نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ٦، شماره ۲، پائیز و زمستان ۱٤۰۲، صفحات ۲۰- ۲۷



# شناسایی مولکولی باکتری *بروسلا* در نمونه‌های کلینیکی منطقه سیستان با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه

معصومه نورا [۱]، حسین کمال‌الدینی [۲*]، فاطمه حدادی [۲]، محسن نجیمی [۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۹ آذر ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۸ دی ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۰۲ بهمن ۱۴۰۱

10.22034/nfvm.2023.377326.1166 20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

## چکیده

بروسلوز یا تب مالت (تب مدیترانه‌ای) به‌واسطه رشد و تکثیر باکتری کوکوباسیل گرم منفی *بروسلا* در سلول‌های پستانداران رخ می‌دهد و این بیماری به‌عنوان یک بیماری مشترک بین انسان و دام حائز اهمیت می‌باشد. تست‌های سرولوژی متعددی جهت شناسایی این باکتری مورد بررسی قرار گرفته‌اند، با این‌حال این روش‌ها محدودیت‌هایی در شناسایی دقیق باکتری دارند. پژوهش حاضر، با هدف بررسی و شناسایی مولکولی باکتری *بروسلا* در نمونه‌های جمع‌آوری شده از گوسفندان آلوده در منطقه سیستان با استفاده از تکنیک PCR چندگانه انجام شد. در ابتدا نمونه‌های خون و شیر از گوسفندان جمع‌آوری گردید. تایید آلودگی به باکتری در ابتدا با استفاده از نمونه‌های خون و روش سرولوژی رزبنگال صورت گرفت. در ادامه DNA از شیرهای جمع‌آوری شده استخراج شد و بررسی مولکولی با استفاده از PCR چندگانه و تکثیر دو ژن *Omp31* و *BLS* به‌منظور تکثیر قطعات با سایزهای ۳۴۷ bp و ۲۵۶ bp انجام پذیرفت. از ۴۰ نمونه کلینیکی مورد مطالعه همگی تست رزبنگال مثبت را نشان دادند اما بررسی مولکولی با استفاده از PCR چندگانه ۵ نمونه مثبت کاذب تایید شده با تست رزبنگال را نشان داد. استفاده از روش‌های شناسایی مولکولی به جهت حساسیت و دقت بالاتر و صرف زمان کمتر می‌تواند به‌عنوان گزینه مناسب برای شناسایی پاتوژن‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرد.

***واژگان کلیدی:*** *باکتری بروسلا، تب مالت، ژن BLS ، ژن Omp31، PCR چندگانه*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: h.kamaladini@uoz.ac.ir

## مقدمه

*بروسلا*ها باکتری‌های گرم منفی و جز انگل‌های درون‌سلولی و عامل بیماری تب مالت یا بروسلوز می‌باشند. به‌طور معمول، بروسلوز در حیوانات اهلی به‌عنوان یک بیماری عفونی مزمن در نظر گرفته می‌شود که معمولاً تا پایان عمر حیوان ادامه می‌یابد. شیوع جهانی بروسلوز در طی سال‌های اخیر افزایش‌یافته که علت آن ناتوانی در ریشه‌کن کردن کامل آن در میان گوسفندان ذکر شده است (۱). بیماری بروسلوز در کشورهای خاورمیانه، مدیترانه و حاشیه خلیج فارس از جمله ایران به وفور یافت می‌شود و علت انتشار این بیماری در ایران زندگی روستایی و عشایری است. در این مناطق، بین محل زندگی خانواده‌ها و محل نگهداری گوسفندان فاصله چندانی وجود ندارد و نوازش نوزاد تازه به دنیا آمده دام توسط کودکان و مصرف محصولات لبنی و تازه تهیه‌شده دامی و همچنین ذبح غیر استاندارد دام‌ها از اهمیت بالایی در بیماری‌زایی برخوردار است (۲). تست‌های آزمایشگاهی متعددی برای شناسایی این باکتری به‌کار رفته که از آن جمله می‌توان به آنتی‌بادی اختصاصی ضد *بروسلا*، روش‌های تشخیصی مولکولی مانند PCR و جداسازی و کشت *بروسلای* گرفته‌شده از نمونه، اشاره نمود. به‌طور سنتی باکتری‌ها را می‌توان با روش‌های فنوتیپیک، شیمیایی و خصوصیات سرولوژیکی مانند مشاهده میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی گرم) و بررسی فنوتیپی خصوصیات باکتری روی محیط کشت شناسایی کرد، اما این روش‌ها از دقت و قدرت تشخیصی کافی برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها برخوردار نیستند و از طرفی برخی از این روش‌ها زمان‌بر می‌باشند. روش‌های تشخیصی مبتنی بر کشت نیازمند رشد باکتری در محیط کشت می‌باشد، اما از آن‌جائی که ممکن است بسیاری از باکتری‌ها در حین نمونه‌گیری و یا به دلیل مصرف آنتی‌بیوتیک از بین بروند، این روش‌های تشخیصی با محدودیت روبرو می‌باشند. کشت *بروسلا* با توجه به سخت رشد بودن باکتری همیشه موفقیت‌آمیز نمی‌باشد، لذا این موضوع می‌تواند دلیلی برای جایگزین شدن سایر روش‌ها برای تشخیص سریع در آزمایشگاه‌ها باشد.

