanish study that showed similar missense mutations at the same location (codon 985) for three of *B. melitensis* *rpoB* type 2. Other missense mutations have been reported in Turkey in genotype 2 of *B. melitensis*, including only two of the three missense mutations that were identified by Marianli et al. (16). According to Tan et al., most of the strains collected from American and European countries belong to type 1 *rpoB*, while type 2 *rpoB* is mainly reported among strains collected from Asia, Africa and Europe (8). However, our results showed that both type 1 and type 2 of *rpoB* were present in the Iranian isolates of *B. melitensis*. Phylogenetic analyzes performed in other studies also confirmed the use of neighbor-joining method in this study (15, 32). Finally, it can be confirmed that despite the high DNA homology in the genus *Brucella*, the *rpoB* gene can act as a highly specific and stable molecular marker in this gene (15, 32).

This method also allows for rapid differentiation and identification of *Brucella*.

### Conclusion

In the present study, the genotyping results of *B. melitensis* isolates using single nucleotide polymorphism analysis on the *rpoB* gene led to the successful identification and classification of Iranian clinical isolates and provided a better understanding of the distribution and transmission of *Brucella* spp. infecting human at a regional level. It was also found that biovar level detection could be performed without the need for special laboratory facilities.

### Acknowledgment

We are very grateful to the Brucellosis Department of the Razi Vaccine and Serum Research Institute in Karaj for helping us with this research.

### Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.

### Financial support

This study was supported by the grant 2-18-18-036-960504

from the Razi Vaccine and Serum Research Institute; Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran



## تنوع ژنتیکی و رابطه فیلوژنی ایزوله‌های بالینی بروسلا ملی تنسیس بر اساس پلی مورفیسم ژن زیرواحد $\beta$ آنزیم RNA پلیمراز (*rpoB*) در ایران

نسیم بذرگری<sup>۱</sup>، قاسم علی گروسی<sup>۱</sup>، مریم دادار<sup>۲\*</sup>

۱. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، ایران  
۲. بخش بروسلاز، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** گسترش عفونت‌های بروسلا در حیوانات و انسان نیاز اساسی آزمایشگاه‌های مرجع منطقه‌ای/ محلی مختلف را برای استفاده از رویکردهای معتبر تعیین گونه به منظور تسهیل تبادل داده‌ها و مقایسه آن‌ها نشان داده است. هدف از این مطالعه ارزیابی زیرواحد  $\beta$  آنزیم RNA پلیمراز (*rpoB*) به عنوان یک نشانگر مولکولی در تمایز گونه‌های بروسلا و تعیین ژنوتیپ گونه‌های بروسلا ملی تنسیس با استفاده از تجزیه و تحلیل چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) است.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه، نمونه خون و مایع مغزی نخاعی از ۱۰۸ بیمار مبتلا به بروسلازیس گرفته شد. پس از کشت نمونه‌ها در محیط کشت بروسلا آگار حاوی آنتی‌بیوتیک، تعداد ۱۱ سویه باکتری بروسلا جداسازی شد و با روش‌های بیوتایپینگ کلاسیک و مولکولی شناسایی شد. سپس ژن *rpoB* هر کدام از ایزوله‌ها تکثیر و توالی‌یابی گردید. نتایج توالی‌یابی توسط برنامه Mega6 آنالیز گردید.

**یافته‌ها:** طبق نتایج، ژن *rpoB* قادر به تمایز گونه‌های بروسلا از همدیگر و سایر باکتری‌ها بود و همچنین مشخص شد که ایزوله‌های بالینی بروسلا دارای تیپ دو *rpoB* و ژنوتیپ ۲ بروسلا ملی تنسیس هستند. در حالی که تنها یکی از ایزوله‌ها متعلق به تیپ ۱ بود. از ۱۰ سویه *rpoB* تیپ ۲، شش نمونه با تنها یک نوع منحصر به فرد جهش نقطه‌ای در کدون ۹۸۵ مشاهده شدند که نوع جدیدی از تحت گونه ژنوتیپ ۲ است.

**نتیجه‌گیری:** نتایج ما نشان‌دهنده قدرت تمایز بالای ژن *rpoB* در بین جدایه‌های بروسلا از برخی مناطق مختلف ایران است که منجر به تعیین ژنوتیپ دقیق و شناسایی این باکتری‌ها شد.

**کلیدواژه‌ها:** تب مالت، بروسلا ملی تنسیس، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، *rpoB*

کپی‌رایت © مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۲۰

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۲۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۷/۰۶

موضوع:

بیماری‌های مشترک انسان - دام

### نویسنده مسئول:

مریم دادار، بخش بروسلاز، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج،

ایران

ایمیل: [dadar.m77@gmail.com](mailto:dadar.m77@gmail.com)

### مقدمه

کننده مزمن منجر شود که علائم غیر اختصاصی آن بر اندام‌های مختلف تأثیر می‌گذارد (۲، ۳). جنس بروسلا دارای شش گونه کلاسیک است که شامل بروسلا آبورتوس، بروسلا ملی تنسیس، بروسلا اویس، بروسلا سوییس، بروسلا نیوتومه و بروسلا کنیس است. بروسلا ملی تنسیس، بروسلا آبورتوس، بروسلا کنیس و بروسلا سوییس قادر به ایجاد تب مالت در انسان هستند (۴). علاوه بر این، شش گونه غیر کلاسیک نیز به گونه‌های بروسلا شناسایی شده است. گزارش‌های منتشر شده در دهه گذشته در ایران، بروسلا ملی تنسیس را به عنوان مهمترین عامل بیماری‌زا در تب مالت انسانی

تب مالت یا بروسلازیس شایعترین بیماری مشترک قابل انتقال بین انسان و دام است که از طریق حیوانات آلوده و فرآورده‌های آن‌ها منتقل می‌شود. این بیماری توسط یک کوکو باسیل گرم منفی کوچک، داخل سلولی اختیاری و فاقد کپسول، تاژک و اسپور از جنس بروسلا ایجاد می‌شود، که یک بیماری مخرب بوده و منجر به ضرر اقتصادی عظیمی به صنعت دامداری شده، تولید شیر را کاهش می‌دهد و باعث سقط جنین یا مرده‌زایی می‌شود. انسان‌ها معمولاً به دلیل مصرف محصولات لبنی غیر پاستوریزه و یا تماس با حیوانات آلوده مبتلا می‌شوند (۱). عفونت انسانی می‌تواند به یک بیماری ناتوان



