Review Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 2 (05-2015)

Journal homepage: www.ijmm.ir

# Historical Process of Taxonomy of Genus *Brucella*: A Review

Esmaeil Zowghi[1], Ramin Bagheri Nejad[1]

1. Brucellosis Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Hesarak. Karaj, Iran

***Article Information***

**Article history:**
Received:2014/04/17
Accepted:2014/06/10
Available online:2015/05/20

**Article Subject:**
Medical Bacteriology

**IJMM 1394; 9(2): P 1-19**

**Corresponding author at:**

**Dr. Esmaeil Zowghi**

**Emeritus Research Professor, Brucellosis Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Hesarak, Karaj, Iran**

**Email:**
**esmailzowghi@yahoo.com**

***Abstract***

The title of brucellosis was named after isolation of the bacterium, that caused Malta fever, from four fatal cases amongst the British soldiers on the Malta Island by Dr. David Bruce. Subsequently, the genus *Brucella* was proposed after similar bacteria isolation from cattle and swine and the zoonotic connection was recognized. The close relations between the bacteria were known and then nomen species were designated on the basis of their specific preferential hosts, phage susceptibility and oxidative metabolism pattern of carbohydrate and amino-acid substrates. The diversity of host preference of *Brucella suis* and strains with low pathogenicity for human, such as *B. neotomae* and *B. ovis*, has caused a challenge for the taxonomy of Brucellae. On the one hand, the DNA homologies were striking, so a single species with sub-species was proposed. On the other hand, whole genome analyses with MLVA, MLSA, microarray and SNP studies have confirmed subtle differences between the species. As a result, recently, a return to a multi-nomen species taxonomy has been confirmed and accepted by th sub-committee on *Brucella* taxonomy. Phylogenetic studies have shown 4 clades that have possibly evolved from a *Brucella-Ochrobacterium* soil ancestor. These clades are: 1) *B. melitensis-B. abortus*, 2) *B. suis-B. canis*, 3) *B. neotomae*, and 4) *B. ceti-B. pinipedialis*. The situation of *B. microti* is not yet established. *B. ovis* stands as a basal lineage of the tree. *B. inopinata* is a recently identified isolate which is slightly different from others in relation to the 16S-rRNA and other molecular studies. This review makes on the taxonomy of the genus *Brucella* according to its first description up to now.

**Key Words:** Brucella, *Genus, Species, Taxonomy, Typing*

Copyright © 2015 Iranian journal of medical microbiology. All rights reserved.

**How to cite this article**:

Zowghi E, Bagheri Nejad R. Historical Process of Taxonomy of Genus Brucella: A Review. Iran J Med Microbiol. 2015; 1394 (2) :1-19

مقاله مروری

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۹ – شماره ۲ – تابستان ۱۳۹۴

Journal homepage: www.ijmm.ir

# سیر تاریخی طبقه‌بندی جنس بروسلا

اسماعیل ذوقی[۱]، رامین باقری نژاد[۱]

۱. بخش بروسلوزیس، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک، کرج، ایران

***اطلاعات مقاله***

**تاریخچه مقاله**

**دریافت:۱۳۹۳/۰۲/۲۰**

**پذیرش:۱۳۹۳/۰۴/۱۵**

**انتشار آنلاین:۱۳۹۴/۰۳/۲۰**

**موضوع:**

باکتری شناسی پزشکی

**IJMM 1394; 9(2): P 1-19**

**نویسنده مسئول:**

**دکتر اسماعیل ذوقی**

**استاد پژوهش، بخش بروسلوزیس، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک، کرج، ایران**

تلفن: ۳۳۵۲۵۷۷۸ ۲۶ ۹۸+

**پست الکترونیک:**

esmailzowghi@yahoo.com

## چکیده

عنوان بروسلوزیس بعد از جداسازی باکتری عامل تب مالت از چهار مورد کشنده در بین سربازان بریتانیایی مقیم جزیره مالت به‌وسیله دکتر دیوید بروس، به بیماری اطلاق گردید. بعداً جنس بروسلا پس از جداسازی باکتری‌های مشابه از گاو و خوک پیشنهاد شد و رابطه زئونوتیک آنها تعیین گردید. شباهت های نزدیک بین این باکتری‌ها شناخته شد لیکن نام‌گذاری گونه‌ها بر اساس میزبان اختصاصی ترجیحی آنها، حساسیت به فاژ و الگوی متابولیسم اکسیداتیو با کربوهیدارت ها و اسیدآمینه ها بعداً مطرح گردید. تنوع میزبان ترجیحی سویه‌های *بروسلا سوئیس* و سویه‌هایی با بیماری زایی کم برای انسان، چون *بروسلا نئوتومه* و *بروسلا اوویس*، چالش هایی را برای طبقه‌بندی بروسلاها موجب گردید. از یک طرف، همانندی DNA تمامی اعضای جنس نقش برجسته ای داشته به طوری که پیشنهاد گونه واحد و زیر گونه‌ها را مطرح ساخته و از طرفی دیگر بررسی ژنوم کامل باکتری‌ها با روش‌هایی چون MLVA، MLSA، Microarray و SNP، اختلافات ظریف بین گونه‌ها را مورد تائید قرار داد. در نتیجه، اخیراً بازگشت به طبقه‌بندی با نام‌گذاری چند گونه‌ای قوت بیشتری گرفته و به‌وسیله زیر کمیته طبقه‌بندی بروسلاها مورد قبول واقع شد. بررسی های فیلوژنیک بر اشتقاق احتمالی چهار شاخه تکاملی از نیای خاکی *بروسلا- آکروباکتریوم* اشاره دارد. این دسته ها شامل: (۱) *بروسلا ملی تنسیس- بروسلا آبورتوس*. (۲) *بروسلا سوئیس- بروسلا کنیس*. (۳) *بروسلا نئوتومه*. (۴) *بروسلا ستی- بروسلا پینیپدیالیس*، می‌باشند. موقعیت *بروسلا میکروتی* هنوز تعیین نشده است. *بروسلا اوویس* در وضعیت پایه ای درخت اشتقاق قرار دارد. *بروسلا اینوپیناتا* به تازگی شناخته‌شده که در ارتباط با توالی ژن 16S-rRNA و دیگر بررسی های مولکولی از دیگر بروسلاهای طبقه‌بندی شده کمی متفاوت می باشد. در این مختصر مقاله، طبقه‌بندی جنس بروسلا بر اساس یافته های حاصل از زمان توصیف اولیه آن تاکنون مورد بررسی قرارگرفته است.

**کلمات کلیدی :** *بروسلا، جنس، گونه، طبقه‌بندی، تایپینگ*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

## تاریخچه

تاریخچه جنس *بروسلا* پس از تعیین تشابه عامل تب مالت گزارش‌شده به‌وسیله Bruce در ۱۸۸۷ تحت عنوان *میکروکوکوس ملی تنسیس* (۱) با *باکتریوم آبورتوس* عامل سقط جنین مسری گاو جداشده توسط Bang (۲،۳) در سال ۱۸۹۷ و باکتری شبه *آبورتوس* مسئول سقط جنین خوک توصیفی Traum در ۱۹۱۴ (۴،۵)، توسط Evans در سال ۱۹۱۸ شروع شد (۶). در سال ۱۹۲۰ Meyer و Shaw بر اساس بررسی‌های Evans، جنس بروسلا را با گونه‌های *بروسلا ملی تنسیس* و *بروسلا آبورتوس* تعریف کردند (۷). پس از آن باکتری‌های جداشده از خوک به‌عنوان گونه سوم *بروسلا سوئیس* متمایز گردیدند (۸). بعداً سویه‌های متعددی از بروسلاها شناسایی‌شده که با گونه‌های اصلی مطابقت نداشته و با انواع اسامی نیمه رسمی و محاوره‌ای چون: *ملی تنسیس* بریتانیایی، *آبورتوس* رودزیایی، *آبورتوس* حساس به رنگ، *بروسلا اینترمدیا*، *سوئیس* آمریکایی، *اینتر آلیا* (*Inter alia*) مطرح شدند. این وضعیت آشفته با به‌کارگیری آزمایش‌های لیزفاژ و متابولیسم اکسیداتیو برطرف شده که جایگزینی سویه‌های مختلف را در یکی از سه گونه اصلی و

منطبق با میزبان ترجیحی طبیعی امکان‌پذیر ساخت. هر گونه واریانت های مختلفی را شامل شده که به‌عنوان بیوتایپ ها یا بیووارها شناخته شدند.

کمیته بین‌المللی نام‌گذاری باکتریولوژیک (با نام بعدی کمیته بین‌المللی باکتریولوژی سیستماتیک) کمیته فرعی طبقه‌بندی جنس بروسلا را تشکیل داده که ساختار طبقه‌بندی جاری را توسعه بخشید (۹). باوجودی که جداسازی سویه‌هایی با عدم انطباق به گونه‌های کلاسیک ادامه داشته و گاهی به‌عنوان گونه جدید در نظر گرفته‌شده [به‌عنوان مثال، بروسلا رانژیفری تاپاراندی (*B. rangiferi taprandi*) از گوزن شمالی- Reindeer (۱۰)] با استفاده از این ساختار به‌عنوان گونه‌های موجود و گاهی بیووارهای جدید تعریف شدند. اولین گونه جدید *بروسلا اوویس* توصیفی در سال ۱۹۵۶(۱۱) و به دنبال آن *بروسلا نئوتومه* (۱۲) و *بروسلا کنیس* (۱۳) به جنس افزوده شدند. گونه‌های دیگری چون *بروسلا موریوم* (*B. murium*) از جوندگان نیز پیشنهاد شده (۱۴) اما به‌وسیله کمیته فرعی طبقه‌بندی جنس بروسلا مورد پذیرش قرار نگرفت.

بایستی خاطر نشان ساخت که معیار مورداستفاده برای طبقه‌بندی جنس براساس خصوصیات فنوتیپی همراه با میزبان طبیعی ترجیحی قرار داشته است. این معیار تنها امکان در فقدان روش‌های ژنوتایپینگ در آن زمان بوده است. شاید تعجب‌آور باشد که این سیستم در حد وسیعی با تجزیه مولکولی ژنتیکی انطباق داشته هرچند که تناقضاتی نیز مطرح بوده‌اند.