پیشرفت‌های اخیر در ارائه روش‌های مولکولی برای شناسایی عوامل بیماری‌زا در موجودات زنده از جمله باکتری‌ها امکان شناسایی سریع و دقیق با استفاده از ژنوم موجودات را فراهم نموده است و حتی امکان تمایز بین گونه‌ها و سویه‌ها نیز فراهم گردیده است. با توجه به اینکه باکتری‌ها دارای توالی‌های منحصر به فرد و خاص در ژنوم خود هستند، واکنش زنجیره پلی‌مراز در تکثیر توالی خاصی از اسید نوکلئیک باکتری استفاده می‌شود. توالی‌های ژنی *Omp31* و *BLS*، اختصاصی باکتری *بروسلا* می‌باشند. *Omp31* یک پروتئین و آنتی‌ژن غشای خارجی اصلی ایمنی‌زا است (۳). این فرضیه وجود دارد که *Omp31*از *Bruella melitensis* با مهار آپوپتوز از طریق سیگنال‌دهی TNF-α به دنبال عفونت بروسلا، برای بقا و تکثیر در ماکروفاژها مفید است (۴). Lumazine Synthase (*BLS*) *بروسلا* یک پروتئین با خاصیت ایمنی‌زایی بسیار زیاد است که می‌تواند پروتئین‌های خارجی را در انتهای N-terminal خود بپذیرد. این پروتئین دارای ویژگی‌های آنتی‌ژنیک بوده و نقش مهمی در ایجاد بیماری بروسلوز دارد. *BLS* همچنین می‌تواند در زمان استفاده به‌صورت کانژوگه شده با آنتی‌ژن‌های دیگر دارای نقش ادجوآنتی یا کمک‌کننده باشد (۵).

روش‌های مولکولی ساده، نسبتاً کم‌هزینه و دارای حساسیت کافی بوده و برای تشخیص و شناسایی باکتری‌هایی که به سختی رشد می‌کنند یا غیر قابل کشت هستند، مناسب می‌باشند (۶). همچنین نیاز به حجم و مقادیر بسیار کم نمونه منجر به استفاده گسترده از روش‌های شناسایی مولکولی مانند PCR، PCR-RFLP، Multiplex PCRو Real-PCR برای تشخیص مستقیم باکتری‌ها گردیده است. با توجه به مشکلات روش‌های سرولوژیکی و نتایج مثبت و منفی کاذب احتمالی در استفاده از این تکنیک‌ها، در مطالعه حاضر از PCR چندگانه برای شناسایی باکتری *بروسلا* در نمونه‌های

کلینیکی منطقه سیستان به‌منظور ارائه یک تکنیک دقیق و سریع استفاده شد.

## مواد و روش‌ها

***تهیه نمونه‌های مورد مطالعه:*** برای انجام مطالعه ۴۰ نمونه خون و شیر جمع‌آوری شده از گوسفندان روستاهای شهرستان زابل توسط اداره دامپزشکی استفاده شد. بهینه‌سازی تکنیک PCR چندگانه با هدف شناسایی مولکولی نمونه‌های کلینیکی، با DNA باکتری *بروسلا* تهیه شده از آرشیو دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل صورت گرفت.