## روش پژوهش

### نمونه برداری و جداسازی باکتری

در این مطالعه، در مجموع ۱۰۶ نمونه خون و ۲ نمونه مایع مغزی نخاعی از بیماران مبتلا به علائم تب مالت که از سال ۲۰۱۷ تا ۲۰۱۹ توسط بخش بروسولوزیس موسسه تحقیقات واکنش و سرم‌سازی رازی (کرج، ایران) دریافت شده بود، کشت داده شد. همه نمونه‌ها بر روی محیط انتخابی بروسلا آگار به همراه آنتی‌بیوتیک‌های سیکلوهگزامید (۵۰ میلی گرم)، پلی میکسین B (۲۵۰۰ واحد)، وانکومایسین (۱۰ میلی گرم)، باسیتراسین (۱۲۵۰۰ واحد)، اسید نالیدیکسیک (۲/۵ میلی گرم) و نیستاتین (۵۰۰۰۰ واحد) و ۵ درصد سرم اسب غیرفعال کشت داده شدند. کشت‌ها باکتری به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۰ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. پس از این مرحله باکتری‌های جداسازی شده با روش‌های کلاسیک، تایپینگ و شناسایی شدند (۵، ۱۸). سپس ایزوله‌های بروسلا جداسازی شده از نمونه‌های بیماران و باکتری استاندارد بروسلا ملی تنسیس 16M (ATCC 23456) در این مطالعه برای آنالیز ژن *rpoB* به روش چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار گرفتند. برای استخراج ژنوم جهت آزمایش PCR، از باکتری‌های جداسازی شده در محیط اختصاصی بروسلا استفاده شد که با کیت تخلیص DNA ژنومی (کمپانی رووش، آلمان) طبق پروتکل کیت استخراج شد. کیفیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و غلظت آن در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر با استفاده از نانودراپ (Wilmington, DE, USA) مورد بررسی قرار گرفت. سپس نمونه‌های DNA در دمای منهای ۲۰ درجه سلسیوس تا تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شدند.

### تایید مولکولی باکتری‌های جداسازی شده

شناسایی مولکولی باکتری‌های جداسازی شده در محیط اختصاصی بروسلا آگار، براساس واکنش مولتی پلکس زنجیره‌ای پلی مرز (AMOS-PCR) و Bruce-ladder PCR بر روی تمام DNA استخراج شده از باکتری‌ها جهت بررسی حضور گونه‌های بروسلا انجام شد. تکثیر AMOS-PCR با استفاده از ۵ آغازگر بر روی ژن IS711 (جدول ۱) در برنامه حرارتی ۱ چرخه ۹۵ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه دناتوراسیون در ۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، دمای اتصال در ۵۵ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳ دقیقه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۹). تیپ مولکولی با روش multiplex PCR (Bruce-ladder) با ۱۶ آغازگر بر

شناسایی کرده است (۵، ۶). تشخیص سریع و شناسایی دقیق گونه‌های بروسلا می‌تواند منشاء جغرافیایی و منشأ میزبان را امکان پذیر نماید. تمایز بین گونه‌های بروسلا و بیووارهای آن‌ها با استفاده از تست‌های افتراقی بر اساس خصوصیات فنوتیپی آنتی‌ژن لیپوپولی‌ساکارید، تیپ فاز، حساسیت به رنگ، نیاز به دی‌اکسید کربن، تولید گاز سولفید هیدروژن و خصوصیات متابولیکی انجام می‌شود (۷). تشخیص و شناسایی تب مالت بر اساس آزمایشات بیوشیمیایی به دلیل وجود سویه‌هایی با رفتار نامشخص در این آزمایشات برای تمایز گونه بروسلا ناکارآمد است (۸). با این حال، این آزمایش‌ها برای پرسنل آزمایشگاهی وقت‌گیر، پیچیده و بالقوه خطرناک است. علاوه بر این، تعداد کمی از تفاوت‌ها در بین برخی گونه‌ها و عدم ثبات گزارش برخی از ویژگی‌های فنوتیپی می‌تواند شناسایی را پیچیده کند (۹، ۱۰). بنابراین استفاده از خصوصیات ژنتیکی با استفاده از فناوری DNA مولکولی برای رفع این نواقص بررسی شده است. تعداد زیادی روش مبتنی بر PCR برای شناسایی سریع گونه‌های بروسلا مورد آزمایش قرار گرفته است. برای چنین اهدافی، سنجش مولکولی ژنوم با استفاده از ژن BCSP31 یا اوپرون 23S - 16SrRNA کافی هستند (۱۱، ۱۲)، ولی برای اهداف دیگر، مانند ردیابی اپیدمیولوژیک، شناسایی دقیق‌تر مورد نیاز است. با توجه به همولوژی بالای DNA (بالای ۹۰ درصد) در بین گونه‌های بروسلا (۱۳، ۱۴)، بیشتر تفاوت‌های ژنتیکی شامل چندشکلی تک نوکلئوتیدی است و مناطق دارای تنوع بالای ژنومی در بین گونه‌ها و بیورارها بسیار نادر هستند (۱۵). چندین روش مبتنی بر PCR در تلاش برای یافتن نشانگرهای مولکولی مناسب برای تعیین تیپ مولکولی بروسلا مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲). علاوه بر این، در مطالعات مختلف گزارش شده است که استفاده از ژن زیرواحد  $\beta$  آنزیم RNA پلیمرز (*rpoB*) برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی و شناسایی باکتری‌های مختلف و سویه‌های بروسلا به خصوص در مورد جدایه‌های با همولوژی بالا بسیار مناسب است (۸، ۱۵، ۱۶). همچنین تعیین ژنوتیپ بر اساس ژن *rpoB* اجازه شناسایی گونه‌های جدید باکتری و تجزیه و تحلیل جامعه باکتریایی را قابل دسترس می‌سازد (۱۶). این روش همچنین قادر به توصیف جهش‌های ژن *rpoB* است که در مقاومت در برابر ریفامپیسین نقش بسیار مهمی دارند (۱۷). لذا مطالعه حاضر، تاثیر تجزیه و تحلیل چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) روی ژن *rpoB* را مورد ارزیابی قرار می‌دهد تا تغییرات درون‌گونه‌ای در سویه‌های بالینی بروسلا ملی تنسیس جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران را نشان دهد.

