NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.12/47 , 2022

Scan online to view this article

Genotyping of *Brucella* bacteria isolated from samples of patients suspected of brucellosis by technique PCR-RFLP in Tehran(2017-2020)

Ehsan Jamshidi Moghaddam[1], Saeed Zaker Bostan Abad[2*], Mohammad Karim Rahimi[3]

1. Department of Microbiology, Faculty of advanced science and technology, Tehran medical science, Islamic Azad university, Tehran, Iran
2. Department of Biology and Microbiology, Faculty of Medicine, Parand Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty Medicine, Tehran medical science, Islamic Azad university, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Brucellosis is one of the most important diseases of zoonosis and is very important in many countries, including Iran, from a health and economic point of view. In this study, the Genotyping of *Brucella* bacteria isolated from samples of patients suspected of brucellosis was evaluated by PCR RFLP in Tehran.

Material and methods: Out of 453 Blood samples suspected of brucellosis of patients who had referred to laboratories in Tehran were inoculated in Castanida culture media and stored at 37 ° C for 21 days. DNA was extracted from colonies that had grown on the surface. *Brucella omp2a* gene was amplified by PCR using a specific primer. PCR products were analyzed with Pst1 restriction enzyme, digestion and RFLP patterns.

Results: Out of the total samples, it grew in 10 colonies and was confirmed by *Brucella* by PCR method. In RFLP test, in 8 specimens, *Brucella melitensis* and in 2 specimens, *Brucella abortus* were detected.

Conclusion: There is brucellosis in our country,infections are also observed in some villages,and among these cases, *Brucella melitensis* is more common than other species and with the help of molecular methods, in the shortest possible time, high accuracy and sensitivity and with less risk, the presence of different diseases and species of *Brucella* can be detected.

Keywords: Brucellosis,*Brucella*,Genotyping, RFLP**,** Iau Science.

Corresponding author:
Department of Biology and Microbiology, Faculty of Medicine, Parand Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran
Email: saeedzaker20@yahoo.com

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.5.2]

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۲ - شماره۴۷ - تابستان۱۴۰۱
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

ژنوتایپینگ گونه‌های باکتری *بروسلا* جدا شده از نمونه‌های بیماران مشکوک به تب مالت با تکنیک PCR-RFLP در تهران سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۶

احسان جمشیدی مقدم[۱]، سعید ذاکر بستان آباد*[۲]، محمد کریم رحیمی[۳]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم فناوری نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران،ایران
۲. گروه بیولوژی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز است. در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران، از نظر بهداشتی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت است. در این مطالعه، ژنوتایپینگ گونه‌های باکتری *بروسلا* جدا شده از نمونه‌های بیماران مشکوک به تب مالت به‌وسیله تکنیک PCR RFLP در تهران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: از مجموع ۴۵۳ نمونه خون مشکوک به بروسلوز بیمارانی که از سال ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۹ به آزمایشگاه‌های تهران مراجعه کرده بودند، در محیط‌های کشت کاستاندا تلقیح گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۱ روز نگهداری شد. از کلنی‌هایی که در سطح محیط رشد کرده بودند DNA استخراج شد. ژن *omp2a* *بروسلا* به روش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی تکثیر گردید. .محصول‌های PCR، با آنزیم محدود کننده Pst1 ، هضم و الگوهای RFLP حاصل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: از کل نمونه‌ها، در ۱۰ مورد کلنی رشد کرد که تست‌های افتراقی جهت جدا سازی گونه‌ها انجام شد .به روش PCR از نظر *بروسلا* تأیید شد و در آزمایش RFLP، در ۸ نمونه گونه *بروسلا ملی تنسیس* و در ۲ نمونه گونه *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شد.

بحث: در کشور ما بیماری بروسلوز وجود دارد و هم‌چنان موارد ابتلا در برخی از روستاها مشاهده می‌شود و در بین این موارد،گونه *بروسلا ملی تنسیس* نیز فراوانی بیش‌تری نسبت‌به سایر گونه‌ها دارد.

نتیجه‌گیری: با روش‌های مولکولی به‌راحتی، در کم‌ترین زمان ممکن، دقت و حساسیت بالا و با خطرکم‌تر، می‌توان وجود بیماری و گونه‌های مختلف *بروسلا* را تشخیص داد.

واژه‌های کلیدی: بروسلوز، *بروسلا*، ژنوتایپینگ، RFLP، Iau Science.

مقدمه

بروسلوز(Brucellosis) یا تب مالت، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز به‌شمار می‌رود، که شیوع بالایی در سراسر جهان داشته و به‌دلیل مشترک بودن این بیماری بین انسان‌ها و حیوانات از لحاظ اقتصادی و بهداشتی دارای اهمیت است. عامل بیماری بروسلوز گونه‌های مختلف باکتری *بروسلا* است (۱،۲،۳).

راه‌های انتقال بیماری تب مالت به انسان‌ها از طریق فرآورده‌های شیری آلوده و غیر پاستوریزه، تماس مستقیم با حیوانات آلوده و یا استنشاق ذرات آئروسل آلوده در محیط

نویسنده مسئول:
گروه بیولوژی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
پست الکترونیکی: saeedzaker20@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.5.2]

اتفاق می‌افتد. هم‌چنین باکتری *بروسلا* به‌عنوان حامل باکتریایی قابل استفاده در سلاح‌های بیولوژیک مطرح است (۴).