***تست رزبنگال:*** تست رزبنگال بر روی نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از گوسفندان مشکوک به بیماری تب مالت جهت تایید آلودگی به باکتری *بروسلا* انجام شد. در ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرم خون و ۵۰ میکرولیتر آنتی‌ژن رزبنگال به خوبی یکنواخت و بر روی پلیت ریخته شد و بعد از گذشت مدت زمان ۴ دقیقه از شروع آزمایش آگلوتیناسیون نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

***واکنش PCR چندگانه:*** استخراج DNA از ۴۰ نمونه شیر آلوده جمع‌آوری شده به روش جوشاندن انجام شد. ابتدا ۱/۵سی‌سی شیر در میکروتیوب‌های ۱/۵میکرولیتری ریخته و به مدت ۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (Eppendorf, Germany) با دور ۳۵۰۰rpm قرار گرفت و سپس مایع رویی دور ریخته شد. برای شستشوی رسوب باقیمانده، مقدار ۱ سی‌سی آب مقطر استریل اضافه و پس از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰rpm سانتریفوژ گردید. مرحله شستشو سه بار تکرار شد. در ادامه مایع رویی را خارج و به رسوب باقی‌مانده ۰/۱ سی‌سی آب مقطر افزوده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰-۹۸ درجه سلسیوس گذاشته شد. در نهایت میکروتیوب در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و مایع رویی که حاوی DNA می‌باشد به تیوب دیگر منتقل و در دمای فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری گردید. بررسی کمی و کیفی DNA ها با استفاده از الکتروفورز (Labnet, Taiwan) ژل آگارز ۱ درصد و نانودراپ (Nabi, South Korea) انجام شد.

واکنش PCR چندگانه با استفاده از دو ژن اختصاصی باکتری *بروسلا* *BLS* و *Omp31* انجام شد. توالی‌های ژن‌های *BLS* با شماره دسترسی KJ401344.1 و *Omp31* با شماره دسترسی GQ184729.1 از پایگاه داده NCBI برای طراحی پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید (جدول شماره ۱).

**جدول ۱- جدول اطلاعات مربوطه به پرایمرها**

| Gene Name | Sequence (5'-3') | Tm (°c) | GC% | Mer | PCR Product (bp) |
|---|---|---|---|---|---|
| *BLS* | F: CAAAGCTGTCCGAACAAGAC | 59.74 | 52.4 | 20 | 256 |
| | R: ATGACGATAGATGCCGCCG | 60.08 | 57.89 | 20 | |
| *Omp31* | F: TTGACACCTTCTCGTGGACC | 59.61 | 55 | 21 | 347 |
| | R: AACCATGAGGCGTTCGGTAG | 60.11 | 55 | 19 | |

برای انجام واکنش PCR چندگانه از مخلوط پرایمرهای فوروارد و ریورس ژن‌های *BLS* و *Omp31*، DNAباکتری *بروسلا* و مستر میکس (Amplicon, Denmark) استفاده شد. جهت تأیید و بهینه‌سازی دمای

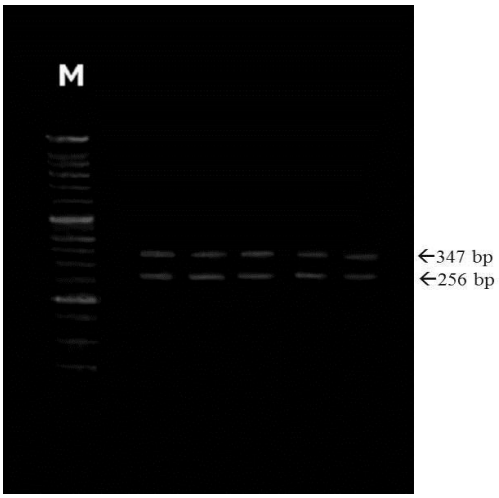
اتصال پرایمرها در واکنش PCR چندگانه، گرادیانت PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) طبق برنامه جدول ۲ انجام شد. پس از بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمرها با استفاده از DNA باکتری *بروسلا* تهیه شده از آرشیو دانشکده دامپزشکی، بررسی مولکولی ۴۰ نمونه کلینیکی مورد مطالعه با تکنیک PCR چندگانه انجام شد. محصولات PCR چندگانه بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و در بافر TBE 1X آنالیز و با استفاده از safe stain رنگ‌آمیزی و در دستگاه ژل داک (Cambridge, France) بررسی شدند.