برطرف سازی تناقضات به تعریف تازه‌ای از جنس بروسلا و بیووارها با استانداردهای حداقل اختصاصی نیاز داشت. اولین کوشش‌ها از ۳۹ سال پیش با استفاده از اطلاعات موجود در آن زمان انجام پذیرفت (۱۵،۱۶). این اقدامات براساس ساختار پیشنهادی Stableforth و Jones در سال ۱۹۶۳ قرار داشته (۹) و با یافته‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی قابل‌دسترس تکمیل گردید. برخی یافته‌های جدید نیز در گزارش‌های بعدی کمیته فرعی طبقه‌بندی جنس بروسلا (۱۷-۲۴) و دیگر نشریات، ازجمله کتاب باکتریولوژی سیستماتیک برگی (۲۵،۲۶)، انعکاس یافتند.

ساختار طبقه‌بندی جاری جنس *بروسلا* را گونه‌های اصلی با افزایش گونه‌های اخیراً شناخته‌شده شامل گردیده که در جداول ۱ تا ۳ نشان داده‌شده است. هنوز خصوصیات فنوتیپی و میزبان طبیعی ترجیحی نقش غالب را داشته که بر این منوال و به‌عنوان مثال *بروسلا ملی تنسیس* عمدتاً با نشخوارکنندگان کوچک، *بروسلا آبورتوس* با گاو و دیگر انواع بوویده (گاوسانان) و *بروسلا سوئیس* با خوک مرتبط می‌باشند. باوجود این، آلودگی ناشی از گونه‌های به‌ویژه کلاسیک در میزبانان دیگر به کرات اتفاق می‌افتد (۲۷-۳۱). همچنین مفروض است که اعضای کلاسیک جنس نقش بالقوه زئونوتیک داشته هرچند که بیماری‌زایی آن‌ها برای انسان کاملاً متفاوت است.

از دیرباز اختصاصی بودن میزبان به‌عنوان معیاری نسبی شناخته‌شده و جنبه‌ای مطلق نداشته (۹) هرچند که اکنون وسعت امکان انتقال برخی گونه‌ها در خارج از میزبان ترجیحی معمول بهتر شناخته‌شده است. به‌عنوان‌مثال، انتقال متقاطع *بروسلا آبورتوس* به نشخوارکنندگان کوچک و *بروسلا ملی تنسیس* به گاو در چراگاه‌های مشترک به‌سادگی امکان‌پذیر خواهد بود. بی‌ثباتی میزبان ترجیحی به بهترین وجهی در مورد *بروسلا سوئیس* مشهود است. باوجودی که بیووارهای ۱، ۲ و ۳ *بروسلا سوئیس* خوک را آلوده کرده، بیووار ۲ خرگوش را نیز عفونی ساخته، بیووار ۴ آن به گوزن‌های آمریکای شمالی (Caribou و Reindeer) محدود بوده و ظاهراً بیووار ۵ *بروسلا سوئیس* به‌طور طبیعی فقط در جوندگان شناخته‌شده است. موقعیت بیووار اخیر بسیار موردبحث بوده و به نظر می‌رسد ناهمگون‌ترین بیووار در گروه *بروسلا سوئیس* می‌باشد.

Verger و همکاران در سال ۱۹۸۵ میلادی تقسیم‌بندی جنس به گونه‌ها را پس از بررسی‌های وسیع DNA *بروسلاها* و تعیین وابستگی بسیار بالا در بین آن‌ها مورد تردید قراردادند (۳۲). باوجوداین، شناسایی باکتری‌های شبه بروسلای سازگار با محیط و شرایط دریایی برای اولین بار موضوع طبقه‌بندی واقعی جنس را بار دیگر مطرح ساخت. سویه‌های جداشده بروسلا از لاشه خوک دریایی، دلفین، نهنگ (وال) و خوک وال ها (۳۳-۳۶) با سقط جنین و مننگوآنسفالیت در چندین پستاندار دریایی (۳۷) و همچنین آثار پاتولوژیک در دلفین‌های گورخری (*Stenella coeruleoalba*) یا دلفین‌های راه‌راه (۳۸) مرتبط بوده‌اند. به فاصله کوتاهی موارد انسانی عفونت ناشی ازاین‌گونه جدید نیز شناخته شد (۳۹-۴۱). همانند گونه‌های پیشین *بروسلا*، عفونت متقاطع میزبانان نیز موردتوجه قرار گرفت (۴۲).

به علت اطلاعات محدود، ابتدا برای تمامی سویه‌های دریایی به‌طور موقتی یک‌گونه جدید *بروسلا ماریس* (*B. maris*) پیشنهاد گردید. باوجوداین، بررسی‌های بعدی نشان داد که این سویه‌ها بر طبق همگنی 16S-rRNA به‌عنوان گروهی در جنس بروسلا تعلق داشته هرچند دارای شاخص IS711 متمایز بوده که آن‌ها را مجزا از سویه‌های کلاسیک زمینی گروه‌بندی می‌نماید (۳۳). در داخل گروه، سویه‌ها ازنظر نیاز به گاز $CO_2$ در جداسازی اولیه و فعالیت متابولیک مصرف گالاکتوز و هم‌چنین در اثر IS711 منطبق با سویه‌های غالب جداشده از به ترتیب خوک‌های دریایی (Seals) یا بالن‌ها (Cetaceans) متفاوت بوده‌اند. به‌طور مشابه، پلی مورفیسم *omp2* آن‌ها بر دو گونه متمایز با اسامی *بروسلا ستاسه* (*B. cetaceae*) و *بروسلا پینیپدیه* (*B. pinnipediae*)، بر اساس منشأ میزبانی خوک وال ها (Porpoises)، دلفین‌ها و مینک وال‌ها یا خوک‌های دریایی، اشاره داشت (۴۳،۳۶،۳۳). بعداً این اسامی به *بروسلا ستی* (*B. Ceti*) و *بروسلا پینیپدیالیس* (*B.pinnipedialis*) تغییر یافت. نتایج بررسی‌های MLVA بروسلاهای پستانداران دریایی را به‌عنوان گروه متمایز نشان داده اما تیپ‌های ترادفی (Sequence types-ST ) آن‌ها بر طبق منشأ میزبانی کاملاً متفاوت بوده و بر سه گونه به عوض دو گونه (شکل ۱) دلالت دارد (۴۵،۴۴). پس از آن باکتری جدیدی با نام *بروسلا میکروتی* (*B. microti*) از موش‌های صحرایی جنس *میکروتوس* (۴۶)، خاک (۴۷) و روباه‌های قرمز (۴۸) جدا گردید. باوجود این، *بروسلا میکروتی* هنوز با موارد آلودگی انسان ارتباط نداشته است.

سرانجام، اخیراً گونه متمایز *بروسلا اینوپیناتا* (*B. inopinata*) از پیوند پستان خانم ۷۱ ساله با علائم بالینی بروسلوزیس جدا گردید (۴۹). مورد دومی نیز از بیوپسی و ترشحات ریه بیمار ۵۲ ساله مبتلا به پنومونی و برونشیت مزمن جدا شد (۵۰). تاکنون همین دو مورد گزارش‌شده و میزبان حیوانی باکتری ناشناخته است. این‌گونه *omp2* متفاوت و ترادف 16S-rRNA منحصر به فردی در ۵ نوکلئوتید نسبت به 16S-rRNA سایر گونه‌های *بروسلا* نشان داده است. علاوه بر آن، در بررسی MLST این سویه در گروه مجزایی نسبت به دیگرگونه‌ها قرار دارد. باوجوداین، نزدیکی آن به دیگرگونه‌های بروسلا تا گونه‌های آکروباکتریوم (*Ochrabactrum* spp.) در ۸ ژن متمایز نشان داده‌شده و موقعیت آن را در جنس بروسلا تثبیت نموده است. ازاین‌رو، نام *بروسلا اینوپیناتا* در ارتباط با جداسازی غیرمنتظره آن به این باکتری جدید اطلاق شده است (۵۱).

با توجه به گستردگی جنس بروسلا، تجدیدنظر در استانداردهای حداقل موردنیاز خواهد بود.

## طبقه‌بندی گونه‌های بروسلا بر مبنای سویه‌های قبلی و جدید

در کتاب باکتریولوژی سیستماتیک برگی (۲۶) گونه‌های بروسلا بر اساس بررسی فیلوژنتیکی ترادف های 16S-rRNA در دسته I آلفا پروتئوباکتریا (Class I. Alphaproteobacteria class. nov.)، راسته VI ریزوبیال ها (Order VI Rhizobiales ord. nov.) قرارگرفته اند. ساختار طبقه‌بندی و مقررات در کتاب ذکرشده است (۲۶).

با توجه به قوانین و مقررات طبقه‌بندی چندگونه‌ای، Corbel و Banai (۲۰۰۵) براساس وابستگی گونه‌ای *بروسلا* به میزبانان طبیعی ترجیحی آن‌ها اقدام نموده‌اند (۲۶). این طبقه‌بندی رجعت به عقیده طبقه‌بندی جنس *بروسلا* قبل از سال ۱۹۸۶ و تصمیم بعدی کمیته فرعی طبقه‌بندی *بروسلاها* از نقطه نظر اهمیت ژئونوتیک مفهوم چند گونه‌ای و مخاطرات اپیدمیولوژیک مرتبط با گونه‌های مختلف بروسلا را منعکس ساخته، هرچند که کمیته فرعی هرگز مفهوم گونه‌ای برای کاربرد روزمره را نفی ننمود. براساس این تصمیم، شش گونه مورد اعتبار گونه‌های *بروسلا* (۵۲) در فهرست تصویب‌شده اسامی باکتریال ۱۹۸۰ (۲۴) به طور رسمی مجدداً مورد تائید قرار گرفت. این وضعیت جایگزینی گونه‌های جدید دریایی در جنس *بروسلا* (۴۳) را به دنبال تعیین سویه‌های رفرنس برای دو مرکز کلکسیون تسهیل نموده و معتبر شناخته شد (۵۵-۵۳). بعداً *بروسلا میکروتی* (۴۷) و *بروسلا اینوپیناتا* (۵۱) نیز مورد تائید قرار گرفتند. بر این اساس، نام‌گذاری و طبقه‌بندی جاری گونه‌های *بروسلا* در جداول ۳-۱ نشان داده‌شده است.