*rpoB* جدایه های بالینی بروسلا ملی تنسیس، تعیین نوع کدون ها و جهش های مولکولی *rpoB* روی کدون های ۶۲۹، ۹۸۵، ۱۲۴۹ و ۱۳۰۹ با استفاده از نرم افزار مگا۶ انجام شد (۲۰).

### تجزیه و تحلیل توالی

محصولات PCR با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR (شرکت GeneAII، کره جنوبی) خالص سازی شدند و جهت تعیین توالی به شرکت فزایژوه ارسال شدند. توالی های *rpoB* سپس توسط برنامه نرم افزار مگا۶ ادیت شدند (۲۱). علاوه بر این، آمینواسیدها با استفاده از روش CLUSTAL W برنامه نرم افزار مگا۶ استنتاج شدند. بعد از آن توالی های خوانش شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و طول ۴۱۳۴ جفت باز برای ارزیابی تنوع نوکلئوتیدی با ژن *rpoB* سویه استاندارد بروسلا ملی تنسیس M16 مقایسه شدند. توالی یابی برای تایید نتایج گزارش با دو بار تکرار در این مطالعه انجام شدند.

### تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

داده های حاصل از تمام توالی ها با استفاده از ابزار جستجوی همترازی NCBI (Blast) برای تایید مطابقت ژن ها *rpoB* ارزیابی شدند. سپس یک درخت فیلوژنی با بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم شد (۲۲). مقادیر بوت استرپ از ۱۰۰۰ مجموعه داده های بوت استرپ در پایان گره ها نشان داده شد.

روی ۸ ژن مختلف بروسلا (جدول ۱) به شرح زیر انجام شد: ۹۵ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه، و به دنبال آن با ۳۰ چرخه در ۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سلسیوس برای ۹۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳ دقیقه و در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه (۴). تمام واکنش های PCR در یک حجم کلی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵۰ میلی مول KCl، ۱۰ میلی مول Tris-HCl (pH 8)، ۱/۵ میلی مول Taq polymerase و ۰/۵ میلی مول از هر نوکلئوتید، ۰/۵ واحد بین المللی شده با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز مشاهده شدند. تمام آغازگرهای استفاده شده در جدول ۱ فهرست شده اند.

### تکثیر ژن *rpoB* و تعیین ژنوتیپ آن

تکثیر ژن *rpoB* با آغازگرهای اختصاصی این ژن و همراه با سویه استاندارد بروسلا ملی تنسیس 16M انجام شد. توالی آغازگرهای بالادست، (۳- ATGGCTCAGACCCATTCTTTC - ۵) rB ۱، و آغازگر در جهت پایین دست، (۳- TTATTCTGCCGCGTCCGGAA - ۵) rB ۴۱۳۴ برای تکثیر طول کل ژن *rpoB* با ۴۱۳۴ جفت باز مورد استفاده قرار گرفت (۱۷). تکثیر PCR با ۲۵ میکرولیتر از مخلوط PCR حاوی ۱/۵ میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۱۰ میکرولیتر Tris-HCl (PH 8)، ۰/۲ میلی مولار از هر نوکلئوتید، ۵۰ میلی مولار KCl، ۰/۰۵ واحد بین المللی Taq polymerase، ۰/۵ میلی مولار از هر آغازگر و ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی (ارزیابی شده در ۲۶۰ نانومتر) انجام شد. برای مشخص کردن انواع

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی باکتری های جداسازی شده و اندازه های محصول PCR مورد انتظار برای انواع مختلف بروسلا

منابع	اندازه (جفت باز)	DNA هدف	توالی پرایمر (5'-3')	پرایمر مورد استفاده	سویه باکتری
(19)	۴۹۸	IS711	TGCCGATCACTTTCAAGGGCCTTCAT GACGAACGGAATTTTCCAATCCC	IS711 AB	<i>B. abortus</i>
(19)	۷۳۱	IS711	TGCCGATCACTTTCAAGGGCCTTCAT AAATCGCGTCTTGCTGGTCTGA	IS711 BM	<i>B. melitensis</i>
(19)	۹۷۶	IS711	TGCCGATCACTTTCAAGGGCCTTCAT CGGGTTCTGGCACCATCGTCG	IS711 <i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>
(19)	۲۸۵	IS711	TGCCGATCACTTTCAAGGGCCTTCAT GCGCGGTTTTCTGAAGGTTTCAGG	IS711 <i>B. suis</i>	<i>B. suis</i>
(4)	۱۶۸۲	Glycosyltransferase, gene wboA	ATC CTA TTG CCC CGATAA GG GCT TCG CAT TTT CACTGT AGC	BMEI0998f BMEI0997r	<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. melitensis Rev.1</i>
(4)	۴۵۰	Immunodominant antigen, gene bp26	GCG CAT TCT TCG GTTATG AA CGC AGG CGA AAA CAGCTA TAA	BMEI0535f BMEI0536r	<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. melitensis Rev.1</i>
(4)	۱۰۷۱	Outer membrane protein, gene omp31	TTT ACA CAG GCA ATCCAG CA GCG TCC AGT TGT TGTTGA TG	BMEI0843f BMEI0844r	Deletion of 25,061 bp in BMEI0826–BMEI0850 in <i>B. abortus</i>