باکتری *بروسلا*، کوکوباسیل گرم منفی با اندازه ۰/۵ – ۰/۷، ۰/۶ – ۱/۵ u هوازی، فاقد اسپور[1] و کپسول[2] واقعی، فاقد فلاژل[3] و بدون حرکت و انگل اختیاری درون سلولی هستند. در محیط کشت به کندی رشد کرده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌نحو مطلوبی رشد می‌کنند. کلنی آن‌ها به‌طور معمول به‌صورت صاف و شفاف است، لذا در بعضی از گونه‌ها[4] (*بروسلا کنیس و بروسلا اوویس*)کلنی به‌صورت خشن و موکوئیدی نیز مشاهده می‌شود. غشای خارجی *بروسلا* از لیپوپلی‌ساکارید و پروتئین تشکیل شده است. تاکنون ۱۲ گونه از باکتری *بروسلا* شناسایی شده است. که چهار گونه از آن‌ها که عبارتند از: *بروسلا ملی تنسیس*[5] (بزها و گوسفندها)، *بروسلا آبورتوس*[6] (گاوها)، *بروسلا سوییس*[7] (خوک‌ها) و *بروسلا کنیس*[8] (سگ‌ها)، برای انسان بیماری‌زا هستند (۸-۵). شدت بیماری‌زایی *بروسلا ملی تنسیس* از سایر گونه‌ها بیش‌تر است و *بروسلا ملی تنسیس* دارای ۳ بیوتیپ[9] مختلف است. که بیوتیپ ۱ آن، شیوع زیادی به‌خصوص در ایران دارد. (۸)

شدت بیماری‌زایی *بروسلا آبورتوس*، نسبت‌به گونه *ملی تنسیس و سوییس* کم‌تر است و *بروسلا آبورتوس* دارای ۹ بیوتیپ مختلف نیز است. (۸،۹) *بروسلا سوییس* دارای ۵ بیوتیپ مختلف است و به‌همراه *بروسلا ملی تنسیس* شدت بیماری‌زایی بالایی دارد (۸،۱۰،۱۱). *بروسلا کنیس* برای انسان‌ها به‌ندرت بیماری‌زایی ایجاد می‌کند و میزان تهاجم و بیماری‌زایی *بروسلا کنیس* از سایر گونه‌ها کم‌تر است (۸).

برای تشخیص بروسلوز از روش‌هایی گوناگون مانند کشت، تست‌های سرولوژی و آگلوتیناسیون، الایزا و روش‌های مولکولی PCR استفاده می شود. روش‌های مولکولی بسیار سریع و دقیق و به‌مدت زمان کم‌تری نسبت‌به تست‌های سرولوژی عمل کرده و به‌راحتی می‌توان در کم‌ترین زمان جواب آزمایش افراد بیمار را مهیا کرد و هم‌چنین با روش‌های مولکولیتایپینگ (MLVA[10]،MLST[11]،RFLP[12]و...) می‌توان بیوتایپ‌ها[13] و گونه‌های مختلف بیماری بروسلوز را نیز شناسایی کرد. انجام روش‌های مولکولی، از لحاظ سلامتی افراد و پرسنل حاضر در آزمایشگاه، نسبت‌به تست سرولوژی، ایمن‌تر است و طبق مقاله Tuba dala و همکاران نیز روش های مولکولی از حساسیت بالا و دقیق تری در تشخیص بروسلوز نسبت‌به روش سرولوژی برخوردار است (۱۴-۱۲) نکته دیگر این‌که اگر بروسلوز سیستم عصبی را درگیر کند باعث استئومیلیت[14] *بروسلایی* می‌شود که تنها با روش PCR قابل تشخیص است. هم‌چنین، روش کشت که از آن به‌عنوان روش استاندارد طلایی یاد می‌شود، اما ممکن است در صورت کشت *باکتری بروسلا* از لحاظ مشاهده کردن و ارزنی شکل بودن آن با باکتری *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*[15] نیز اشتباه گرفته شود (۱۵،۱۶) و هم‌چنین روش‌های مولکولی به معایبی که تست‌های سرولوژی دارند و گاهی اوقات با جواب منفی کاذب روبه‌رو می‌شویم، ارجعیت دارد. و باید توجه داشت که اکثر تست‌های سرولوژی مانند تست رز بنگال[16] تست تأییدی نیستند و تست‌های سرولوژی نیازمند به یکدیگر هستند. هم‌چنین در تست رایت نتایج به‌صورت مثبت کاذب نیز ممکن است ارائه شود، مانند؛ اشتباه شدن با برخی از باکتری‌های گرم منفی مانند، وبا و *تولارمی*[17] و *یرسینیا*[18]و یا اگر بیمار قبلا تست پوستی بروسلین انجام داده باشد و یا تماس با واکسن‌های حاوی *ویبریوکلرا*[19] و *یرسینیا* و *تولارمی* داشته باشد. که در این صورت جواب تست، به‌صورت مثبت کاذب است .از جمله معایب دیگر تست‌های سرولوژی می‌توان به این موارد اشاره داشت که تست رایت در عفونت ناشی از *بروسلا کنیس* منفی می‌شود که به‌دلیل عدم تشابه آنتی‌ژنی *بروسلا کنیس* با آنتی‌ژن مورد استفاده در آزمایش رایت است. برخی موارد منفی کاذب در مواقعی رخ می‌دهد که نمونه سرم در آزمایشگاه بیش‌تر از ۱/۳۲۰ رقیق نشود و آنتی‌بادی بیش از حد وجود