## دیدگاه‌های طبقه‌بندی جنس بروسلا

## خصوصیات میکروب‌شناسی

گونه‌های بروسلا عوامل سببی بروسلوزیس در حیوانات و انسان می‌باشند. این باکتری‌ها گرم منفی، به رنگ قرمز در

رنگ‌آمیزی اصلاح‌شده زیل- نیلسون (۵۶) و به شکل کوکوئید یا سلول‌های میله‌ای شکل کوتاه به‌اندازه مای ۱/۵-۰/۶×۰/۷-۰/۵ میکرون هستند.

گونه‌های بروسلا به‌صورت پاتوژن های غیر متحرک داخل سلولی اختیاری در سلول‌های رتیکولوآندوتلیال میزبانان پستاندار زمینی و دریایی زندگی می‌کنند. مکانیسم‌های زهرآگینی (حدت) *بروسلاها* و بقای آن‌ها در درون فاگوسیت های فعال تا حدی به‌صورت نامکشوف باقی‌مانده چون تولید فاکتورهای زهرآگینی چون سیتولیزین ها، کپسول‌ها، اگزوتوکسین ها، پروتئازهای ترشحی، پیلوس ها/ پیلی (pili) و یا فیمبریاها/ فیمبریه (Fimbriae) (ساختارهای مویی یا رشته‌ای ریز در بعضی از باکتری‌ها با خصوصیات آنتی‌ژنی سطح سلول ارتباط می‌یابند). تاژک‌ها (فلاژله)، توکسین های رمز دهنده یا کدکننده فاژ و پلاسمید های زهرآگینی در *بروسلاها* شناخته نشده است (۵۷-۵۸). باوجود این، *بروسلا* از ژن *VirB* محفوظ رمز دهنده/ کد کننده سیستم ترشحی تیپ IV برخوردار بوده که ممکن است در زهرآگینی (حدت) ذاتی آن‌ها دخالت داشته باشد. علاوه بر آن، *بروسلا* دارای سیستم ترشحی فلاژلی تیپ III بوده که براساس دسته‌ای از ۴۴ ژن توزیعی در سه لوکوس (جایگاه ویژه ژن بر روی کروموزوم) Chr II، *motB* و *flgJ* مستقر در نواحی مختلف Chr I در بین سه گونه کلاسیک قرارگرفته است. باوجود این، *بروسلاها* غیر متحرک با غیرفعال بودن برخی ژن‌های فلاژلی و فقدان سیستم‌های کموتاکتیک توصیف‌شده‌اند. علی‌رغم فقدان تحرک، حضور ژن‌های فلاژلی در کروموزوم‌ها باقابلیت اهمیت در دوام باکتری‌ها در مدل موش (اما نه در عفونت کشت سلول) نشان داده‌شده است (۵۹). ازاین‌رو، به نظر می‌رسد وجود اختلافات در تجلی بالقوه فلاژلوم ممکن است سازگاری *بروسلا* با میزبانان مختلف را توصیف نماید.

بررسی ساختار ژنومی سه گونه کلاسیک *بروسلا* اطلاعات مرتبط با عملکردهای تنفسی و متابولیکی آن‌ها را فراهم ساخته است. یافته‌های کروموزومی نشان داده که *بروسلاها* ممکن است با جایگزینی داخل سلولی از طریق انتخاب برای مکانیسم تنفسی با وابستگی بالا و از دست دادن هم زمان فعالیت سنتز نوکلئوتید، تبدیل و تغییر قند، سنتز پلی ساکارید و هم‌چنین سنتز بیوتین و کولین و ذخیره انرژی و کربن سازنده گلیکوژن و پلی هیدروکسی بوتیرات سازگاری یابند (۵۷،۶۳-۶۰).

فعالیت تنفسی *بروسلا* با استفاده از اکسیژن به‌عنوان پذیرنده (Acceptor) الکترون انتهایی با هیدروژنازها به‌عنوان دهندگان (Donors) انجام می‌پذیرد. سیتوکروم های b، c و o *بروسلا آبورتوس* با رشد لگاریتمی متوسط/بینابینی مرتبط بوده درحالی‌که سیتوکروم های $a^{+}$ $a_3$ به‌عنوان برگ خریدهای اضافی در خلال رشد لگاریتمی تأخیری شناخته‌شده اند. نقش احتمالی برای تنفس نیترات در تحت شرایط کاهش اکسیداسیون – احیا (ردوکس) پیشنهاد شده است. جالب‌توجه آن‌که عملکرد D– اریتریتول ۱–فسفات (واسطه گر یا/ میانجی اریتریتول) به‌عنوان دهنده الکترون به زنجیره تنفسی شناخته‌شده است (۶۴). با توجه به این‌که اریتریتول محصول اصلی تروفوبلاست ها برای پوشش جفت در مراحل آخر آبستنی بوده، جذب و گرایش *بروسلاها* به رحم آبستن و تکثیر در تروفوبلاست ها بر این اساس معقول در نظر گرفته می‌شود (۶۵). در سال ۱۹۹۱ Plommet (۶۶) محیط سنتتیک با فاکتورهای غذایی حداقل برای تایپینگ احتمالی سویه واکسن $S_2$ بروسلا سوئیس (۶۷) و انطباق آن با سویه وحشی رفرانس ۱۳۳۰ بایوار I بروسلا سوئیس در مقایسه با حداقل نیازهای غذایی رشد آن‌ها مورد استفاده قرار دارد. سولفات آمونیوم و تیوسولفات آمونیوم جهت تأمین نیتروژن (ازت) و سولفور و گلوکز برای تأمین کربن و تولید انرژی به کار گرفته شد. یافته مهم در این حقیقت نهفته بود که سویه‌های *بروسلا ملی تنسیس* قادر به استفاده از اسید گلوتامیک به‌عنوان تنها منبع ازت و نیازهای انرژی بوده مشروط بر این که به‌وسیله گاز $CO_2$ تحریک‌شده یا گلوکز برای انرژی اضافی مصرف نمایند. براساس این نتیجه، مؤلف مفروض دانست که $CO_2$ جهت فعال‌سازی جریان یافتن کربن برای سیکل‌تری کربوکسیلیک مورد نیاز می‌باشد. جالب توجه آن که یافته اخیر با مشاهداتی مبنی بر نیاز برخی سویه‌های بروسلا به ۵ تا ۱۰ درصد گاز $CO_2$ برای کشت اولیه مرتبط بوده درحالی‌که همین سویه‌ها در کشت‌های بعدی ممکن است مستقل از $CO_2$ باشند. باوجود این، هنوز روشن نیست آیا این تحول ناشی از تولید آنزیم یا انتخاب در زیر جمعیت‌های کشت‌ها می‌باشد.

جدول ۱: فهرست سویه‌های تیپ، بیووارها و سویه‌های رفرنس بروسلا *

| Species | Biovar[a] | Type/reference | Strain | ATCC[b] No. | NCTC[c] No. | BCCN[d] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *B. melitensis* | 1<br>2<br>3 | Type<br>Reference<br>Reference | 16M<br>63/9<br>Ether | 23456<br>23457<br>23458 | 10094<br>10508<br>10509 | |
| *B. abortus* | 1<br>2<br>3<br>4<br>5<br>6<br>9 | Type<br>Reference<br>Reference<br>Reference<br>Reference<br>Reference<br>Reference | 544<br>86/8/59<br>Tulya<br>292<br>B3196<br>870<br>C68 | 23448<br>23449<br>23450<br>23451<br>23452<br>23453<br>23455 | 10093<br>10501<br>10502<br>10503<br>10504<br>10505<br>10507 | |
| *B. suis* | 1<br>2<br>3<br>4<br>5 | Type<br>Reference<br>Reference<br>Reference<br>Reference | 1330<br>Thomsen<br>686<br>40<br>513 | 23444<br>23445<br>23446<br>23447<br>- | 10316<br>10510<br>10511<br>11364<br>- | |
| *B. neotomae* | | Type | 5k33 | 23459 | 10084 | |
| *B. ovis* | | Type | 63/290 | 25840 | 10512 | |
| *B. canis* | | Type | RM6/66 | 23365 | 10854 | |
| *B. ceti* | | Type | | | 12891T | 94-74$^T$ |
| *B. pinnipedialis* | | Type | | | 12890T | 94-73$^T$ |
| *B. microti* | | Type | CCM4915$^T$ | | | 07-01$^T$ |
| *B. inopinata* | | Type | BO1$^T$ | | | 09-01$^T$ |

*Banai و Corbel (۴۵).

[a] بیووارها بر طبق آگلوتیناسیون با آنتی سرم های مونواسپسفیسک A، M و R، نیاز به گاز $CO_2$ در جداسازی اولیه، تولید گاز $H_2S$ و اوره آز و رشد در حضور رنگ‌های فوشین و تیونین (که به ترتیب در جداول ۲ و ۳ نشان داده‌شده است) مشخص می‌شوند.

[b] ATCC کلکسیون کشت آمریکایی (American Type Culture Collection)

[c] NCTC کلکسیون ملی کشت بریتانیا (National Collection Type Cultures- Great Britain)

[d] BCCN کلکسیون کشت بروسلا، نوزیلی فرانسه (Brucella Culture Collection- Nouzilly)

[e] Foster و همکاران، ۲۰۰۷؛ Bricker و همکاران، ۲۰۰۰

[f] Scholz و همکاران، ۲۰۰۸ (۴۷)

[g] Scholz و همکاران، ۲۰۱۰ (۵۱) (این سویه به‌عنوان CPAM 6436$^T$ نیز پذیرفته‌شده است.) کلکسیون میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای حیوانی:
Collection of Animal Pathogenic Microorganisms. Veterinary Research Institute Hudcova 70,621 32 Brno, Czech Republic.