منابع	اندازه (جفت باز)	DNA هدف	توالی پرایمر (5'-3')	پرایمر مورد استفاده	سویه باکتری
(4)	۷۹۴	Polysaccharide deacetylase	ACG CAG ACG ACC TTCGGTAT TTT ATC CAT CGC CCTGTCAC	BMEI1436f BMEI1435r	<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. melitensis Rev.1</i>
(4)	۵۸۷	Erythritol catabolism, gene eryC (Derythulose-1-phosphate dehydrogenase)	GCC GCT ATT ATG TGGACT GG AAT GAC TTC ACG GTCGTT CG	BMEII0428f BMEII0428r	<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. melitensis Rev.1</i>
(4)	۲۷۲	ABC transporter binding protein	GGA ACA CTA CGC CACCTT GT GAT GGA GCA AAC GCTGAA G	BR0953f BR0953r	Deletion of 2,653 bp in BR0951- BR0955 in <i>B. melitensis</i> and <i>B. abortus</i>
(4)	۲۱۸	Ribosomal protein S12, gene <i>rpsL</i>	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA	BMEI0752f BMEI0752r	Point mutation in BMEI0752 in <i>B. melitensis Rev.1</i>
(4)	۱۵۲	Transcriptional regulator, CRP family	CGC AGA CAG TGA CCATCA AA GTA TTC AGC CCC CGTTAC CT	BMEII0987f BMEII0987r	<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. melitensis Rev.1</i>

## یافته‌ها

### جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

در این مطالعه، از ۱۰۸ نمونه خون افراد مبتلا به بروسلوزیس با سرولوژی مثبت، تعداد ۱۰ جدایه باکتری از خون و ۱ جدایه باکتری از مایع مغزی نخاعی افراد بیمار جداسازی شد. ویژگی‌های معمول فنوتیپی گونه‌های بروسلا مانند ظاهر کلونی شفاف کوچک، با رنگ عسلی و سطح صاف از باکتری‌های جدا شده مشاهده شد.

۱۱ جدایه باکتریایی پس از ۵ روز از انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس و با ۱۰ درصد دی‌اکسید کربن رشد کردند. باکتری‌های جدا شده از نظر رنگ‌آمیزی گرم منفی بودند، سولفید هیدروژن تولید نمی‌کردند و با فازهای استاندارد در روش شناسایی کلاسیک بروسلا لیز نمی‌شدند، همچنین در مقابل رنگ فوشین و تیونین رشد داشتند لذا بر اساس جداول استاندارد OIE برای شناسایی بروسلاها در سطح بیووار متعلق به بروسلا ملی تنسیس بیووار ۱ و ۳ تشخیص داده شدند (جدول ۲).

جدول ۲. جدایه‌های بروسلا ملی تنسیس و شناسایی با استفاده از روش‌های مختلف تیپ مولکولی

مکان	سال	Amos PCR	Bruce-ladder	بیوتیپ	منبع	شماره دسترسی	جدا شده
کرج	۲۰۱۸	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i> bv3	خون انسان	MK629658	S1
کرج	۲۰۱۷	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i> bv3	خون انسان	MK629659	S2
کرج	۲۰۱۹	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i> bv1	خون انسان	MK629660	S3
قم	۲۰۱۹	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i> bv1	خون انسان	MK629661	S4
کرمان	۲۰۱۹	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i> bv1	خون انسان	MK790247	S5
تهران	۲۰۱۸	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i> bv1	انسان مایع مغزی نخاعی	MK790248	S6
کرج	۲۰۱۷	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i> bv1	خون انسان	MK598748	S7
مشهد	۲۰۱۸	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i> bv1	خون انسان	MK790249	S8
همدان	۲۰۱۸	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i> bv1	خون انسان	MK790250	S9
کرمانشاه	۲۰۱۹	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i> bv1	خون انسان	MK790251	S10
یزد	۲۰۱۸	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i> bv1	خون انسان	MK790252	S11

## تایید مولکولی باکتری‌های جداسازی شده

جدایه‌ها در سطح مولکولی با استفاده از روش مولتی پلکس AMOC PCR و Bruce-ladder در سطح گونه مورد شناسایی و تایید قرار گرفتند. از نظر نتایج بیوتایپینگ مشخص شد که جدایه‌های بالینی متعلق به بروسلا ملی تنسیس بیووار ۱ یا ۳ بودند. در شناسایی جدایه‌ها توسط AMOS-PCR محصول ۷۳۱ جفت باز برای همه جدایه‌ها مشخص گردید که نماینگر جنس بروسلا ملی تنسیس بود. همچنین بروسلا ملی تنسیس بودن همه جدایه‌ها در واکنش Bruce-ladder با تکثیر محصولات PCR به وزن ۱۵۲، ۴۵۰، ۵۸۷، ۷۹۴ و ۱۰۷۱ و ۱۶۸۲ جفت باز تایید شد.