[1] Spore
[2] Capsule
[3] Flagellum
[4] Specie
[5] *Brucella melitensis*
[6] *Brucella abortus*
[7] *Brucela suis*
[8] *Brucella canis*
[9] Biotype

[10] Multi locus variable number tandem repeat analysis
[11] Multi locus sequence typing
[12] Restriction fragment length polymorphism
[13] Biotype
[14] Osteomyelitis
[15] *Mycobacterium tuberculosis*
[16] Rose Bengal
[17] Tularemia
[18] *Yersinia*
[19] *Vibrio cholerae*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.5.2]

داشته باشد پدیده پروزون[1] رخ می‌دهد و باید توجه داشت که در این مواقع، در تیترهای بالاتر رقت‌های بالاتر ، تست رایت مثبت می‌شود. در اوایل بیماری و در زمانی که آنتی بادی تولید نشده باشد نیز تست SAT[2] منفی کاذب گزارش می گردد. در بیماران با نقص ایمنی همورال و هایپوگاماگلوبولینمی[3] ها نیز به‌دلیل کمبود گاماگلوبولین ها نتیجه منفی کاذب می‌شود. وجود آنتی‌بادی‌های بلاک کننده در سرم می‌تواند باعث گزارش منفی کاذب تست رایت گردد، که این پدیده بیش‌تر در موارد مزمن بیماری مشاهده می‌گردد. (۱۷)

شباهت زیادی که بین DNA گونه‌های *بروسلا* وجود دارد، ممکن است تمام گونه‌ها را به یک جنس شناسایی کنند. بدین ترتیب با روش‌های مولکولی، می‌توان انواع گونه‌های *بروسلا* و اختلاف بین بیوتایپ آن‌ها را مشخص کرد. که روش RFLP در انجام این امر بسیار راحت و انجام‌پذیر است. در مطالعه‌های اخیر پروتئین‌های غشای خارجی OMP[4] جنس *بروسلا* مورد توجه زیادی قرار گرفته که می-می‌تواند گونه‌های مختلف *بروسلا* و بسیاری از بیوتایپ‌ها را برای ما مشخص کند. پروتئین OMP توسط دو ژن *omp2a* و *omp2b* در غشای خارجی ساخته می‌شود. که در مطالعه‌های اخیر با استفاده از روش PCR-RFLP و با تعداد زیادی از آنزیم‌های محدودکننده [5] می‌توان همه گونه‌های مختلف *بروسلا* و بیوتایپ‌های آن‌ها را شناسایی کرد. روش‌هایی که در آزمایشگاه‌ها برای شناسایی بروسلوز در انسان‌ها استفاده می‌شود در تعیین گونه‌های مختلف *بروسلا* و بیوتایپ‌های آن ناتوان است. بدین‌ترتیب با استفاده از روش‌های مولکولی از جمله روش PCR-RFLP می‌توان در مدت زمان کمی به گونه‌ها و بیوتایپ‌های مختلف در بین انسان-ها و دام‌ها پی برد و نسبت‌به حذف دام‌های آلوده و ساخت واکسن مناسب و تجویز داروهای مناسب برای هر گونه از باکتری *بروسلا* اقدام کرد (۲۰، ۱۸،۱۹).

هدف از مطالعه حاضر، تشخیص و شناسایی گونه‌های مختلف *بروسلا* در بیماران مشکوک به بروسلوز با روش مولکولی PCR-RFLP در شهر تهران است.

[1] Prozone
[2] Standard Agglutination test
[3] Hypogammaglobulinemia
[4] Outer membrane protein
[5] Restriction enzyme

روش کار

نمونه‌گیری

از ۴۵۳ نمونه خون بیماران مشکوک به بروسلوز که از اوایل مهر ماه ۱۳۹۶ تا اوایل مهر ماه ۱۳۹۹ به آزمایشگاه‌های مختلف تهران (مسعود، میلاد، دانشگاه ایران، بقیه الله) مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفت و تمامی نمونه‌های خون بیماران در محیط کشت انتخابی کاستاندا[6] کشت داده شد. در صورت رشد کردن باکتری، گلبول‌های قرمز، لیز شده (رسوب داده) و گاز تولید می‌شود. که موارد مثبت بر روی محیط *بروسلا* آگار کشت داده شد، تا بتوان از کلنی‌ها جهت استخراج DNA بهره گرفت.