جدول ۲- خصوصیات افتراقی گونه‌های جنس بروسلا *

| Species | Colony Morphology[b] | Serum Requirement | Lysis by Phages[a] | | | | | Oxidase | Urease Activity | Preferred Host |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Tb | | Wb | Iz1 | R/C | | | |
| | | | RTD[c] | $10^4$RTD | RTD | RTD | RTD | | | |
| ***B. abortus*** | S | –d | + | + | + | + | – | +e | +f | Cattle and other Bovidae |
| ***B. suis*** | S | – | – | + | +g | +g | – | + | +h | Biovar 1: swine<br>Biovar 2: swine, hare<br>Biovar 3: swine<br>Biovar 4: reindeer<br>Biovar 5: wild rodents |
| ***B. melitensis*** | S | – | – | – | –i | + | – | + | +j | Sheep and goats |
| ***B. neotomae*** | S | – | –k | + | + | + | – | – | +h | Desert wood rat[l] |
| ***B. ovis*** | R | + | – | – | – | – | + | – | – | Rams |
| ***B. canis*** | R | – | – | – | – | | + | + | +h | Dogs |
| ***B. ceti*** | S | | +m | | +n | +o | – | + | + | Cetaceans |
| ***B. pinnipedialis*** | S | | +m | | +n | +o | – | + | + | Pinnipeds |
| ***B. microti*** | S | – | – | + | + | | | + | + | Vole (*Microtus arvalis*) |
| ***B. inopinata*** | S | – | p | | | | | + | + (fast) | ? |

*Banai و Corbel (۴۵).

[a] فاژ تی بی لیزی/ تفلیس (Tb)، وی بریج (Wb)، ایزات نگار/ عزت نگا (Iz1) و R/C.

[b] به طور طبیعی: S/ صاف، R/خشن.

[c] RTD/ روتین تست دایلوشن.

[d] معمولاً بیووار ۲ *بروسلا آبورتوس* برای رشد در جداسازی اولیه به سرم نیاز دارد.

[e] برخی سویه‌های آفریقایی بیووار ۳ *بروسلا آبورتوس* منفی هستند.

[f] بینابینی/متوسط، به‌استثنای سویه ۵۴۴ و برخی سویه‌های فیلدی که منفی هستند.

[g] برخی سویه‌های بیووار ۲ *بروسلا سوئیس* به‌وسیله فاژ Wb یا Iz لیز نشده یا به طور جزئی لیز می‌شوند.

[h] به‌سرعت.

[i] برخی سویه‌ها به‌وسیله فاژ Wb لیز می‌شوند.

[j] به‌کندی، برخی سویه‌ها به طور استثنایی سریع هستند.

[k] پلاک‌های ریز و کوچک.

[l] *نئوتوما لپیدا*.

[m] برخی سویه‌ها به‌وسیله فاژ Tb لیز می‌شوند.

[n] اکثر سویه‌ها به‌وسیله فاژ Wb لیز می‌شوند.

[o] اکثر سویه‌ها به‌وسیله فاژ Iz لیز می‌شوند.

[p] لیز ناقص با فاژهای Tb، F1 و F25 در غلظت $10^4$×RTD (Scholz و همکاران، ۲۰۱۰) یا فاقد حساسیت به Tb (De و همکاران، ۲۰۰۸).

جدول ۳- طبقه‌بندی گونه‌ها و بیووارهای جنس بروسلا *

| Species | Biovar | $CO_2$ Requirement | $H_2S$ Production | Growth on Dyes[a] | | Agglutination with Monospecific Sera | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Thionin | Basic Fuchsin | A | M | R |
| ***B. melitensis*** | 1 | – | – | +d | + | – | + | – |
| | 2 | – | – | + | + | + | – | – |
| | 3 | – | – | + | + | + | + | – |
| ***B. abortus*** | 1 | +b | + | – | + | + | – | – |
| | 2 | +b | + | – | – | + | – | – |
| | 3 | +b | + | + | + | + | – | – |
| | 4 | +b | + | – | +c | – | + | – |
| | 5 | – | – | + | + | – | + | – |
| | 6 | – | – | + | + | + | – | – |
| | 9 | + or – | + | + | + | – | + | – |
| ***B. suis*** | 1 | – | + | + | –e | + | – | – |
| | 2 | – | – | + | – | + | – | – |
| | 3 | – | – | + | + | + | – | – |
| | 4 | – | – | + | –f | + | + | – |
| | 5 | – | – | | – | – | + | – |
| ***B. neotomae*** | – | – | + | –g | – | + | – | – |
| ***B. ovis*** | – | + | – | + | –f | – | – | + |
| ***B. canis*** | – | – | – | + | –f | – | – | + |
| ***B. ceti*** | – | – | – | +d | + | + | –f | – |
| ***B. pinnipedialis*** | – | + | – | + | + | + | –f | – |
| ***B. microti*** | – | – | – | + | + | – | + | – |
| ***B. inopinata*** | – | – | + | + | + | – | + | – |

*Banai و Corbel (۴۵).

[a] غلظت رنگ در محیط سرم دکستروز: ۲۰ میکروگرم/میلی لیتر

[b] معمولاً مثبت در جداسازی اولیه.

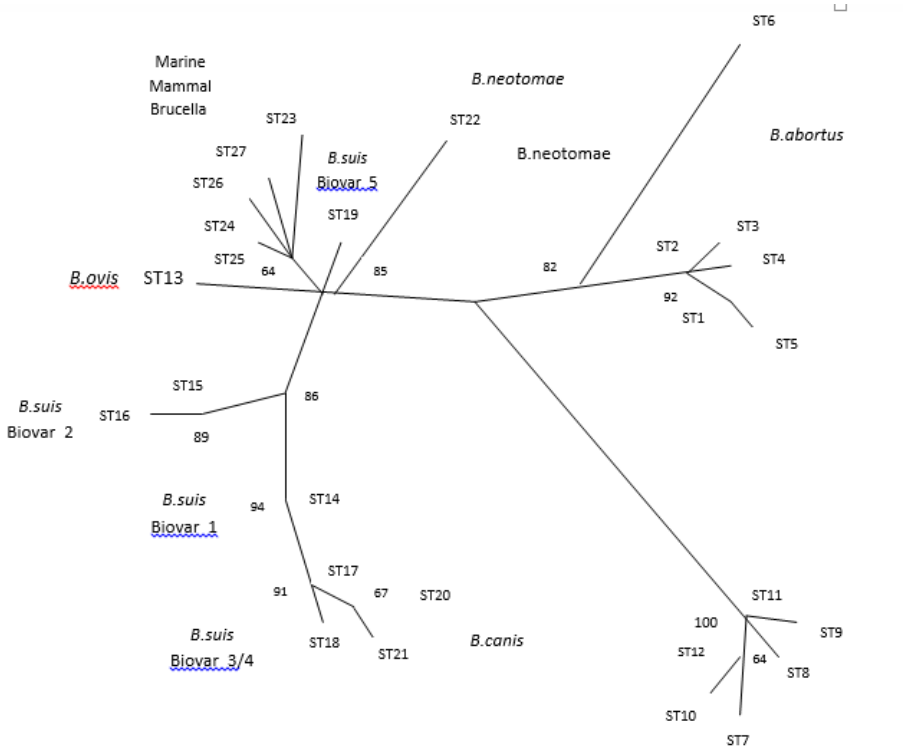
[c] بعضی سویه‌های حساس به فوشین بازیک جداشده‌اند.

[d] از رشد بعضی سویه‌ها به‌وسیله رنگ‌ها جلوگیری می‌شود.

[e] بعضی سویه‌های مقاوم به فوشین بازیک جداشده‌اند.

[f] منفی برای اکثر سویه‌ها.

[g] رشد در غلظت ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر تیونین.




شکل ۱: شمای اشتقاق باکتری‌های بروسلا

### لیپوپلی ساکارایدبروسلا (LPS)

لیپیدهای A اعضای پروتئوباکتر آلفا ۲ (α۲) شامل زنجیره بلند اسیدهای چرب n-۲-هیدروکسیلات، چون $C_{28:0}$ (27-OH) و $C_{30:0}$ (29-OH) بوده (**۶۸**)، اما زیرگروه‌های بتا (β) یا گاما (γ) متفاوت می‌باشند. ساختار هسته لیپید A حاوی دی ساکارایدهای دی آمینو گلوکز مونو- یا بیس فسفریلات با امکان تنها اتصال آمیدی به گروه های آسیل 3-OH می باشد. در مقابل، لیپید A کلاسیک اکثر باکتری‌های بیماری‌زا گرم منفی از دی ساکارایدبیس فسفریلات با دو آمید و دو استر مرتبط به 3-OH هیدروکسی میریستات، $C_{14:0}$ (3-OH)، تشکیل یافته است. در *بروسلا آبورتوس*، اسیدهای چرب هیدروکسیل اصلی در نیمه لیپید A فاقد اسید میریستیک β-OH (بتا- OH) از یک‌طرف بوده اما از طرفی دیگر با هفت اسید چرب اصلی ۸۵٪ اسیدهای چرب دارای طول زنجیره معادل ۱۶ اتم کربن یا بیشتر را نشان می‌دهد (**۷۰،۶۹**). اسیدهای چرب زنجیره طولانی‌تر به ترتیب $C_{28:0}$ (27-OH)، ($C_{18:0}$3-OH) و ($C_{14:0}$) 3-OH شناسایی‌شده‌اند (**۷۰**). اخیراً ماهیت اسیدهای چرب زنجیره بلند (C28) به‌عنوان عامل پاتوژنز گونه‌های بروسلا با به حداقل رساندن پاسخ ایمنی ذاتی باواسطه TLR4 میزبان در مقایسه با لیپوپلی ساکارایدآنتروباکتریال شناخته‌شده است (**۷۲،۷۱**).

اولیگوساکارایدو هاپتن استخراجی به‌وسیله آب–فنل از LPS *بروسلا آبورتوس* صاف شامل مانوز، گلوکز، ۲-آمینو-۲،۶-دی دزوکسی-D–گلوکز. (کینو ووزامین)، ۲- آمینو- ۲- دزوکسی – D– گلوکز (گلوکزآمین)، ۳- دزوکسی– D-مانوز-۲-اسید اوکتولوزونیک (KDO) و قندهای شناسایی نشده دیگر می‌باشند. از طرفی دیگر پلی B (پلی ساکارایدهاپتن استخراجی با اسید تری کلر استیک از *بروسلا ملی تنسیس* سویه راف B115)، شامل مقادیر جزئی کینو ووزامین و KDO بوده اما فاقد مانوز، گلوکز و گلوکز آمین بوده است (**۷۳**).