## تعیین ژنوتیپ بروسلا بر مبنای تجزیه و تحلیل ژن

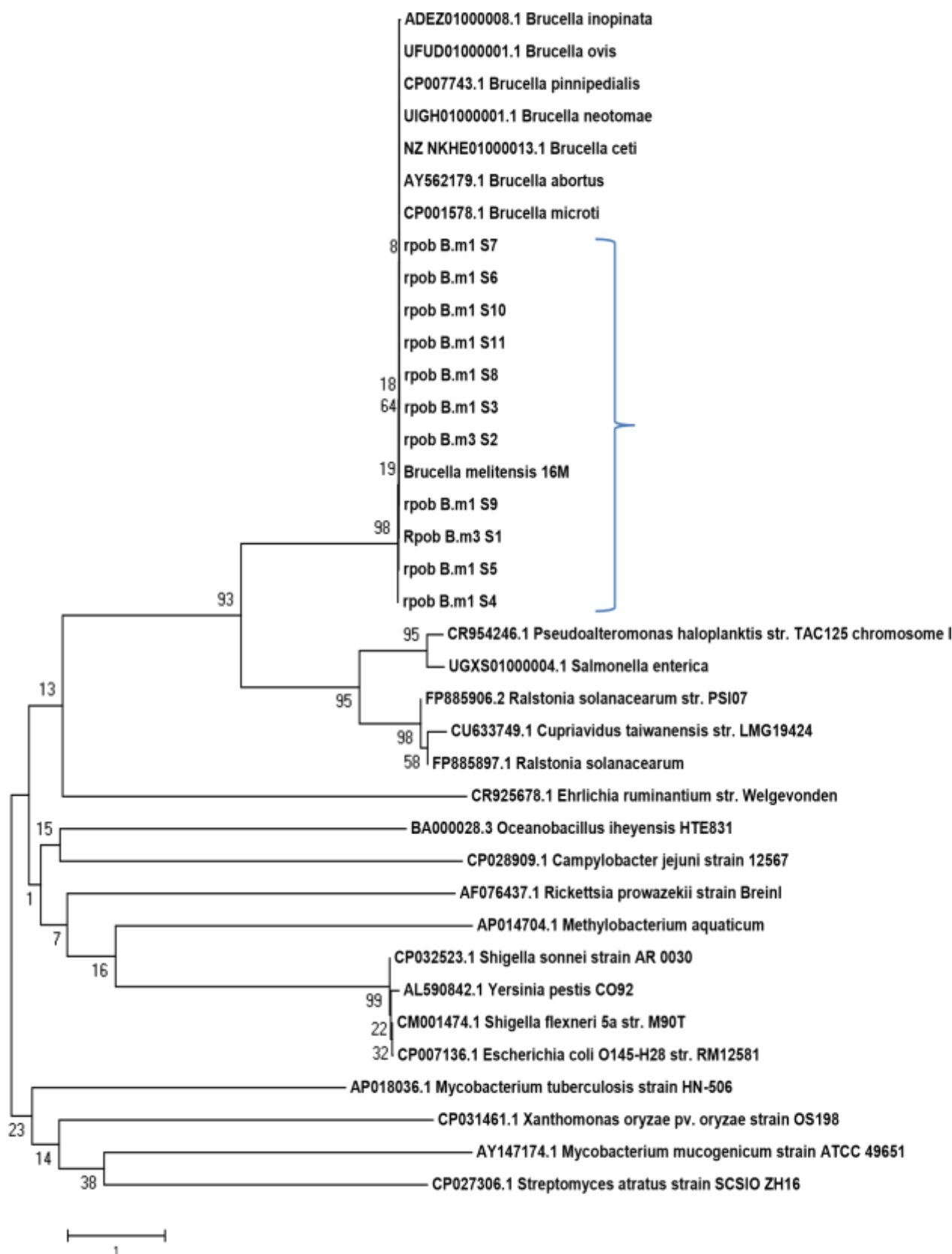
*rpoB*

تعیین ژنوتیپ بروسلا ملی تنسیس با استفاده از روش تجزیه و تحلیل چندشکلی تک نوکلئوتیدی ژن *rpoB* برای اولین بار در ایران انجام شد و نتایج با توالی‌های ثبت شده در پایگاه داده NCBI مقایسه گردید. برای این منظور از سویه‌های جدا شده از خون انسان (۱۰) و مایع مغزی نخاعی (۱) در این مطالعه استفاده گردید. طبق نتایج ما، تیپ *rpoB* اکثر جدایه‌های بالینی در تیپ دو *rpoB* با نقشه ژنومی 629-Val (GTG), 985-Val (GTC), 1249-Met (ATG) and 1309-Leu (CTA) and دسته‌بندی شدند. در حالی که تنها یکی از آن‌ها متعلق به نوع ۱ با نقشه ژنومی 629-Ala (GCG), 985-Ala (GTC), 1249-Met (ATG) and 1309-Leu (CTG) بود. توالی‌های ژنی و آمینو اسید حاصل در پایگاه داده NCBI با شماره‌های دسترسی MK629658, MK629659, MK629660, MK629661, MK790247, MK790248, MK598748, MK790249, MK790250, MK790251 و MK790252 ذخیره شدند. همچنین توان تمایز ژن *rpoB* برای شناسایی جدایه‌های ایرانی بروسلا برای اولین بار در این مطالعه تایید شد. اکثر جدایه‌های ایرانی در این مطالعه به *rpoB* نوع ۲ تعلق داشت و فقط یکی از آن‌ها به *rpoB* نوع ۱ تعلق داشت. همچنین تیپ ۳ *rpoB* در این مطالعه مشخص نشد. از میان ۱۰ سویه *rpoB* نوع ۲، شش سویه با فقط یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی در کدون ۹۸۵ مشاهده شد که جهش نقطه‌ای ۹۸۵ (GCC)-Ala به جای Val (GTC) را نشان دادند. بنابراین این سویه‌ها باید به صورت گونه جدیدی از ژنوتیپ نوع ۲ بروسلا ملی تنسیس در نظر گرفته شوند. (شماره سویه‌های مذکور در بانک داده NCBI: MK629660, MK629658, MK629661, MK790249, MK790252) (شکل ۲). در چهار

جدایه دیگر، هیچ الگوی جهش در کدون ۹۸۵ از ژنوتیپ نوع ۲ مشاهده نشد.