**جدول ۲- برنامه Multiplex PCR**

| مرحله | دما (°c) | زمان | تکرار |
|---|---|---|---|
| Predenaturation | 94 | 5 دقیقه | 1 |
| Denaturation | 94 | 30 ثانیه | |
| Annealing | 56.4 – 62.3 | 45 ثانیه | 35 سیکل |
| Extension | 72 | 35 ثانیه | |
| Final extension | 72 | 5 دقیقه | 1 |

## نتایج

نتایج بررسی تست رزبنگال مثبت بودن ۴۰ نمونه خونی جمع‌آوری شده از گوسفندان برای آلودگی به باکتری *بروسلا* را تأیید نمود. وقوع آگلوتیناسیون ضعیف تا قوی به‌عنوان وجود آنتی‌بادی‌های اختصاصی و در نتیجه مثبت بودن تست رزبنگال و عدم وقوع آگلوتیناسیون برای منفی بودن تست رزبنگال در نظر گرفته شد. در ادامه هر ۴۰ نمونه برای تأیید آلودگی به باکتری با روش مولکولی بررسی شدند. با توجه به نتایج گرادیانت PCR دمای ۵۷/۵ درجه سانتی‌گراد با داشتن باند با کیفیت و وضوح بهتر به‌عنوان دمای بهینه PCR چندگانه تعیین گردید. نتایج PCR چندگانه نشان‌دهنده مثبت بودن ۳۵ نمونه مورد مطالعه بود. قطعات با سایزهای ۲۵۶ و ۳۴۷ باز برای دو ژن *BLS* و *Omp31* در تمام نمونه‌ها مشاهده شد (شکل ۱). با استفاده از PCR چندگانه در ۵ نمونه مورد مطالعه قطعات ژنی مورد نظر تکثیر نشدند و این نتیجه تأییدکننده وجود نتایج مثبت کاذب با استفاده از تست سرولوژی رزبنگال بود. دقت روش رزبنگال در شناسایی باکتری *بروسلا* ۸۷/۵ درصد و در روش PCR چندگانه ۱۰۰ درصد به دست آمد.




**شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR چندگانه در دمای ۵۷/۵ درجه سانتی‌گراد، در تمام نمونه‌ها قطعات ژنی *Omp31* و *BLS* تکثیر شده است. M- مارکر ژنی ۵۰ bp**

## بحث و نتیجه‌گیری

بروسلوز انسانی در بسیاری از کشورها ازجمله ایران به‌عنوان یک مشکل اساسی بهداشت جامعه مطرح می‌باشد (۷) و مهم‌ترین راه‌های انتقال باکتری *بروسلای* ایجادکننده این بیماری از طریق تماس با خون حیوان آلوده به *بروسلا* و نیز مصرف شیر خام آلوده و فرآورده‌های لبنی غیر پاستوریزه آن بوده و در مناطق روستایی که مصرف شیر تولید شده توسط خانوار صورت می‌گیرد بیشتر شایع می‌باشد. تشخیص بروسلوز در اغلب موارد به دلیل شباهت بالینی این بیماری با بسیاری از بیماری‌های عفونی و غیر عفونی و همچنین استفاده از روش‌های تشخیصی که در اغلب موارد موفق به جداسازی میکروارگانیسم نمی‌گردند دشوار می باشد (۸). به دلیل زمان تقسیم طولانی این باکتری، گونه‌های *بروسلا* معمولاً به آهستگی در محیط‌های کشت اولیه و کشت متوالی (Subculture) رشد می‌نمایند. مشکل اصلی در خصوص کشت *بروسلا* وقت‌گیر بودن آن می‌باشد که با استفاده از روش‌های مرسوم گاه تا بیش از ۳۰ روز زمان نیازدارد (۹). از تست‌های سرولوژیک مختلفی مثل رایت، کومبس رایت و الیزا می‌توان برای تشخیص بروسلوز استفاده کرد. حساسیت تست‌های سرولوژیک بین ۶۵ تا ۹۵ درصد متغیر می‌باشد اما حساسیت شناسایی این تست‌ها به ویژه در مناطق اندمیک، به دلیل شیوع بالای آنتی‌بادی در جمعیت سالم، کم می‌باشد (۱۰).