کشت

محیط‌های کشت کاستاندا در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند که بعد از گذشت روزهای دوم، سوم، هفتم و در نهایت در روز بیست و یکم مشاهده و بررسی شدند. از هر یک، محیط کشت‌هایی که در آن‌ها تولید گاز و رسوب گلبول‌های قرمز رخ داده بود، که نشان-دهنده رشد باکتری بود، بر روی محیط کشت شکلات آگار[7] به‌صورت چهار مرحله‌ای پاساژ داده شد و کلنی‌هایی که بر روی محیط کشت شکلات آگار رشد کرده بودند، بررسی شدند. از تست‌های بیوشیمیایی برای شناسایی جنس و گونه‌ها استفاده شد. از انجام تست O-F برای اثبات توانایی اکسیداسیون و تخمیر قند (اکسیداتیو-فرمانتاتیو)، مثبت شدن تست اکسیداز و رشد کردن در شرایط هوازی و نداشتن تحرک در اثبات جنس *بروسلا* استفاده شد. سپس بر اساس زمان مثبت شدن تست اوره آز، توانایی تولید گاز SH_2 و نیاز به CO_2 برای رشد در افتراق گونه‌ها استفاده شد.

استخراج DNA

کلنی از محیط *بروسلا* آگار برداشته شده و به روش جوشاندن، استخراج DNA انجام شد و توالی پرایمرها در نرم‌افزار ncbi، بررسی، و اختصاصیت آن سنجیده شد (۲۲) (جدول ۱).

مراحل آماده سازی برای انجام فرآیند PCR

[6] Castanida
[7] Chocolate Agar

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.5.2]

به‌ترتیب ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس از شرکت Ampliqon سازنده کشور دانمارک و ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۱ میکرولیتر از پرایمر فوروارد و ۱ میکرولیتر از پرایمر ریورس و ۷ میکرولیتر از ژنوم برای هر.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در تحقیق

پرایمر	توالی
Forward	GGCTATTCAAAATTCTGGCG
Reverse	ATCGATTCTCACGCTTTCGT

کدام از نمونه‌ها استفاده شد و نمونه‌ها برای دستگاه PCR یا ترموسایکلر آماده شد. مراحل PCR طبق برنامه (جدول ۲) انجام شد.

جدول۲. برنامه دستگاه PCR استفاده شده در تحقیق

تعداد سیکل	زمان (دقیقه)	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	مراحل	بخش
	۱۰	۹۴	دناتوراسیون اولیه	قدم اول
۴۰ سیکل	۱	۹۴	دناتوراسیون ثانویه	قدم دوم
	۱	۵۶	انلینگ	
	۱	۷۲	اکستنشن	

در مرحله الکتروفورز محصولات PCR ژل آگارز ۱/۵ درصدی آماده شد و ۷ میکرولیتر از محصولات PCR شده، داخل چاهک‌ها به‌صورت جداگانه به‌ترتیب وارد شدند و هم‌چنین کنترل منفی و DNA ladder نیز در چاهک‌های جداگانه اضافه شدند و الکتروفورز انجام شد. سپس پس از گذشت ۵۰ دقیقه، نتیجه کار زیر دستگاه ترانسلومیناتور مشاهده شد (شکل ۱).

ژنوتایپینگ به‌وسیله تکنیک RFLP

برای افتراق گونه‌های *بروسلا*، از آنزیم Pst1 که یک آنزیم محدودگر است، استفاده شد و طبق مراحل و پروتکلی که شرکت ترموفیشر ارائه کرده بود، برای تمام نمونه‌های مثبت PCR این مراحل انجام شد. ابتدا ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR داخل یک میکروتیوب ۰/۲ اضافه شد. سپس ۱۸ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد. در مرحله بعد ۲ میکرولیتر از، bufferO x ۱۰ (که داخل کیت وجود داشت) به آن اضافه شد و در نهایت، ۲ میکرولیتر از آنزیم Pst1 به آن اضافه شد. سپس به‌خوبی عمل Spin (تکان دادن) انجام شد و به‌مدت چهار ساعت میکروتیوب‌ها در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تا هضم به‌خوبی صورت پذیرد و ژل آگارز دو درصد ساخته شد، ژل داخل تانک الکتروفورز قرار داده شد و به‌ترتیب ۷ میکرولیتر از نمونه‌ها داخل چاهک‌های موجود وارد شدند. پس از گذشت یک ساعت، نتیجه بر زیر دستگاه ترانسلومیناتور مشاهده شد (شکل ۲).

جایگاه برش آنزیم Pst1 : CTGCA*G است.

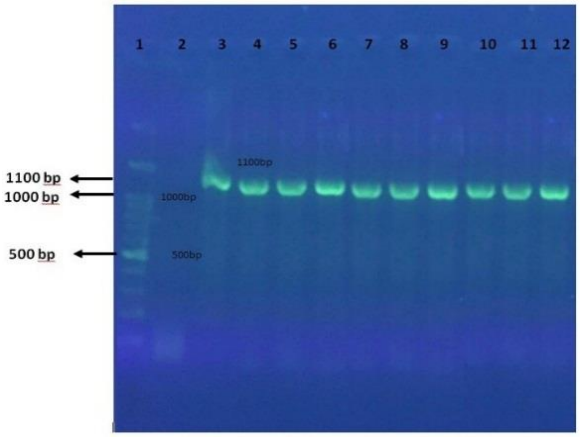
با توجه‌به نتایج به‌دست آمده از اثر آنزیم محدودگر Pst1 تفاوت باندها در گونه‌های مختلف، آرایش متفاوتی نشان داد و امکان جداسازی گونه‌ها فراهم گردید.