## بحث

شناسایی گونه‌های بروسلا از اهمیت ویژه‌ای در برنامه‌های ریشه‌کشی و کنترل تب مالت و تحلیل ردیابی اپیدمیولوژیک بیماری انسان و حیوان برخوردار است. از طرفی گسترش جهانی عفونت‌های بروسلا در حیوانات و انسان، نیاز حیاتی آزمایشگاه‌های مرجع منطقه‌ای/ محلی مختلف را برای استفاده از رویکردهای مولکولی مشابه شناسایی باکتری‌های بروسلا به منظور تسهیل تبادل داده‌ها و مقایسه آن‌ها با همدیگر نشان داده است. در حال حاضر، شناسایی گونه‌ها و زیر گونه‌ها بر اساس تجزیه و تحلیل انواع زیادی از صفات متشکل از سرولوژی، نیازهای رشد و فنوتیپ بیوشیمیایی انجام می‌شود. این آزمایشات وقت گیر بوده و خطر ابتلا به عفونت را برای تکنسین‌ها افزایش می‌دهد. علاوه بر این، تنوع محدود در برخی از گونه‌ها و بیوارهای بروسلا ممکن است منجر به داده‌های متناقض و تفسیر پیچیده شود (۲۳). در برخی مطالعات گزارش شده است که گونه‌های بالینی بروسلا ملی تنسیس جدا شده از نمونه‌های انسانی، الگوهای غیر معمول فنوتیپی را در تست حساسیت به رنگ‌های فوشین و تیونین نشان می‌دهند (۱۵، ۱۶). اخیراً، انواع بیوارهای بروسلا ملی تنسیس ۱، ۲ و ۳ از تعداد زیادی از کشورهای اروپایی، آسیایی، آفریقایی و آمریکای جنوبی جدا شده‌اند که در تست‌های حساسیت به رنگ متفاوت هستند (۲۴). علاوه بر این، خصوصیات بیوتیپ گونه‌های بروسلا ملی تنسیس جدا شده در اسرائیل، از نظر سرولوژیکی به عنوان بیووار ۱ شناخته شدند ولی حساسیت آنتی‌بیک به رنگ‌های فوشین و تیونین و پنی‌سیلین را نشان دادند (۹). با این حال، مشاهدات اخیر نشان داده است که تفاوت بین گونه‌های بروسلا ملی تنسیس تنها به الگوی آگلوتیناسیون محدود نمی‌شود. حساسیت به رنگ، در حالی که نمایانگر یک ویژگی فنوتیپی آن است، پایه و اساس شناسایی برخی از بیوارهای بروسلا ابورتوس را نیز تشکیل می‌دهد (۲۵). از این رو، روش‌های مولکولی متنوعی برای شناسایی گونه‌های بروسلا طراحی شده است، به طور مثال مشخص شده است که تکنیک PCR-RFLP یک روش سریع و کاربردی به ویژه برای جداسازی، تشخیص و تمایز بین گونه‌های بروسلا ملی تنسیس و بیوارهای بروسلا ابورتوس در نمونه خون انسانی است (۲۶). در مطالعه تکمیلی دیگر همچنین مشخص شد



شکل ۱: رابطه فیلوژنی با استفاده از روش Neighbor-Joining قدرت تمایز ژن بین گونه‌های بروسلا و سایر باکتری‌ها در شکل نشان می‌دهد. درصد تکرار که در آن گونه‌های مرتبط با هم جمع شده در تست بوت استرپ (۱۰۰۰ تکرار) کنار شاخه‌ها نشان داده شده‌اند. فواصل تکاملی با استفاده از روش Maximum Composite Likelihood محاسبه شده و در واحدهای تعداد جانشینی‌های پایه در هر سایت قرار دارند. تجزیه و تحلیل تکاملی در MEGA6 انجام شد.



بروسلا به‌وسیله تعیین توالی ژن *rpoB* را نشان داد (۸، ۳۱). ژنوتیپ‌های مختلف بروسلا ملی تنسیس بر اساس انواع *rpoB*، با توجه به ترکیب چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در کدون‌های ۶۲۹، ۹۸۵، ۱۲۴۹ و ۱۳۰۹ شناسایی شده‌اند (۱۶). تا کنون ۳ ژنوتیپ مهم با توجه به نوع *rpoB* بروسلا ملی تنسیس، از جمله *rpoB* نوع ۱ 1309-629-Ala (GCG), 985-Ala (GCC), 1249-Met (ATG) 629-Val (GTG), 985-Val (GTC), نوع ۲ *rpoB* Leu (CTG) 629-Ala (ATG) و 1249-Met (ATG) 1309-Leu (CTA) و 1309-Leu (CTG), 985-Ala (GCC), 1249-Ile (ATA) (GCG) و شناسایی و در کشورهای مختلف گزارش شده است (۱۶، ۲۰). نتایج حاصل از این مطالعه، مطابق با یافته‌های یک مطالعه اسپانیایی هستند که جهش‌های نقطه‌ای مشابه را در همان مکان مشابه (کدون ۹۸۵) برای سه گونه *rpoB* نوع ۲ بروسلا ملی تنسیس نشان می‌دهند. جهش‌های نقطه‌ای دیگر در کشور ترکیه در ژنوتیپ ۲ گونه‌های بروسلا ملی تنسیس در مطالعات دیگر گزارش شده است که شامل تنها دو جهش نقطه‌ای از سه جهشی است که توسط Sayan M و همکارش مشخص شده بود (۱۶). طبق گزارش تان و همکاران، بیشتر سویه‌های جمع‌آوری شده از کشورهای آمریکایی و اروپایی به نوع ۱ *rpoB* تعلق دارند، در حالی که نوع ۲ *rpoB* عمدتاً در میان سویه‌های جمع‌آوری شده از آسیا، آفریقا و اروپا گزارش شده است (۸). با این حال، نتایج ما نشان داد که هر دو نوع *rpoB* نوع ۱ و ۲ در جدایه‌های ایرانی بروسلا ملی تنسیس در ایران وجود دارند. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک انجام شده در مطالعات دیگر نیز استفاده از روش اتصال-همسایگی (neighbor-joining) را همانند این مطالعه تایید کردند (۱۵، ۳۲) در نهایت می‌توان تایید کرد که با وجود همولوژی زیاد DNA در جنس بروسلا، ژن *rpoB* می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر مولکولی بسیار اختصاصی و پایدار به دلیل تغییرات قابل توجه مشخص شده در این ژن عمل کند (۱۵، ۳۲). این روش امکان شناسایی سریع و تمایز بروسلا را نیز فراهم می‌آورد.

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، نتایج ژنوتیپ جدایه‌های بروسلا ملی تنسیس از طریق تجزیه و تحلیل چند شکلی تک نوکلئوتیدی روی ژن *rpoB*، منجر به شناسایی و طبقه‌بندی موفقیت‌آمیز جدایه‌های بالینی بروسلا ملی تنسیس در ایران شد و راه را برای درک بهتر گسترش ژنوتیپ‌های گونه‌های بروسلا آلوده‌کننده انسان در سطح منطقه‌ای هموار نمود. با توالی ژن *rpoB*، همچنین مشخص شد که می‌توان شناسایی در سطح بیووار را بدون نیاز به امکانات آزمایشگاهی خاص انجام داد.