علاوه بر این، بیشتر تست‌های سرولوژیک دارای واکنش متقاطع با سایر باکتری‌ها می‌باشند. در طی دهه گذشته، پیشرفت‌های شگرفی در تمامی جنبه‌های تشخیص مولکولی بروسلوز انسانی صورت گرفته است. آزمایشات مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز سریع‌تر و بسیار حساس‌تر از روش‌های معمول شناسایی باکتری‌ها می‌باشند. علیرغم اهمیت روش‌های شناسایی مبتنی بر PCR، در حال حاضر استانداردی برای آماده‌سازی نمونه یا انتخاب ژن‌های هدف و یا روش‌های ردیابی محصولات PCRبرای باکتری *بروسلا* وجود ندارد. اعضای جنس *بروسلا* پاتوژن‌های داخل سلولی اختیاری هستند و به‌طور طبیعی مقدار باکتری که در بیماران یافت می‌شود، بسیار کم است (۱۱) و این موضوع بر اهمیت استفاده از تکنیک‌های مولکولی که قادر به شناسایی مقادیر جزیی از DNA می‌باشند می‌افزاید. در آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده از PCR به دلیل هزینه و گاهی اوقات در دسترس بودن حجم نمونه آزمایشی کافی محدود می‌شود. برای غلبه بر این کاستی‌ها و همچنین افزایش ظرفیت تشخیصی PCR، گونه‌ای به نامPCR چندگانه طراحی‌شده است. در PCR چندگانه بیش از یک توالی هدف را می‌توان با گنجاندن بیش از یک جفت پرایمر در واکنش تقویت کرد. این تکنیک دارای پتانسیل صرفه‌جویی قابل توجهی در زمان نسبت به PCR است. همچنین احتمال مشاهده نتایج کاذب در PCR چندگانه نسبت به PCR بسیار کمتر می‌باشد. از این‌رو در این پژوهش شناسایی باکتری *بروسلا* با روش PCR چندگانه در نمونه‌های کلینیکی منطقه سیستان انجام شد. برای انجام PCR، استخراج DNA از نمونه شیر آلوده برای بررسی باکتری مورد استفاده قرار گرفت. هر چند که استفاده از نمونه خون محیطی این مزیت را دارد که امکان دسترسی به حداکثر باکتری‌های موجود در جریان خون را فراهم می‌آورد، اما به دلیل حضور مهارکننده‌های بالقوه PCR در خون از قبیل هموگلوبین انجام PCR بر روی نمونه‌های خون از نظر تکنیکی تا حدودی دشوار می‌باشد (۱۲).

در مطالعه حاضر ژن‌های اختصاصی *Omp31* و *BLS* برای شناسایی مولکولی باکتری *بروسلا* مورد استفاده قرار گرفتند. ژن *BLS* هموژوی بالایی در گونه‌های مختلف *بروسلا* دارد و *Omp31* در همه گونه‌های بروسلا، به استثنای *Brucella abortus* وجود دارد. مطالعه و بررسی ۴۰ نمونه کلینیکی تأیید شده با تست رزبنگال با استفاده از تکنیک PCR چندگانه مثبت بودن ۳۵ نمونه را تأیید نمود، بنابراین استفاده از این دو توالی ژنی امکان شناسایی باکتری بروسلا با دقت ۱۰۰ درصد را با تکنیک PCR چندگانه در نمونه‌های کلینیکی فراهم نمود. همچنین

میزان دقت تکنیک سرولوژی رزبنگال ۸۷/۵ درصد به‌دست آمد که در مقایسه با روش PCR چندگانه امکان شناسایی بدون خطا را فراهم نمی‌آورد و مشاهده ۵ نتیجه مثبت کاذب با روش سرولوژیکی حاکی از حساسیت و دقت پایین این تست‌ها و اهمیت استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی باکتری‌ها می‌باشد. مطالعات متعددی برای شناسایی باکتری *بروسلا* در نمونه‌های مختلف انجام شده اما تا کنون مطالعه‌ای برای شناسایی با ژن‌های *Omp31* و *BLS* صورت نگرفته است. Satei و همکاران در سال ۲۰۲۰ به بررسی مولکولی گونه‌های باکتری بروسلا در شیر خام جمع‌آوری شده از مراکز خرید در شهر زنجان را با استفاده از ژن‌های *BCSP31* و *IS711* و روش PCR انجام دادند و نتایج نشان داد که از ۷۳ نمونه شیر خام جمع‌آوری‌شده، ۳۸ مورد (۵۲ درصد) از نظر جنس *بروسلا* مثبت، ۳ مورد (۷/۸ درصد) متعلق به *Bruella abortus* و ۲ مورد (۵/۲ درصد) متعلق به *Brucella melitensis* بودند. هیچ مورد مثبتی برای *بروسلا اویس* و *بروسلا سوئیس* وجود نداشت. نتایج مطالعه‌ی آنها نشان داد که شیوع *بروسلا* در شیر خام همچنان تهدیدی برای سلامت عمومی است که باید نگاه عمیق‌تری به راهکارها و روش‌های کنترلی پیشگیری از تب مالت در دام داشت (۱۳).