بخش آب‌دوست (هیدروفیلیک) LPS حاوی آنتی‌ژن زنجیره– O (موجود در سویه‌های صاف بروسلا) می‌باشد. در بروسلاهای دارای اپی توپ A (چون بیووار ۱ *بروسلا آبورتوس*) آنتی‌ژن– O حاوی پروزامین با ۹۶ تا ۱۰۰ زیر واحد گلیکوزیل، و در بروسلاهای دارای اپی توپ M (مثل بیووار ۱ *بروسلا ملی تنسیس*) آنتی‌ژن – O حاوی پروزامین پنتاساکارایدی (۵ قندی) است (**۷۴**). ساختار متمایز LPS، از جمله پروزامین زنجیره – O

در سویه‌های صاف *بروسلا*، از ویژگی شناخته *بروسلا* محسوب می‌گردد.

فرآورده‌های ژنی *gmd*، *per* و *wbkC* در سنتز ۴- فورمامیدو- ۴، ۶- دی دزوکسی مانوز دخالت دارند. محصول ژن wbkA مشابه چندین مانوزیل ترانسفراز بوده و احتمالاً در پلیمریزاسیون زنجیره- O *بروسلا ملی تنسیس* نقش دارد (۷۵). قابل اهمیت است ذکر شود که *یرسینیا آنتروکولیتیکا* O:9 به علت ساختار تقریباً مشابه زنجیره – O با آنتی‌ژن A *بروسلا آبورتوس* واکنش متقاطع دارد (**۸۰-۷۶**). این واکنش متقاطع در تشخیص سرولوژی دخالت داشته و برنامه ریشه کنی بروسلوزیس را مشکل می‌سازد (**۸۳-۸۱**). واکنش متقاطع خفیف‌تری بین LPS *بروسلاهای* صاف (صاف) و *اشریشیا کولی* O:157، *فرانسیسلا تولارنسیس*، *سالمونلا* O:30، *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* و *ویبریو کلرا* اتفاق می افتد (**۸۴**). این واکنش ها نیز ناشی از ساختارهای پروزامین در LPS می‌باشند. واکنش ها با این باکتری‌ها اتفاقی بوده و ساختارهای لیپید A و هسته پلی ساکارید در این باکتری‌ها کاملاً از *بروسلا* متفاوت است.

گونه‌های راف (خشن) *بروسلا* فاقد آنتی‌ژن زنجیره O– می‌باشند. *بروسلا کنیس* با پرگنه های موکوئیدی رشد کرده اما خصوصیات بیوشیمیایی آن بسیار با بروسلا سوئیس نزدیک است. علی رقم فقدان آنتی‌ژن-O پلی ساکارید صاف در *بروسلا کنیس*، این باکتری برای سگ کاملاً زهرآگین (حاد) بوده و برای انسان نیز با شدت کمتری از سویه‌های صاف بیماریزا می باشد. *بروسلا اوویس* نیز به طور طبیعی راف بوده و برای گوسفند بیماریزا است. *بروسلا اوویس* فاقد بخشی از کروموزوم من جمله قطعه ۱۵/۱ kb مرتبط با جایگاه ۲ ژنومی در گیر در سنتز LPS است (جدول۴). این قطعه اختصاصی حاوی ژن *wboA* و دو ژن دیگر درگیر در بیوسنتز LPS بوده و ازاین‌رو در فقدان آن مورفولوژی راف بروسلا اوویس شکل میگیرد (**۸۸-۸۵**).

*جدول۴: جایگاه های ژنومی شناسایی شده جنس بروسلا در مقایسه با بروسلا ملی تنسیس**

| Genomic Island | Relevant to Brucella spp. | Size and Location | Number of ORFs | Important Genes |
|---|---|---|---|---|
| GI1 | *B. ovis* | 8.1 kb (ChrI) | 9 | Phage related genes |
| GI2 | *B. ovis* | 15 kb (ChrI) | 20 | Transposases and phage family integrase and LPS synthesis |
| GI3[a] | *B. canis*<br>*B. suis* | 21 kb (ChrI) | 30 | |
| GI4 | *B. abortus* | 3.8 kb (ChrI) | 5 | Butanoate metabolism |
| GI5 | *B. ovis* | 44 kb (ChrII) | 42 | Peptide ABC transporters, transcriptional regulators and two ORFs similar to cephalosporin acylases |
| GI6[b] | *B. neotomae* | 7.5 kb (ChrII) | 10 | Transposases with significant similarity to ORFs on plasmid Pngr234a from Rhizobium species |
| GI7 | *B. ovis* | 4.4 kb (ChrII) | 5 | |
| GI8 | *B. abortus* | 25.1 (ChrII) | 25 | Proteins involved in sugar metabolism and LPS biosynthesis |
| GI9 | *B. ovis* | 4.9 kb (ChrII) | 4 | |

* Rajashekara و همکاران (۸۷).

[a] *بروسلا کنیس* در فقدان ۳۰ مورد ORFs با *بروسلا سوئیس* سهیم بوده که بر منشا فیلوژنتیک مشترک دو گونه دلالت دارد.

[b] علاوه بر حذف GI6 در DNA ژنومیک *بروسلا نئوتومه* این سویه با *بروسلا ملی تنسیس* بسیار همولوگ بوده، که بر منشا فیلوژنیک مشابه آنها اشاره دارد.

## پروتئین های غشا خارجی (OMPs) *بروسلا*

برخی ویژگی های پروتئین های غشا خارجی (OMPs) بروسلا کاملاً متمایز بوده و نقش مهمی را در تعیین خصوصیات *بروسلاها* ایفا می نمایند. OMPs *بروسلا* بر طبق اندازه آنها گروه بندی می شوند. پروتئین های با جرم مولکولی ۳۶ تا ۳۸ کیلو دالتون (KDa ۳۸-۳۶) به‌عنوان پروتئین های پورین گروه ۲ و

OMPs با جرم مولکولی ۳۴-۳۱ KDa و ۲۷-۲۵ KDa به‌عنوان پروتئین های گروه ۳ طبقه‌بندی شده اند. پروتئین های ۲۵-، ۳۱- و ۳۶- کیلو دالتون OMPs اصلی بوده در حالیکه مولکول های ۱۰-، ۱۶-، ۱۹- و ۸۹ کیلو دالتون از ترکیبات فرعی هستند. OMP با جرم مولکولی ۳۶-کیلو دالتون یک پورین بوده (۸۹) و OMP با جرم مولکولی ۲۵-کیلو دالتون برای حفظ عفونت *بروسلا ملی تنسیس* بسیار قابل اهمیت شناخته‌شده است (۹۰). لازم به ذکر است که سیستم دو جزیی BvrR/BvrS در کنترل تهاجم بروسلا به سلول های میزبان و بقای داخل سلولی آن ضروری شناخته‌شده است (۹۱). سیستم BvrR/BvrS به طور اختصاصی تجلی ۲ گروه از ۳ گروه پورین غشای خارجی *بروسلا* را تنظیم می نماید. موتانت های بدون اثر BvrR/BvrS فاقد Omp25 تغیراتی را در آب گریزی، نفوذپذیری و حساسیت پوشش سلولی به پپتیدهای باکتری کشی مورد نظر نشان داده که به تخفیف زهرآگینی (حدت) موتانت ها منجر خواهد شد (۹۲).

OMP با جرم مولکولی ۱۶ کیلو دالتون شباهت زیادی به لیپوپروتئین های مرتبط به پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم منفی نشان داده و همانند OMPs با جرم مولکولی ۱۰- و ۱۹- کیلو دالتونی لیپوپروتئین های سطحی دارای پیوند کووالانسی با اسیدهای چرب می‌باشند. این پروتئین ها در شش گونه اصلی و بیووارهای مرتبط با آنها وجود دارند (۹۳،۹۴). Omp10 و Omp19 دارای اجزا آنتی‌ژنی مشترک با باکتری‌های خانواده *ریزوبیاسه* (*Rhizobiaceae*) می‌باشند (۹۵). حذف ژن های *omp10* و *omp19* به موتانت تخفیف حدت یافته منجر می شود. موتانت های *omp10* کاهش مدت زمان بقا در موش و رشد ناقص در محیط نشان داده در حالیکه موتانت های *omp19* حساسیت زیاد به پلی میکسین B و دزوکسی کولات سدیم داشته و پرگنه های بسیار کمتری از کشت طحال موش پس از ۴ و ۸ هفته عفونت تولید می نمایند (۹۶). Cloeckaert و همکاران این پروتئین ها را مورد بررسی وسیع‌تری قرار داده اند (۹۷).

چندین ژن *omp* *بروسلا* شناسایی و مورد بررسی قرارگرفته‌اند (۹۸-۱۰۰). ژن *omp3a* پروتئین ۲۵ کیلو دالتونی(Omp 25KDa) پیش تر شناخته‌شده را رمز (کد) کرده و ژن *omp3b* به Omp31 *بروسلا ملی تنسیس* منتسب می باشد. با شناسایی ترادف ژن *omp31* ، قطعه DNA به‌وسیله روش PCR تکثیر شده و پلی مورفیسم در جایگاه *omp31* گونه‌های *بروسلا* نشان داده شد (۱۰۱). بعداً این پلی مورفیسم برای تمایز بین گونه‌های *بروسلا* به‌وسیله روش PCR-RFLP و هیبریدیزاسیون DNA-DNA مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده ازاین‌رویکرد، فقدان ژن در *بروسلا آبورتوس* به علت حذف ۱۰ کیلوباز (10kb ) مشهود بوده، در حالیکه تشخیص افتراقی و تمایز *بروسلا نئوتومه* از بیووارهای ۴،۳،۱ و ۵ *بروسلا سوئیس* امکان‌پذیر نبوده است.

تجزیه پروتئین پورین ۳۶ کیلو دالتونی (36 KDa)، دو ژن *omp2a* و *omp2b* را آشکار ساخته، که در کروموزوم به صورت تکرار وارونه از یک کپی ژنی با تشابه توالی حدود ۸۵٪ وجود دارند (۱۰۰). این پلی مورفیسم ممکن است با حساسیت افتراقی رنگ وابسته بوده، که به‌عنوان یکی از آزمایش‌های بایوتایپینگ متداول مورد استفاده می باشد (جدول ۳). شاخص های RFLP در این ژن ها امکان تمایز بین گونه‌های *بروسلا* و طبقه‌بندی اکثر بیووارهای درون گونه‌ها را فراهم می سازد (۱۰۲،۱۰۳). استفاده وسیعتر RFLP برای طبقه‌بندی گونه‌های *بروسلا* براساس ژن های *omp25* و *omp36* پیشنهاد شده است (۱۰۴).