که الکتروفورز مبتنی بر پالس-فیلد ژل (PFGE) روش قابل اطمینان و مفیدتری برای تیپ مولکولی سویه‌های بروسلا است و در تعیین شباهت ژنتیکی بین جدایه‌های بروسلا در انسان و حیوان نسبت به روش PCR-RFLP ارجح است (۲۷). علاوه بر این، روش‌های ترکیبی مولکولی بهینه شده نیز به طور همزمان قادر به تشخیص و تفکیک گونه‌های بروسلا ملی تنسیس و بروسلا ابورتوس با ویژگی و حساسیت بالایی در نمونه‌های بالینی معرفی شده است (۲۸). علاوه بر این، تشخیص و تفریق گونه‌های بروسلا ملی تنسیس و بروسلا ابورتوس به وسیله ریل تایم PCR و منحنی آنالیز ذوب با وضوح بالا (HRM) در خون انسان به‌عنوان روش مفیدی در مقایسه با-PCR/RFLP بیان شده است (۲۹). در این مطالعه، یک روش تایپینگ مولکولی بر اساس پلی‌مورفیسم DNA در ژن *rpoB* در بروسلا ارائه شده است. ما از نظر مولکولی ژن *rpoB* را در ۱۱ سویه جداسازی شده بروسلا در نمونه‌های بالینی، توسط PCR مشخص کردیم. علیرغم درجه بالایی از همولوژی DNA بروسلا، مقایسه توالی‌های ژن *rpoB* برای همه گونه‌های بروسلا در ۱۱ ایزوله جداسازی شده، در کدون‌های ۶۲۹، ۹۸۵، ۱۲۴۹ و ۱۳۰۹ تغییرات قابل توجهی را نشان دادند. همچنین، مقایسه توالی‌های *rpoB* بروسلا ملی تنسیس منجر به طبقه‌بندی مولکولی و فیلوژنی ۱۱ جدایه بالینی ناشی از استان‌های مختلف ایران شده است (شکل ۱). همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، تجزیه و تحلیل فیلوژنی بر اساس این ژن، قدرت بسیار زیاد *rpoB* را برای تشخیص و تمایز سویه‌های بروسلا از باکتری‌های دیگر نشان داد. تایپینگ مولکولی بر مبنای *rpoB* توانایی تعیین و تفریق ژنوتیپ‌های درون‌گونه‌ای بروسلا و تمایز گونه‌های بروسلا از همدیگر را به‌طور هم‌زمان بر اساس تجزیه و تحلیل چند شکلی تک نوکلئوتیدی روی ژن *rpoB*، برای ما فراهم می‌سازد که در روش‌های تفریقی مولکولی دیگر این دو امر به‌صورت هم‌زمان امکان‌پذیر نیست. در مطالعات مختلف گزارش شده است که آنالیز روابط فیلوژنتی بر اساس ژن *rpoB* تقریباً سه برابر بیشتر از آنالیز حاصل از تجزیه و تحلیل 16S rRNA در شناسایی گونه‌های با همولوژی بالا در ژنوم بروسلاها دقت عمل دارد (۸، ۱۵، ۳۰). همچنین جایگاه 16S rRNA، فاقد تنوع توالی کافی برای تمایز گونه‌های بروسلا است (۳۰). علاوه بر این، ابزارهای شناسایی جدید بر اساس یک قطعه ژن *rpoB* واقع در بین موقعیت‌های ۶۲۹، ۹۸۵، ۱۲۴۹ و ۱۳۰۹ قرار دارد که دارای اهمیت بالایی در شناسایی ژنوتیپ‌های بروسلا ملی تنسیس و تمایز گونه‌های بروسلا است. استفاده از این ژن، مزیت شناسایی و تمایز باکتری‌های مرتبط نزدیک به هم با همولوژی بالا در ژنوم را امکان‌پذیر می‌نماید. این روش همچنین حساسیت بالایی در تمایز بین گونه‌های

## منابع مالی

این مطالعه با کمک هزینه ۲-۱۸-۱۸-۰۳۶-۹۶۰۵۰۴ از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و توسعه کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران مصوب ۱۳۹۶/۵/۲۴ پشتیبانی شد.

## سپاسگزاری

از بخش بروسلوز موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

## تعارض در منافع

در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی نداشته‌اند.