Tantillo و همکاران به بررسی و شناسایی باکتری بروسلا در شیر و پنیر با روش PCR و ژن‌های *BCSP31* و *Omp25* پرداختند. نتایج نشان داد که این روش مولکولی می‌تواند به‌عنوان یک تکنیک سریع و قابل اعتماد برای شناسایی باکتری بروسلا مورد استفاده قرار گیرد (۱۴). در مطالعه دیگری بررسی سرولوژیکی و مولکولی بروسلوز شتر در نجف‌آباد صورت گرفت. در این مطالعه، ۱۵۰ نمونه خون شتر از کشتارگاه نجف‌آباد جمع‌آوری شد. نمونه‌ها ابتدا با روش‌های سرولوژیکی تست رزبنگال پلات، تست آگلوتیناسیون لوله و تست ۲ مرکاپتواتانول آزمایش شدند. اسید نوکلئیک نمونه‌ها استخراج و PCR با توالی ژن *pb26* که در اکثر گونه‌های *بروسلا* شایع است مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که آزمایش‌های سرولوژیکی دارای آلودگی مزمن حیوانات بودند (۱۵).

در مطالعات شناسایی باکتری‌های بیماری‌زا استفاده از نمونه شیر خام جمع‌آوری شده از دام نسبت به خون کم خطرتر می‌باشد. از آنجایی که شیر از غدد اپی‌تلیال ترشح می‌شود بنابراین باکتری‌های آلوده کننده ابتدا بایستی در این سلول‌ها وارد شوند و در ادامه در شیر ترشح شوند و همین موضوع می‌تواند منجر به کاهش تعداد باکتری در شیر باشد. از طرف دیگر شیر واجد باکتری‌های مفیدی مانند *لاکتوکوکوس* بوده که با باکتری‌های بیماری‌زا مقابله می‌کنند و منجر به کاهش آلودگی تا ۱۰۰ برابر می‌شوند و از این‌رو میزان خطرات تهدیدکننده نمونه شیر نسبت به خون برای کاربر بسیار کمتر می‌باشد. تکنیک PCR قادر به شناسایی نمونه حتی با تعداد بسیار کم می‌باشد و از این‌رو استفاده از این روش حساس می‌تواند به عدم نیاز به استفاده از خون دام منجر گردد.

ضرورت استفاده از روش‌های مولکولی به‌عنوان یک روش تأییدی جهت تشخیص *بروسلا* در کنار روش‌های متداول غربالگری امری ضروری می‌باشد. تکنیک PCR چندگانه با داشتن مزایایی از جمله دقت بالا، کاهش مصرف مواد آزمایشگاهی، صرفه‌جویی در وقت و هزینه‌ها و نتایج قابل اعتماد به‌طور گسترده برای شناسایی مولکولی مورد استفاده قرار گرفته است. در مطالعه کنونی دو ژن *Omp31* و *BLS* جهت شناسایی و تشخیص باکتری *بروسلا* با به‌کارگیری روش PCR چندگانه استفاده شد و نتایج نشان داد که این روش جهت شناسایی باکتری *بروسلا* دقت و کارایی بالایی دارد.

## References


**1- Maleknejad P, Peeri-DoGaheh H, Amir-Zargar A, Jafari S, Fatollahzadeh B.** Diagnosis of brucellosis by use of BACTEC blood culture and confirmation by PCR. *J Vet Res.* 2007; 62(4): 83-6. [In Persian]

**2- Adams L.G.** The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Veterinary microbiology*. 2002; 90(1-4): 553-561.

**3- Ghasemi A, *et al.*** Immune reactivity of *Brucella* melitensis-vaccinated rabbit serum with recombinant *Omp31* and DnaK proteins. *Iranian Journal of Microbiology*. 2013; 5: 19–23. [In Persian]

**4- Zhang K, Wang H, Guo F, Yuan L, Zhang W, Wang Y, *et al.*** *OMP31* of Brucella melitensis 16M impairs the apoptosis of macrophages triggered by TNF-α. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016; 12(4): 2783-2789.