یافته‌ها

نتایج نمونه گیری

از ۴۵۳ نمونه خون بیماران مشکوک به بروسلوز که از اوایل مهر ماه ۱۳۹۶ تا اوایل مهر ماه ۱۳۹۹ به آزمایشگاه‌های مختلف تهران (مسعود، میلاد، دانشگاه ایران، بقیه الله) مراجعه کرده بودند، پس از انجام روش مولکولی PCR، ۱۰ نمونه از آن‌ها، مثبت شدند. سپس با انجام فرآیند RFLP، برای تشخیص گونه‌ها، به ۸ گونه *بروسلا ملی تنسیس* و ۲ گونه *بروسلا آبورتوس* دست یافتیم. هم‌چنین در نتیجه‌گیری کلی این تحقیق مشخص شد که گونه *ملی تنسیس* از فراوانی بیش‌تری نسبت‌به سایر گونه‌ها برخوردار است .

نتایج PCR



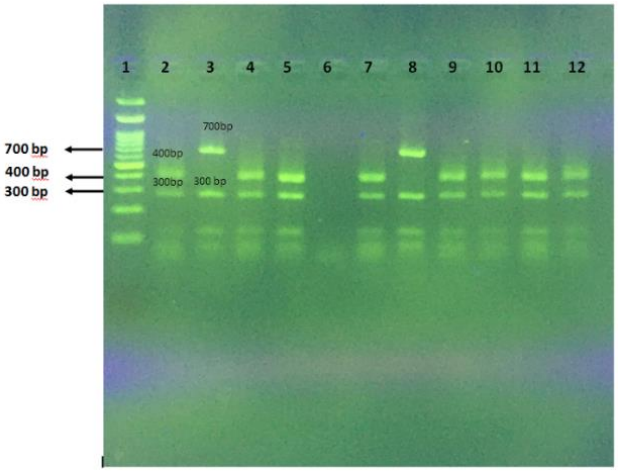
شکل ۱. مشاهده نتایج PCR زیر دستگاه ترانسلومیناتور

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.5.2]

چاهک شماره یک، مربوط به DNA ladder است. چاهک شماره دو، مربوط به کنترل منفی است، که باندی را مشاهده نمی‌کنیم و چاهک‌های شماره سه تا دوازده، که همه آن‌ها بر روی باند bp ۱۱۰۰، که اندازه طول قطعه ژن *omp2a* است، قرار گرفته‌اند، نشان‌دهنده ده نمونه مثبت بروسلوز، است.

نتایج RFLP



شکل ۲. مشاهده نتایج RFLP زیر دستگاه ترانسلومیناتور

چاهک اول مربوط به DNA ladder است. چاهک‌های شماره دو، چهار، پنج، هفت، نه، ده، یازده و دوازده که همگی تحت اثر آنزیم محدودگر Pst1 قرار گرفتند، با داشتن باند با اندازه‌های bp ۳۰۰ و bp ۴۰۰، مربوط به گونه *بروسلا ملی تنسیس* و چاهک‌های شماره سه و هشت هم که تحت اثر آنزیم محدودگر Pst1 قرار گرفتند، نیز با داشتن باند با اندازه‌های bp۳۰۰و bp۷۰۰مربوط به گونه *بروسلا آبورتوس* است. چاهک شماره ۶، نیز همان کنترل منفی است. که باندی مشاهده نمی‌شود.

بحث

بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز است و جزء بیماری‌های خطرناک با high risk 3 است و در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران، از نظر بهداشتی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت است. بروسلوز در صورت مصرف لبنیات و فرآورده‌های گوشتی آلوده به انسان انتقال می‌یابد و ممکن است عوارض و علائم بیماری شدیدی در بین بیماران ایجاد کند. از این رو حذف دام‌های آلوده، پیشگیری، تشخیص سریع و درمان این بیماری اهمیت دارد. که می‌توان با استفاده از روش‌های مولکولی از جمله روش PCR-RFLP در مدت زمان کمی به گونه‌ها و بیوتایپ‌های مختلف در بین انسان‌ها و دام‌ها پی برد و نسبت‌به درمان مناسب و ساخت واکسن برای هر گونه اقدام کرد. (۲۰، ۱۸،۱۹)

در مطالعه Etemadi و همکاران در سال ۲۰۲۰، به مقایسه بین روش‌های مولکولی و روش‌های سرولوژی برای تشخیص گونه‌های *بروسلا* پرداخته شد. در این مطالعه میزان دقت و حساسیت روش مولکولی را از روش سرولوژی بیش‌تر دانسته و به پیچیده بودن و زمان بر بودن و امکان خطا داشتن روش سرولوژی اشاره شده است. در حالی‌که میزان دقت و حساسیت روش PCR RFLP را بیش از ۹۰ درصد عنوان کرده و به‌ویژگی‌های این روش از جمله تشخیص سریع و حتی شناسایی زیر گونه‌های باکتری *بروسلا* و میزان اپیدمی آن‌ها پرداخته است. هم‌چنین در این مطالعه میزان مبتلا شدن به تب مالت در مردان و کسانی که در پرورش دام‌ها سر و کار دارند نسبت‌به سایر افراد بیش‌تر است و در مقایسه با مطالعه ما نیز ، که از روش PCR RFLP استفاده کردیم، روشی بسیار راحت و قابل دسترس و قابل تشخیص سریع با درصد خطا کم انجام شد. هم‌چنین می‌توان نتیجه گرفت که تب مالت یک بیماری شغلی نیز است و درصد ابتلای کسانی که در کشتارگاه‌ها و پرورش حیوانات دامی هستند، نسبت‌به سایرین بیش‌تر است (۲۱).