**ژنوم بروسلا**

خصوصیات ژنوم از اهمیت اساسی در تعریف جنس برخوردار است. ازاین‌رو، ارتباط *بروسلا* با گروه α-۲ پروتئوباکتر از طریق دو کروموزوم، همانند دیگر اعضای گروه، مورد حمایت می باشد (۱۰۵).

ژنوم بایوار ۱ *بروسلا ملی تنسیس* سویه تیپ 16M برای اولین بار به‌وسیله DelVecchio و همکاران به‌عنوان نامزد (کاندید) پروتوتایپ گونه‌های بروسلا در سال ۲۰۰۲ مشخص گردید (۵۷). بعداً ژنوم سویه رفرانس ۱۳۳۰ *بروسلا سوئیس* (۶۲) و سویه وحشی ۹۴۱-۹ *بروسلا آبورتوس* (۶۱) و اخیراً سویه تیپ *بروسلا اوویس* ATCC25840 (۶۳) شناسایی شد. در مراحل بعدی نیز ژنوم دیگر سویه‌ها از جمله سویه ۲۳۰۸ *بروسلا آبورتوس*، با کاربرد وسیع در بررسی های تجربی (۶۰) و سویه واکسن S.19 *بروسلا آبورتوس* (۱۰۶) شناسایی شده و تاکنون ۱۳ ژنوم بروسلاها مشخص گردیده است (۱۰۷،۱۰۸). این پیشرفت ها به درک و شناخت بیشتر گونه‌ها و بیووارهای *بروسلا* برای طبقه‌بندی و روابط فیلوژنیک احتمالی آن‌ها با نیای اصلی منجر شده است (۱۰۷).

ترکیب DNA *بروسلاها* نشان داده (**۸۵**) که تمامی اعضای جنس در میزان پایه ای ۵۵ تا ۵۸٪ گوانین + سیتوزین در بین شش گونه برخوردار بوده هر چند که *بروسلا اوویس* فاقد بخش کوچکی از ترادف پلی نوکلئوتید موجود در DNA دیگر گونه‌ها می باشد. لازم به ذکر است که *بروسلاها* از امکان همانند سازی خارج کروموزومی چون پلاسمیدها یا فاژها با فقدان تولیداتی چون اگزوتوکسین و مقاومت قابل انتقال به آنتی بیوتیک ها برخوردار نیستند (**۸۵**). در مقابل، فاژهای لیز کننده آنها مشخص میباشند (جدول ۲). مهندسی مولکولی به توسعه چهار مشتق از حامل کلونی با دامنه وسیع میزبانی pBB RIMCS منجر شده (**۱۰۹**) که در گونه‌های بروسلا همانندسازی شده و قابل مقایسه با گروه پلاسمیدهای IncP ، IncQ و IncW و همچنین همانند سازی بنیادی ColE1 و p15a می‌باشند (**۱۱۰**).

وجود دو کروموزوم مستقل در تیپ سویه 16M *بروسلا ملی تنسیس* با اندازه تخمینی به ترتیب ۲/۱۲ و ۱/۱۵ مگاباز در بررسی های اولیه الکتروفورز شناسایی شدند (**۱۰۵**). در بررسی ژنوم وجود دو کروموزوم شامل کروموزوم I بزرگتر از کروموزوم II با طول متوسط به ترتیب ۲/۱ و ۱/۲ مگاباز (Mb ) در بین ژنوم موجود مورد تائید قرار گرفت. بیووار ۳ *بروسلا سوئیس* دارای یک کروموزوم واحد منحصر به فرد به اندازه ۳/۱ مگاباز می باشد (**۱۱۱**). هر دو کروموزوم میزان سیتوزین + گوانین (C+G ) مشابه با حد متوسط ۵۷/۱٪ برای کروموزوم I و ۵۷/۳٪ برای کروموزوم II دارند (**۱۱۲**). کروموزوم I بروسلا اکثر فعالیت های متابولیکی هسته مرکزی چون رونوشت برداری، انتقال و سنتز پروتئین، و همچنین پروتئین های وابسته به فاژ را رمز دار می کند. در مقابل، کروموزوم II ژن های درگیر در فرآیندهایی چون انتقال غشایی، تنظیم و متابولیسم انرژی را کد می کند. باوجودی که هیچ گونه منشأ همانندسازی پلاسمیدی شناخته نشده (۵۷)، کروموزوم II سویه ۱۳۳۰ *بروسلا سوئیس* گروهی از ژن های همانندسازی مشابه پلاسمید از جمله پروتئین آغاز همانندسازی RepC (BRA 001) و پروتئین های تفکیکی RepA و RepB (BRA 1202 و BRA 1203) مشابه با ژن های همانند سازی پلاسمید در پلاسمیدهای *آگروباکتریوم* Ti و پلاسمیدهای دیگر باکتری‌ها چون گونه‌های *ریزوبیوم*، را نشان داده است (**۶۲**).

اختلافات ژنی گونه‌ها در روش‌های MLVA و MLSA نشان داده‌شده (**۱۱۴،۱۱۳**) لیکن بررسی های بیشتری مورد نیاز می باشد. در جدول ۴ ویژگی های ژنی در مقایسه با *بروسلا ملی تنسیس* نشان داده‌شده است. سنتز پلی ساکارید در گونه‌های *بروسلا* شناخته نشده اما در برخی باکتری‌های متعلق به گروه آلفا۲–پروتئوباکتریا شناسایی شده است (**۱۱۵**). ژن 9-kb کد کننده Cgs در زهر آگینی باکتری‌های *بروسلا* دخالت دارد (**۱۱۷،۱۱۶**).

عامل همانندساز IS711 برای اولین بار در *بروسلا اوویس* (**۱۱۸**) و بعد در تمامی شش گونه اصلی (**۱۲۱–۱۱۹**) و اخیراً در *بروسلاهای* دریایی (**۱۲۲**) شناسایی شد. در بررسی PCR براساس پلی مورفیسم ترادف IS711 امکان شناسایی بیووارهای ۱، ۲ و ۴ *بروسلا آبورتوس* ، ۳ سروار *بروسلا ملی تنسیس*، *بروسلا اوویس* و بیووار ۱ *بروسلا سوئیس* فراهم آمده است (**۱۲۶–۱۲۳**).

## سیر تکاملی (فیلوژنی) بروسلا

بررسی های هیبریدیزاسیون DNA-DNA، سویه‌های *بروسلا* را در فوق تیره (Superfamily) اسید ریبونوکلئیک ریبوزومی IV قرار داده، که شامل گروه های *آگروباکتریوم*، *ریزوبیوم*، *مایکوپلاسما*، *فیلوباکتریوم* و گروه Vd مراکز کنترل بیماریها (CDC) می باشد (**۱۲۷**). جایگزینی دسته *پروتئوباکتریا* با چهار زیر گروه آلفا تا دلتا در این فوق تیره نیز پیشنهاد شده است (**۱۲۸**).

بر مبنای همانندی 16S-rRNA و دیگر ترادف های DNA، *بروسلا آبورتوس* در گروه آلفا -۲ از *دسته پروتئوباکتریا* قرارگرفته (**۱۲۹**) و با توجه به بررسی های تجانس 16s-rRNA *آکروباکتروم* (۱۳۰)، تعلق *بروسلا* و *فیلوباکتریوم* به‌عنوان نزدیکترین جنس های مرتبط به ثبوت رسیده است (**۱۳۱**). با شناسایی و تعیین خصوصیات *آکروباکتروم اینترمدیوم* به‌عنوان گونه بینابینی ما بین *آکروباکتروم* و *بروسلا*، نتیجه فوق بیشتر مورد حمایت قرار گرفت (**۱۳۲**).

Wattam و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی ۲۲۴۶ گروه پروتئین درون ژنوم ۱۰ سویه بروسلا به نمایندگی از *بروسلا آبورتوس*، *ب. ملی تنسیس*، *ب. سوئیس*، *ب. کنیس* و *ب. ستی* و با استفاده از نزدیکترین وابسته ها در راسته *ریزوبیال* ها، *آکروباکتروم* (*آکروباکتروم آنتروپی* و *آگروباکتروم اینترمدیوم*)، *بارتونلا کینتانا* و *مزوریزوبیوم لوتی* (*Mesorhizobium Loti*)

به‌عنوان گروه خارج از *بروسلا*، در جنس بروسلا شش دسته فیلوژنیک درون جنسی *بروسلا آبورتوس*، ب. *ملی تنسیس*، ب. *سوئیس*، ب. *کنیس*، ب. *اوویس* و ب. *ستی* شناسایی نمودند (**۱۱۲**). آکروباکتروم نزدیکترین جنس خارج از گروه شناخته شد. نهایتاً منشا مشترک دو گروه با نیای واحد تعیین گردید (**۱۳۳**) و وابستگی نزدیک *بروسلا نئوتومه* و *بروسلا ستی* شناخته شد (شکل ۱).

در بررسی مقایسه ای SNP سیزده ژنوم *بروسلا*، *بروسلا اوویس* به‌عنوان گونه پایه ای و *بروسلا ملی تنسیس* و *بروسلا آبورتوس* در شاخه ای دورتر و با فاصله شناسایی گردید. این یافته موید آن است که *بروسلای* اولیه در ابتدا گوسفند را آلوده ساخته و بعد به خوک، گاو و بز انتقال یافته است. همانطوریکه بررسی SNP نشان داده جنس بطور استثنایی تک شکلی (مونومورفیک) بوده و طی چند هزار سال تغییرات جزیی ایجاد شده است (**۱۰۷**). با توجه به سیر تکاملی تیره *سوئیده* (Family *Suidea* – تیره خوک سانان) در ۵۰ تا ۲۰ میلیون سال پیش و مقدم بر زیر راسته *رومینانتیه* (*Ruminantiae* – نشخوار کنندگان) شامل زیرتیره های *بوویده* (Sub-family *Bovinae*) و *کاپرینه* (Cappinae)، نتیجه فوق مورد بحث است (**۶۰**). باوجود این، به نظر نمی رسد قدمت میزبان ارتباطی داشته مگر این که وجود *بروسلا* پیش از ظهور نشخوارکنندگان نشان داده شود.