## Referance

- Dadar M, Shahali Y, Whatmore AM. Human brucellosis caused by raw dairy products: A review on the occurrence, major risk factors and prevention. *Int J Food Microbiol*. 2018. [DOI:10.1016/j.jfoodmicro.2018.12.009] [PMID]
- Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis*. 1997;3(2):213. [DOI:10.3201/eid0302.970219] [PMID] [PMCID]
- Mirnejad R, Jazi FM, Mostafaei S, Sedighi M. Epidemiology of brucellosis in Iran: A comprehensive systematic review and meta-analysis study. *Microb Pathog*. 2017;109:239-47. [DOI:10.1016/j.micpath.2017.06.005] [PMID]
- Lopez-Goñi I, Garcia-Yoldi D, Marin C, De Miguel M, Munoz P, Blasco J, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol*. 2008;46(10):3484-7. [DOI:10.1128/JCM.00837-08] [PMID] [PMCID]
- Dadar M, Alamian S, Behrozikhah AM, Yazdani F, Kalantari A, Etemadi A, editors. Molecular identification of *Brucella* species and biovars associated with animal and human infection in Iran. *Veterinary Research Forum*; 2019: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University.
- Asadi FT, Hashemi SH, Alikhani MY, Moghimbeigi A, Naseri Z. Clinical and diagnostic aspects of brucellosis and antimicrobial susceptibility of *Brucella* isolates in Hamedan, Iran. *Jpn J Infect Dis*. 2016;JJID. 2016.133.
- Morgan W, Corbel M. Recommendations for the description of species and biotypes of the genus *Brucella*. *Dev Biol Stand*. 1976;31:27-37.
- Tan K-K, Tan Y-C, Chang L-Y, Lee KW, Nor'e SS, Yee W-Y, et al. Geographical distribution of *Brucella melitensis* inferred from *rpoB* gene variation. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2017;11(05):420-5. [DOI:10.3855/jidc.7598] [PMID]
- Banai M, Mayer I, Cohen A. Isolation, identification, and characterization in Israel of *Brucella melitensis* biovar 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. *J Clin Microbiol*. 1990;28(5):1057-9. [DOI:10.1128/JCM.28.5.1057-1059.1990] [PMID] [PMCID]
- Meyer M. Evolution and taxonomy in the genus *Brucella*: contemporary evolutionary status of the species *Brucella abortus*. *Am J Vet Res*. 1976;37(2):203-5.
- Baily G, Krahn J, Drasar B, Stoker N. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *Trop Med Int Health*. 1992;95(4):271-5.
- Costa MD, Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiebaud M, Dubray G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J Appl Bacteriol*. 1996;81(3):267-75. [DOI:10.1111/j.1365-2672.1996.tb04328.x] [PMID]
- Verger J-M, Grimont F, Grimont PA, Grayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1985;35(3):292-5. [DOI:10.1099/00207713-35-3-292]
- Verger J, Grimont F, GRIMONT PD, Grayon M, editors. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie*; 1987. [DOI:10.1016/0769-2609(87)90199-2]
- Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R. Molecular characterization of the *rpoB* gene in *Brucella* species: new potential molecular markers for genotyping. *Microbes and infection*. 2006;8(3):860-5. [DOI:10.1016/j.micinf.2005.10.008] [PMID]
- Sayan M, Yumuk Z, Bilenoglu O, Erdenlig S, Willke A. Genotyping of *Brucella melitensis* by *rpoB* gene analysis and re-evaluation of conventional serotyping method. *Jpn J Infect Dis*. 2009;62(2):160-3.
- Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R. Genetic bases of the rifampin resistance phenotype in *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5439-43. [DOI:10.1128/JCM.42.12.5439-5443.2004] [PMID] [PMCID]
- Dadar M, Alamian S. Identification of main *Brucella* species implicated in ovine and caprine abortion cases by molecular and classical methods. *Archives of Razi Institute*. 2020.
- Ewalt DR, Bricker BJ. Validation of the Abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a Rapid Screening Method for Differentiation of *Brucella abortus* Field Strain Isolates and the Vaccine Strains, 19 and RB51. *Journal of clinical*

- microbiology. 2000;38(8):3085-6. [DOI:10.1128/JCM.38.8.3085-3086.2000] [PMID] [PMCID]
20. Valdezate S, Navarro A, Villalón P, Carrasco G, Saéz-Nieto JA. Epidemiological and phylogenetic analysis of Spanish human *Brucella melitensis* strains by multiple-locus variable-number tandem-repeat typing, hypervariable octameric oligonucleotide fingerprinting, and rpoB typing. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2734-40. [DOI:10.1128/JCM.00533-10] [PMID] [PMCID]
21. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725-9. [DOI:10.1093/molbev/mst197] [PMID] [PMCID]
22. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*. 1969;3:21-132. [DOI:10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7]
23. Alton GG, Jones LM, Angus R, Verger J. *Techniques for the brucellosis laboratory*: Institut National de la recherche Agronomique (INRA); 1988.
24. Corbel M. Identification of dye-sensitive strains of *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol*. 1991;29(5):1066-8. [DOI:10.1128/JCM.29.5.1066-1068.1991] [PMID] [PMCID]
25. Stableforth A, Jones LM. Report of the Subcommittee on the Taxonomy of the Genus *Brucella*. Speciation in the Genus *Brucella*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*. 1963;13(3):145-58. [DOI:10.1099/0096266X-13-3-145]
26. Mirnejad R, Mohammadi M, Majdi A, Taghizoghi N, Piranfar V. Molecular typing of *Brucella melitensis* and *B. abortus* from human blood samples using PCR-RFLP method. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2013;6(6):1B. [DOI:10.5812/jjm.7197]
27. Bahmani N, Mirnejad R, Arabestani MR, Mohajerie P, Hashemi SH, Karami M, et al. Comparison of PCR-RFLP and PFGE for determining the clonality of *Brucella* isolates from human and livestock specimens. *Saudi J Biol Sci*. 2019;26(2):256-62. [DOI:10.1016/j.sjbs.2017.08.017] [PMID] [PMCID]
28. Mirnejad R, Doust RH, Kachuei R, Mortazavi SM, Khoobdel M, Ahamadi A. Simultaneous detection and differentiates of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* by combinatorial PCR. *Asian Pac J Trop Med*. 2012;5(1):24-8. [DOI:10.1016/S1995-7645(11)60239-3]
29. Piranfar V, Sharif M, Hashemi M, Vahdati AR, Mirnejad R. Detection and discrimination of two *Brucella* species by multiplex real-time PCR and high-resolution melt analysis curve from human blood and comparison of results using RFLP. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2015;18(9):909.
30. Gee JE, De BK, Levett PN, Whitney AM, Novak RT, T. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. *J Clin Microbiol*. 2004;42(8):3649-54. [DOI:10.1128/JCM.42.8.3649-3654.2004] [PMID] [PMCID]
31. Sayan M, Yumuk Z, Dündar D, Bilenoglu O, Erdenlig S, Yaşvar E, et al. Rifampicin resistance phenotyping of *melitensis* by rpoB gene analysis in clinical isolates. *J Chemother*. 2008;20(4):431-5. [DOI:10.1179/joc.2008.20.4.431] [PMID]
32. Ogier J-C, Pages S, Galan M, Barret M, Gaudriault S. rpoB, a promising marker for analyzing the diversity of bacterial communities by amplicon sequencing. *BMC Microbiol*. 2019;19(1):171. [DOI:10.1186/s12866-019-1546-z] [PMID] [PMCID]