در مطالعه Bahmani و همکاران در سال ۲۰۱۹، که به بررسی گونه‌های *بروسلا* در ایران با روش‌های مولکولی از جمله PCR RFLP با استفاده از ژن *omp2* و آنزیم محدود کننده Pst1 پرداختند به این نتیجه رسیدند که روش‌های مولکولی دقت و حساسیت بسیار بالایی نسبت‌به سایر روش‌ها در تشخیص گونه‌های *بروسلا* دارد و از نتایج دیگر این تحقیق فراوانی قابل توجه گونه *بروسلا ملی تنسیس* بود. این مطالعه شباهت‌هایی با نتایج بررسی و مطالعه ما را در بر داشت. ما نیز در نتایج تحقیق خود به این نتیجه رسیدیم که روش مولکولی PCR RFLP در تعیین گونه‌های *بروسلا* از راحتی و دقت و حساسیت بالایی برخوردار است. هم‌چنین در تحقیق آن‌ها به فراوانی گونه *ملی تنسیس* نیز اشاره شده است که در بررسی و مطالعه ما نیز به همین صورت است که گونه *ملی تنسیس* هم‌چنان از فراوانی بیش‌تری نسبت‌به سایر گونه‌ها برخوردار است. (۲۲)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.5.2]

در مطالعه Amoupour و همکاران در سال ۲۰۱۸، به بررسی گونه‌های *بروسلا* در حیوانات و انسان‌ها مبتلا به بروسلوز، با روش‌های مولکولی پرداختند. در این مطالعه مقایسه‌ای بین روش‌های مولکولی انجام شد که روش PCR RFLP علاوه‌بر سریع بودن و راحت بودن در تشخیص، با استفاده از ژن *omp* و آنزیم‌های محدودگر می‌توان به‌راحتی به زیر گونه‌ها و بیوتیپ‌های یک گونه دست پیدا کرد. ما نیز در مطالعه خود از روش PCR RFLP در تحقیق خود استفاده کردیم و با ژن *omp* و آنزیم محدودگر در زمان کمی به تشخیص گونه‌های *بروسلا* دست پیدا کردیم (۲۳).

هم‌چنین در سال ۲۰۱۷ ، در مطالعه Daugaliyeva و همکارانش به بررسی گونه‌های *بروسلا* در بیماران مبتلا به تب مالت با روش مولکولی MLVA پرداختند که به ۶۴ گونه *آبورتوس* و ۳۷ گونه *ملی تنسیس* دست یافتند که در مقایسه با تحقیق ما، ابتدا این‌که روش MLVA مقدار پیچیده‌تر و زمان‌بر است. ولی روش PCR RFLP بسیار راحت و با در دسترس بودن یک آنزیم محدود کننده و کم هزینه-تر به سادگی و در کم‌ترین زمان می‌توان گونه‌های *بروسلا* را تشخیص داد. هم‌چنین در مقایسه مطالعه و بررسی‌های ما، نکته مهم در اپیدمی بیماری تب مالت، جغرافیا است. ما به ۸ نمونه گونه *ملی تنسیس* و ۲ نمونه گونه *آبورتوس* دست یافتیم و در مطالعه‌هایی که در گذشته در ایران و سایر کشورهای خاورمیانه شد نشان از فراوانی بیش‌تر گونه *ملی تنسیس* نسبت‌به گونه‌های دیگر می‌دهد. این در حالی است که در قاره اروپا گونه *آبورتوس* در سال-های گذشته فراوانی بیش‌تری نسبت‌به گونه *ملی تنسیس* پیدا کرده است (۲۴).

در مطالعه Zhi-Guo Liu و همکارانش، در سال ۲۰۱۷، در مناطقی از کشور چین و کشور مغولستان، ۱۱۶ نمونه انسانی از بیماران مبتلا به بروسلوز جدا کردند و با روش مولکولی MLVA، به جداسازی گونه‌های باکتری *بروسلا* پرداختند. در این تحقیق آن‌ها به ۹۴ مورد از گونه *ملی تنسیس* بیوتیپ ۳ و ۲۲ مورد از گونه *ملی تنسیس* بیوتیپ یک، دست یافتند و نتیجه گرفتند که با توجه‌به تماس مردم با گوسفندان و بزهای غیر واکسینه شده، گونه غالب در آن منطقه گونه *ملی تنسیس* با بیوتیپ۳، است. پس می‌توان نتیجه گرفت که جغرافیا علاوه‌بر تأثیر بر پراکندگی فراوانی گونه‌های مختلف در هر نقطه از دنیا بر پراکندگی میزان فراوانی زیرگونه‌ها و بیوتیپ‌های آن‌ها نیز مؤثر و متفاوت است. که در مقایسه با تحقیق ما نیز که از روش مولکولی PCR RFLP استفاده کردیم گونه *بروسلا ملی تنسیس* فراوانی بیش‌تری نسبت‌به سایر گونه‌ها داشت (۲۵).