فاصله طبقه‌بندی بین *بروسلا* و *آکروباکتروم* با مقایسه ترادف-های ژن *recA* و *rrs* ( 16S- rRNA ) در هفت مورد از ۹ گونه *آکروباکتروم* و ۳ سویه تیپ *پزودوآکروباکتروم* (pseudochrobactrum) و هم‌چنین ۸ گونه بروسلا ( *بروسلا اینوپیناتا* هنوز توصیف نشده است) مورد بررسی قرارگرفته است (**۱۳۴**). در مقایسه ترادف های *rrs* هفت سویه *آکروباکتروم* به‌عنوان هدف و با استفاده از *آکروباکتروم آنتروپی* (تیپ سویه) به مشابه سویه شاخص، فاصله بین گروه های زیر گونه‌ای در جنس با مقایسه تجزیه *recA* تشکیل دهنده گروه متجانس شناسایی شد. از طرفی دیگر ، گونه‌های *بروسلا* از *آکروباکتروم اینترمدیوم* از طریق ردیف های *rrs* (۹۸/۶٪) و *recA* (۸۵/۵٪) قابل تمایز نبوده اند. رابطه نزدیک گونه‌های بروسلا با جنس *آکروباکتروم* (که از نظر طبقه‌بندی چند گونه و زیر گونه متنوع را دربرگرفته) به این نتیجه منجر شد که مولفین معیارهای بیشتری را برای مرز بندی روشن بین دو جنس ضروری دانستند (**۱۳۴**). با جایگزینی *بروسلا اینوپیناتا* در جنس بروسلا، توسعه ساختار طبقه‌بندی درست بر طبق شاخص های رایج چون 16s rRNA، RFLP ژن *omp2* و MLST پیچیده تر شده و این گونه در خط مرزی بین *بروسلا* و *آکروباکتروم* قرار گرفت.

رویکردی تازه از طبقه‌بندی بر نقش بوم شناختی به‌عنوان فاکتور مهم در مرزبندی جنس ها و گونه‌ها اشاره دارد (**۱۳۵**). ویژگی ضروری *بروسلا* در نقش بیماریزایی آن در میزبان طبیعی با انواع غیر وابسته من جمله انسان قرار دارد. نقش زئونوتیک سه گونه اصلی *بروسلا ملی تنسیس*، *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا سوئیس* و تا حد کمتری *بروسلا کنیس* به‌عنوان شاخص مهم مطرح می باشد (**۱۳۶**). گونه‌های دیگر کمتر نقش زئونوتیک داشته هرچند که شواهدی در این ارتباط وجود دارد. در مقابل، جنس *آکروباکتروم* باکتری‌های محیطی با زندگی آزاد و غیربیماریزا بوده و تنها *آکروباکتروم آنتروپی* و *آکروباکتروم اینترمدیوم* با بیماری در انسان و معمولاً در بیمارانی با مشکلات دیگر مرتبط می‌باشند (**۱۳۷**). بنابراین، بیماریزایی ذاتی و فقدان حالت زندگی آزاد از ویژگی های متمایز جنس *بروسلا* محسوب می‌گردد.

## نتایج

### تعریف جنس

بر طبق استانداردهای حداقل سال ۱۹۷۵، جنس بنا بر خصوصیات مورفولوژی، بیوشیمیایی، کشت، سرولوژی و بیماریزایی، با معیارهای بسیار محدود ژنتیکی (نسبت سیتوزین+ گوانین DNA ، تجانس هیبریدیزاسیون DNA-DNA) تعریف شده است. این معیارها برای اعضای جنس به قوت خود باقی بوده اما در ارتباط با سویه‌های جدید دیگر کافی به نظر نمی رسند. موقعیت فیلوژنیک جنس از زمان این استانداردها به طور مشخصی تغییر کرده است. در آن زمان بروسلا جنس متمایزی بدون وابستگی نزدیک به دیگر جنس‌ها شناخته‌شده بود. بعداً مشخص گردید که جنس *بروسلا* با تعدادی از جنس‌های درون زیرگروه آلفا-۲ *پروتئوباکتریا* و به ویژه *آکروباکتروم* رابطه بسیار نزدیکی دارد. این تشابه در حدی بود که حتی جنس واحدی برای این جنس‌ها پیشنهاد شده است. محتمل است که جنس‌های دیگری نیز با وابستگی نزدیک به *بروسلا* کشف شوند. اکنون مفروض است که جنس *بروسلا* و وابسته‌های نزدیک آن چون *آکروباکتروم* و *مایکوپلاسما* از نیای مشترک محیطی تکامل

یافته‌اند. بعید به نظر می رسد که فسیل چنین نیایی موجود باشد. باوجود این، شواهد واقعی فسیلی ممکن است از ساختارهای ژنومی و اشکال اولیه و بینابینی قابل شناسایی باشد. این بررسی ها ممکن است روابط بین جنس های موجود را توصیف نماید. باوجود این، از نقطه نظر عملی اختلاف اساسی بین *بروسلا* و *آکروباکتروم* وجود داشته که *بروسلا* بیماریزایی بنیادی داشته و با عفونت های اختصاصی در طیف وسیعی از میزبانان مرتبط می باشد. تمامی گونه‌های شناخته‌شده *آکروباکتروم* باکتری‌های محیطی ساپروفیتی بوده، برخی از آنها به طور اتفاقی عفونت های فرصت طلب در انسان و معمولاً در شرایط سرکوب ایمنی را موجب می شوند. هنوز ویژگی های تعریف شده براساس بیماریزایی در *بروسلا* تنها معیار شناخته‌شده بوده اما سرانجام ژنتیک مولکولی نقش غالب خواهد یافت. محتمل است این معیار در آینده اساس اختلاف در جنس را تشکیل خواهد داد. همچنین کاملاً محتمل است که برخی اشکال بینابینی وجود داشته اما تمامی اجزا تعیین کننده خواص بیماریزایی *بروسلا* در مقابل زمینه ژنتیک *آکروباکتروم* مشخص خواهد شد. شاید *بروسلا اینوپیناتا* بخشی از این مسیر را نمایندگی کند. در حال حاضر این معیار ژنتیکی کامل نیست.

تعریف جدید می بایستی بر ویژگی های ژنتیکی تاکید داشته باشد. نسبت سیتوزین + گوانین DNA به میزان ۵۶ تا ۵۹٪ و تجانس (هومولوگی) بیش از ۹۵٪ با DNA سویه‌های رفرانس، همراه با ساختار کروموزومی و ترادف ژنوم کامل از ویژگی های ضروری می‌باشند. باوجود این، تکنولوژی موجود برای این اهداف کافی نبوده و بررسی های بیشتری مورد نیاز است. کلید اصلی تمایز جنس از باکتری‌های دقیقاً وابسته در ترادف نوکلئوتید 16s-rRNA قرارگرفته است. در بررسی های شش گونه اصلی *بروسلا* و یک مورد دریایی (ATCC M2357/93) ، تماماً ۱۰۰٪ همانند بوده اند. در مقابل، 16s-rRNA *آکروباکتروم آنتروپی* وابسته همانندی ۹۹/۸٪ را نشان داده است. 16s-rRNA *بروسلا اینوپیناتا* اختلاف بسیار جزیی داشته و بنابراین به‌عنوان عضوی از جنس مورد پذیرش قرارگرفته است. ازاین‌رو، بررسی 16s-rRNA امکان شناسایی و جایگزینی سویه‌های جدید به‌عنوان عضوی از جنس را فراهم خواهد ساخت (**۱۳۸**). هم‌چنین، ضروری است خصوصیات فنوتیپی اساسی چون مورفولوژی گرم منفی، فقدان فلاژل و تحرک ( هرچند که *بروسلا* ژن های فلاژل را حفظ کرده، لیکن این ژن ها تغییر یافته، قابلیت تحرک را از دست داده و ممکن است نقشی در بیماریزایی ایفا نمایند)، مورد توجه بوده باشند. اکثر ویژگی های بیوشیمیایی و کشت می بایستی بدون تغییر و لیکن با اهمیت بیشتری برای فعالیت های متابولیکی در نظر گرفته شوند. وضعیت اختصاصی سرولوژی سویه‌های صاف ویژگی مشخصی بوده و وجود لیپوپلی ساکاراید متمایز ترکیب لیپید مرکزی همراه با زنجیره O– متشکل از هوموپلیمر N– فورمیل-۴- آمینو-۴ ، ۶- دی دزوکسی مانوز در تشخیص افتراقی جنس مفید می باشد. بیماریزایی در انواع مناسب حیوانی و یا وجود ژن های رمز دهنده (کد کننده) اجزا زهر آگینی (حدت) چون *virB* و سیستم ترشحی نوع IV نیز از ویژگی های شناخته‌شده بوده هر چند که احتمال حذف یا در هم گسیختگی در سویه‌های منفرد می بایستی مد نظر باشد.

## تعریف گونه

از دیرباز *بروسلاها* به‌عنوان گونه واحد با زیرگونه‌های متعدد مطرح بوده‌اند. در این رابطه اسامی متعددی در زمان‌های مختلف پیشنهادشده‌اند. ازجمله این نام‌گذاری‌ها می‌توان به *بروسلا ملی تنسیس* واریته *ملی تنسیس* یا واریته *آبورتوس* یا *بروسلا ملی تنسیس ملی تنسیس* و غیره (**۱۳۹**) اشاره نمود. درحالی‌که ازنقطه‌نظر علمی این رویکرد از اعتباری برخوردار بوده لیکن ازنظر عملی در تمایز سویه‌ها از منابع مختلف و در برنامه‌های کنترل دارای اهمیت کمی است. در طبقه‌بندی جاری گونه‌ها براساس تجانس (هومولوگی) DNA با تشابه بیش از ۷۰٪ قرارگرفته‌اند. برای بسیاری از جنس‌ها این سطح قادر به تمایز باکتری‌ها نبوده و اختلافات بیولوژیکی اساسی را شامل می‌گردد. هم‌چنین تکنیک‌های هیبریدیزاسیون اولیه قادر به تمایز اختلافات مهم ژنومی نیستند. اما در مورد *بروسلا* این تمایزات با بررسی و تجزیه ژنتیک مولکولی مورد تائید قرارگرفته، هرچند که اختلافات واقعی گونه‌ای ممکن است باقی ماند. ازاین‌رو، بهترین وضعیت طبقه‌بندی گونه‌ای بر مبنای نام‌گذاری گونه‌ها قرار دارد.