**5- Sha T, Li Z, Zhang C, Zhao X, Chen Z, Zhang F, *et al.*** Bioinformatics analysis of candidate proteins *Omp2b*, *P39* and *BLS* for Brucella multivalent epitope vaccines. *Microbial Pathogenesis*. 2020; 147: 104318.

**6- Talebzadeh S, Zaker Bostanabad S, Nazari R.** Study and Comparison of Diagnostic Methods (Culture–Molecular) for *Brucella* in the Samples Isolated from Patients Suspected to Brucellosis in Different Regions of Tehran. *NCMBJ*. 2016; 6 (23): 105-110. [In Persian]

**7- Zhang H, Fan Q, *et al.*** *CD14* gene silencing alters the microRNA expression profile of RAW264.7 cells stimulated by *Brucella* melitensis infection. *Innate Immun*. 2017; 23(5): 424–431.

**8- Refai M.** Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Veterinary microbiology*. 2002; 90(1-4): 81-110.

**9- Yagupsky P.** Detection of *Brucellae* in blood cultures. *Journal of clinical microbiology*. 1999; 37(11): 3437-42.

**10- Elfaki M.G, Uz-Zaman, T, Al-Hokail, A.A, Nakeeb, S.M.** Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2005; 53(1): 1-7

**11- Gamazo C, Vitas A, Lopez-Goni I, Diaz R, Moriyon I.** Factors affecting detection of *Brucella* melitensis by BACTEC NR730, a nonradiometric system for hemocultures. *Journal of clinical microbiology*. 1993; 31(12): 3200-3.

**12- Queipo-Ortuno M, Garcia-Ordonez M, Colmenero J, Morata P.** Hydrogen peroxide improves the efficiency of a peripheral blood PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *Biotechniques*. 1999; 2 7(2): 248-52.

**13- Satei E, Mirshahabi H, Zeighami H, Gholoobi A, Sadeghi H.** Molecular survey of *BCSP31* and *IS711* using PCR assays in detection of *Brucella* spp. in raw milk. *Meta Gene*. 2020; 24: 1006-1018. [In Persian]

**14- Tantillo G, Di Pinto A, Vergara A, Buonavoglia C.** Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. *Journal of food protection*. 2001; 64(2): 164-167.

**15- Mahzounieh M, Salimi M.** "Short article" Serological and molecular survey on camel brucellosis in Najaf Abad. *Biological Journal of Microorganism*. 2015; 4(14): 167-174. [In Persian]

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 6, Issue 2, Autumn & Winter 2023, pages: 20-27

# Molecular identification of *Brucella* bacteria in clinical samples of Sistan region by multiplex polymerase chain reaction

**Masoumeh Noura[1], Hossein Kamaladdini [*2], Fatemeh Haddadi[2], Mohsen Najimi[3]**

1- MS.c graduate of genetic, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Associated professor, Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: December 20, 2022; Revise: January 18, 2023; Accept: January 22, 2023

10.22034/nfvm.2023.377326.1166 20.1001.1.26454491.1402.6.2.3.1

Summary

Brucellosis or malt fever (Mediterranean fever) occurs due to the growth and multiplication of the gram-negative coccobacillus *Brucella* in mammalian cells, and this disease is important as a common disease between humans and animals. Several serological tests have been investigated to identify this bacterium, however, these methods have limitations in the accurate identification of the bacterium. The present study was conducted with the aim of investigating and molecular identification of *Brucella* bacteria in samples collected from infected sheep in Sistan region using multiplex PCR technique. At first, blood and milk samples were collected from infected sheep. Confirmation of bacterial infection was initially done using blood samples and Rose Bengal serology method. Next, DNA was extracted from the collected milk and molecular analysis was performed using multiplex PCR and amplification of *Omp31* and *BLS* genes, in order to amplify fragments with sizes of 347 bp and 256 bp respectively. Out of the 40 clinical samples, all of them showed a positive Rose Bengal test, but molecular analysis using multiplex PCR showed 5 false positive samples confirmed with the Rose Bengal test. Due to the higher sensitivity and accuracy and short time of identification the molecular methods can be used as a suitable option for identifying pathogens.

***Keywords:*** *Brucella, Malta fever, BLS and Omp31 genes, multiplex PCR*