در مطالعه Ferreira و همکارانش در سال ۲۰۱۲، که در شرق اروپا و در کشور پرتغال انجام شد به تشخیص گونه-های *بروسلا* در بیماران مبتلا به بروسلوز پرداختند و با روش مولکولی MLVA به ۱۵۷ گونه *آبورتوس* و ۱۲۶ گونه *ملی تنسیس* دست یافتند. در مقایسه با تحقیق ما از لحاظ گونه‌ها بسیار متفاوت است، زیرا در شرق اروپا فراوانی گونه *بروسلا آبورتوس* بیش‌تر بوده اما در تحقیق ما و مطالعه‌های گذشته در کشور ما و منطقه خاورمیانه نشان از فراوانی گونه *بروسلا ملی تنسیس* می‌دهد (۲۶).

در مطالعه‌ای که Klic. S و همکاران در سال ۲۰۱۱ در کشور ترکیه برای تشخیص گونه‌های *بروسلا* با روش مولکولی انجام دادند، به ۱۶۲ مورد از گونه *ملی تنسیس* دست پیدا کردند. که در مقایسه با تحقیق ما و تحقیقات گذشته‌ای که در کشور ایران صورت گرفته، گونه *ملی تنسیس* نه تنها در ایران بلکه در خاورمیانه نیز از فراوانی بالایی برخوردار است. اما تفاوتی که دارند در بیوتیپ‌های آن‌ها است. در تحقیق‌هایی که در ترکیه صورت گرفت ۱۶۲ مورد به گونه *ملی تنسیس* با بیوتیپ ۳ تعلق داشت. این در حالی‌ست که در ایران طبق مطالعه‌های گذشته گونه *ملی تنسیس* ولی با بیوتیپ یک شیوع بالایی دارد و در مطالعه ما نیز که از مجموع نمونه‌های مشکوک به بروسلوز ۱۰ مورد مثبت شد، ۸ گونه از آن‌ها به گونه *ملی تنسیس* تعلق داشت. که می‌توان نتیجه گرفت که در کشورهای همسایه هم گونه *بروسلا ملی تنسیس* فراوانی بیش‌تری نسبت‌به سایر گونه‌های *بروسلا* دارد (۲۷).

نتیجه‌گیری

با توجه‌به تحقیقی انجام شده در این مقاله و یافته‌های آن، نتایج به این صورت است که هم‌چنان، بیماری تب مالت در کشور در برخی از نقاط کشور از شیوع قابل توجهی برخوردار است و طبق مطالعه‌های گذشته نیز هم‌چنان، گونه *بروسلا ملی تنسیس* شایع‌ترین گونه در بین بیماران است. در این تحقیق ما با روش بسیار ساده و هم‌چنین

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.5.2]

دقیق مولکولی و روش تایپینگ PCR RFLP از مجموع نمونه‌های مشکوک به بروسلوز به ده نمونه مثبت دست یافتیم که هشت نمونه از آن به گونه *ملی تنسیس* و دو نمونه به گونه *آبورتوس* تعلق گرفت که نشان دهنده وجود این بیماری و هم‌چنین گونه‌ها و بیوتیپ‌های مختلف آن است و با توجه‌به نتایج مطالعه‌های گذشته مانند مقالات Hashemi Far و همکاران و Bahmani و همکاران و غیره گونه *بروسلا ملی تنسیس* با بیوتیپ یک نسبت‌به سایر گونه‌ها فراوانی بیش‌تری در ایران داشته گرچه این گونه در مناطق مختلفی از جهان به مانند آسیا و خاورمیانه نیز از شیوع بالایی برخوردار است و این در حالی است که گونه دیگر یعنی *بروسلا آبورتوس* در بخشی از قاره اروپا در مطالعه‌هایی که انجام شده بود از شیوع قابل توجهی برخوردار بود. هم‌چنین در تحقیقاتی که در گذشته انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که جنسیت هم عامل دیگری است در افرادی که به این بیماری مبتلا می‌شوند و تعداد بیماران مرد نسبت‌به زن بیش‌تر است. بنابراین این بیماری را نیز می‌توان به یک بیماری شغلی نسبت داد. زیرا افرادی که در کشتارگاه‌ها و دامداران و چوپانان یا پرسنل آزمایشگاهی هستند از درصد بالایی برای مبتلا شدن برخوردارند. و روش‌های مولکولی با دقت و حساسیت بالای خود و میزان کم خطا و آلودگی کم در سریع‌ترین زمان ممکن نسبت‌به روش‌های سرولوژی و کشت، به‌راحتی به تشخیص گونه‌های *بروسلا* در بیماران می‌پردازد تا بتوان هرچه سریع‌تر این بیماری را کنترل و پیشگیری کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از آقای دکتر میرنژاد و آقای دکتر مسجدیان که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را داریم و هم‌چنین نویسندگان این تحقیق، مراتب تشکر صمیمانه خود را از بیمارستان‌های بقیه الله، میلاد، دانشگاه ایران، آزمایشگاه‌های مسعود و فام که برای انجام این تحقیق و تأمین نمونه تحقیق ما را یاری دادند، اعلام می‌کنند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.5.2]

منابع

1. Assadi M, Siyadatpanah A, Soufiani KB, Mobayyen H, Sadighbayan K,Asadi J, et al., Brucellosis in Iran: a literature review, J. Am. Sci.9. 2013. 203-208.

2. Mirnejad R, Mohammadi M, Majdi A, Taghizoghi N, Piranfar V, Molecular typing of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* from human blood samples using PCR-RFLP method, Jundishapur J. Microbiol.6. 2013. 1-5

3. M. Rahman, M. Faruk, M. Her, J. Kim, S. Kang, S. Jung, Prevalence of brucellosis in ruminants in Bangladesh, Vet. Med.56. 2011. 379-385

4. Rotz LD,. Khan AS,. Lillibridge SR,. Ostroff SM, and Hughes JM.. Public health assessment of potential biological terrorism agents. Emerg. Infect. 2002. Dis. 8: 225-230

5. Michael J. Corbel , Banai M,*Brucella*, Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. 2015 .doi 10.1002

6. Cutle, SJ., et al., Brucellosis new aspects of an old disease. J. Applied Microbiology, 2005. 98:1270-1281

7.Yagupsky P ,Jo Baron E, Laboratory Exposures to *Brucellae* and Implications for Bioterrorism,2005. Aug; 11(8): 1180–1185.

8. Dalrympl CH, et al., Brucellosis infection and undulant fever in man. Oxford university press,London, 1978.1-30.

9. Kaden R.; Ferrari S.; Jinnerot T. Lindberg M.; Wahab T.; Lavander M. "Infectious Diseases: *Brucella Abortus*",2018, *Diseases*. **18** (1): 259.

10. Christopher GW, Again MB, Cieslak TJ, Olson PE. "History of U. S. military contributions to the study of bacterial zoonoses." Military Medicine 170. 2005. 39-48

11. Bossi P, Tegnell A, Baka A, Van Loock F, Hendriks J,."Bichat guidelines for the clinical management of brucellosis and bioterrorism-relatedbrucellosis." Eurosurveillance 9 .2004. 1-5

12. Zowghi E, Ebadi A, Yarahmadi M. Isolation and identification of *Brucella* organisms in Iran. Iranian J of Clin Infect Dis 2008. 3 (4): 185-88.

13. Noah C. Hull , Brant A. Schumaker, Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine, 2018. 8:1, 1500846

14. Dala T , Soner Sk, Aytekin C, Cigdem Eb, Comparison of multiplex real-time polymerase chain reaction with serological tests and culture for diagnosing human brucellosis, Journal of Infection and Public Health, 2019, Pages 337-342

15. Queipo-Ortuño MI, D-Colmenero J, Bermudez P,Rapid differential diagnosis between extrapulmonary *tuberculosis* and focal complications of brucellosis using a multiplex real-time PCR assay, 2009. 4(2):e4526.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.5.2]

16. George F. Araj, Update on laboratory diagnosis of human brucellosis,

International Journal of Antimicrobial Agents, 2010, Pages S12-S17, doi10.1016.

17. Shirzadi M ,Zeynali M ,Rezaei F, Guide to the treatment and diagnosis of brucellosis, Shirzadi M ,Zeynali M ,Rezaei F,Tehran,Andishmand,2012 .Page 26-36

18. Cloeckaert, A, J. M Verger, M. Garyon, and O.Grépinet. Restriction site polymorphism ofthe genes encoding the major 25 and 36kDa outer-membrane proteins of *Brucella*.Microbiology. 1995. 141: 2111-2121.

19. Cloeckaert, A, Verger J M, Garyon M, and Vizcaíno N.. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. FEMS Microbiol. Lett1996. 145:1-8.

20. Cloeckaert, A,Grayon M, Grepinet O, and Boumedine KS. Classification of *Brucella* strains isolated fro identification tests. Microbes Infec. 2003. 5: 593-602.

21. Etemadi A , Moniri R, Saffari M, Akbari H, Alamian S, Behrozikhah AM, Epidemiological, molecular characterization and risk factors of human brucellosis in Iran, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2020 .13(4): 169-175

22. Bahmani N, Mirnejad R, Arabestani M R , Comparison of PCR-RFLP and PFGE specimens, Saudi Journal of Biological Sciences 26 .2019. 256–262

23. Amoupour M, Nezamzadeh F, Zahedi A, Sedighi M, Masjedian F, Differentiation of *Brucella abortus* and *B. melitensis* biovars using PCR- RFLP and REP PCR, j.nmni.2019.100589

24. Daugaliyeva A, Sultanov A,Usserbayev B, Baramova SH, Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains in Kazakhstan using MLVA-15, j.meegid.2017.12.022

25. Zhi-Guo Liu , D DongDi , M Wang, RH Liu , HY Zhao, MLVA Genotyping Characteristics of Human *Brucella melitensis* Isolated from Ulanqab of Inner Mongolia,China, fmicb.2017.00006

26. Ferreira AC, Chambel L, Tenreiro T, Cardoso R, Flor L, ´ cia Corre^a de Sa´,MLVA16 Typing of Portuguese Human and Animal *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* Isolates, 2012. /journal.pone.0042514

27. Klic S, Ivanov IN;etal. MLVA Genotyping of human *Brucella* isolates from turkey J. clin. Microbiol. 2011. 10: 1128-1149.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.5.2]