استفاده از ویژگی‌هایی چون نیاز به گاز $CO_2$ برای رشد، تولید گاز $H_2S$ ، فعالیت اوره آز، حساسیت بهرنگ‌ها و تیپ آنتی‌ژنی قادر به جایگزینی سویه‌ها در سه گونه اصلی بوده‌اند. الگوی متابولیک اکسیداتیو با ترکیبات کربوهیدرات، اسیدآمینه و سیکل اوره وابستگی به میزبان طبیعی ترجیحی را رهنمود داده است (**۱۴۱،۱۴۰**). این یافته با بررسی بیشتر از طریق فاژ تایپینگ مورد حمایت قرار گرفت (**۱۴۲،۱۴۳**). این روش‌ها همراه با آزمایش‌های

بیوشیمیایی، سرولوژی و حساسیت بهرنگ‌ها تمایز بیووارهای سه گونه اصلی *بروسلا آبورتوس*، بروسلا *ملی تنسیس* و *بروسلا سوئیس* را امکان‌پذیر ساخت. این سیستم طی سال‌ها مورد استفاده بوده هرچند که اختلافات بین سویه‌ها همیشه مطرح بوده و بیووارهای مختلف با خصوصیات برابر قابل‌تمایز نیستند. به‌عنوان مثال، بیووارهای ۱، ۲ و ۳ *بروسلا ملی تنسیس* درواقع سروار بوده، بیووارهای ۳ و ۶ *بروسلا آبورتوس* به حساسیت رنگ وابسته‌اند و گاهی عدم تجانس در سویه‌های *بروسلا اوویس* و *بروسلا کنیس* مشاهده می‌گردد. ازاین‌رو، واضح است که سیستمی دقیق‌تر برای تمایز زیرگروه‌های جنس ضروری خواهد بود. روش Multiplex PCR در شناسایی گونه‌های *بروسلا* و سویه‌های واکسن به موفقیت‌های دست‌یافته است (**۱۴۵،۱۴۴**).

بررسی‌های اخیر با تکنیک های SNP (Single Nucleotide Polymorphism)، تجزیه RFLP ژن *omp2* و MLST (Multilocus Sequence Typing) *بروسلا اوویس* را به‌عنوان گونه بنیادی جنس، با اشتقاق دسته *بروسلا آبورتوس* – *بروسلا ملی تنسیس* و گروه جداگانه *بروسلا سوئیس* – *بروسلا کنیس* از آن نشان داده‌اند (**۱۱۲،۱۰۷،۴۹،۴۸**). جالب‌توجه آن‌که *بروسلا اینوپیناتا* 16s-rRNA دقیقاً وابسته به *بروسلا* اما ترادف *omp2* متفاوت نشان داده است. جایگزینی این باکتری به‌عنوان گونه جداگانه در جنس *بروسلا* براساس MLST هشت ژن با وابستگی نزدیک‌تر به *بروسلا* تا *آکروباکتروم* قرار داشته است.

بر طبق پیشنهاد Banai و Corbel (**۴۵**) اصول طبقه‌بندی رایج *بروسلا* ارائه‌شده در جداول ۱ تا ۳ ساختار معتبری بوده و می‌بایستی براساس تکنیک‌هایی چون شناسایی و تعیین 16s-rRNA، فاژ تایپینگ، الگوهای متابولیسم اکسیداتیو و غیره ادامه یابد. در مرحله بعدی تایپینگ در سطح بیووار و شناسایی رابطه اپیدمیولوژیکی می‌بایستی با روش‌های تایپینگ مولکولی چون MLVA، MLST و SNP برای تعیین رابطه‌های فیلوژنیک و VNTR (Variable Number Tandem Repeats)جهت رابطه‌های اپیدمیولوژیکی تکمیل شود. بدون تردید این روش‌ها قادر خواهند بود وضعیت سویه‌های غیرمعمول (آتیپیک) را روشن سازند. به‌عنوان مثال سویه‌ای از بیووار ۱ بروسلا *ملی تنسیس* با محدودیت میزبانی به نشخوارکنندگان کوچک و انسان به‌وسیله Banai (اطلاعات منتشرنشده) ذکرشده اما تاکنون در گاو شناخته نشده است. Al Dahouk و همکاران وضعیت مشابهی را در مورد *بروسلا ملی تنسیس* محدود به عفونت بز در سال ۲۰۰۷ گزارش نموده‌اند (**۱۴۶**). ذوقی و عبادی نیز با موردی از سروار یک *بروسلا ملی تنسیس* در گاو با حساسیت به هر دو آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و پنی‌سیلین برخورد داشته‌اند (اطلاعات منتشرنشده). سویه‌های پستانداران دریایی نیز تنوع ژنتیکی نشان داده که اختلافات در پاتوژنیسیتی آن‌ها را منعکس می‌سازد. ازاین‌رو، هنوز مشکلات آشکاری در این زمینه‌ها وجود داشته که به بررسی‌های بیشتر در آینده نیاز دارد.

## تشکر و قدردانی

با تشکر از خانم ساناز سلگی و خانم سارا رحمانی در تنظیم و تایپ مقاله حاضر

## تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

## References

1. Bruce D; Note on the discovery of microorganism in malta fever. Practitioner 1887; 39: 161-170.
2. Bang B; Die aetiologie des seuchenhaften infectiosen). Verwerfens. Zeitschrift thier medicin. 1897; 1: 241-278.
3. Bang B; The etiology of epizootic abortion.J.comp. path & therap . 1897; 10:125-172.
4. Mohler J.R;Infection abortion of cattle. Ann. Rep.U.S.Bur. animal industry. 1913-1914; 14:30.
5. Traum J;Report of the chief of the bureau of animal Industry .U.S. Department of agriculture. Washington. DC.p. 1920;.30.
6. Evans A.C ; Further studies on bacterium abortus and related bacteria. A comparison of bacterium abortus with Bacterium bronchisepticus and with the organism which causes malta fever. J. Infect.Dis. 1918 22:380-393
7. Meyer K.F; and shaw E.B;A comparison of the morphologic cultural and biochemical characteristics of B. abortus and B. melitensis. J. infect.Dis. ; 1920) – 27: 173-184.
8. Huddles on I.F; Differentiation of the species of the genus Brucella. Am. J.pub. Health. Nations health 1931;21: 491-498.
9. Stableforth A.W; and Jones. L. M; International committee on bacteriological nomenclature sub-

committee on taxonomy of brucella. Report of the meeting 18 august 1962. Montreal Canada. Int. Bull. Bacteriol nomencl. 1963; 13 145-158.
10. Davydov N.N; Properties of brucella isolated from reindeer. Trudy. Vsye. Inst. Exp. Vet. 1961; 27 24-31.
11. Buddle M.B ; Studies on brucella ovis n.sp.) a cause of genital disease of sheep in new Zealand and Australia. J.Hyg lond) 1956; 54; 351-364.
12. Stoenner H.G; lackman. D. B; and BellE.J: A new species of brucella isolated from the desert wood rat Neotoma lepida Thomas. Am.J.Vet .Res. 1957; 1869): 942-951.
13. Carmichael L.E; and Brunner D.W; Characteristics of a newly recognized species of Brucella responsible for infectious canine abortions. Cornel Vet. 1968) – 38 379-392.
14. Korol A.G; and Parnas. J.Ein neuer serobiotyp von Brucella-Brucella murium korol)Z Gesamte Hyg. 1967;13-799-800.
15. Corbel M.J; and Morgan W.J.B; Proposal for minimal standards for description of new species and biotypes of the genus Brucella. Int.J. Syst. Bacteriol. 1875; 25.83-89.
16. Meyer M.E; inter- and Intra strain variants in the genus Brucella.Dev. Biol. Stand. 1984; 56 73-83.
17. Gones L.M; Report to the international committee on nomenclature of Bacteria by the subcommittee on taxonomy of Brucella. Minutes of meeting 22-23 july 1966 Moscow USSR. Int. J.Syst. Bacteriol . 1967; 17 371-375.
18. Jones L.M; and Wundt W; International committee on nomenel ture of bacteria subcommittee on the taxonomy of Brucella. Minutes of meeting 7 august 1970 Mexico city. Mexico. Int. J. Syst. Bacteriol. 1971; 25 235-236.
19. Wundt W; and Morgan W.B; International committee on systematic bacteriology subcommittee on taxonomy of Brucella. Minutes of meeting. September 1974. Tokyo.Japan. int.J. Syst. Bacterial 1975; 25. 235-236.
20. Corbel M.J; International committee on nomenclature of bacteria subcommittee on taxonomy of Brucella. Minutes of meeting 4 and 5 september 1978 munich Germany. Int J. Syst Bacterial. 1982; 32 260-261.
21. CorbelM.J; International committee on systematic bacteriology subcommittee on taxonomy of Brucella. Minutes of meeting september 1982 Boston. USA. Int.J.Syst. Bacteriol. 1984) – 34366-367.
22. CorbelM.J; International committee on systematic bacteriology subcommittee on taxonomy of Brucella. Report of the meeting 5 septermber 1986 Manchester. England . Int.J.Syst Bactoriol. 1988; 38 450-452.
23. CorbelM.J: and Morion I; international committee on systematic Bzcteriology subcommittee on taxonomy ofBrucella. Minutes of the meating 5 and 7th july 1994 Prague. Czech republic. Int.J. Syst. Evol. Bacteriol. 2006;661169-1170.
24. Osterman B; and Moriyon. I; minutes. International committee on systematics of prokaryotes subcommittee on the taxonomy of Brucella. Minutes of the meeting. 17 september 2003. Pamplona spain Int. J. Syst. Erol. Microbial. 2006; 561173-1175.
25. CorbelM.J;and Morgan. W.J.B; Genus Brucella Mayer nad Shaw. 1929 173AL in krieg NR Holg JG eds. Bergey's manual of systematic Bacteriology Ist ed. The Williams and Wikins co. Baltimore. Vol.J. pp. 1984; 377-388.
26. Corbel M.J and Banai M; Genus I. Brucella M ayer and Shaw 1920 172 AL in : Benner DJ krieg NR. Saley JT. Eds. Bergey's manual of systematic Bacteriology 2nd ed. Springer 2005. Vol. 2 pp. 2005; 370-386.
27. Verger.J.M; Brucella melitensis in cattle. In: Brucella melitensis. Plummet and Verger eds. Martinus Nijhoff publ. Dordrecht- Boston Lancaster. 1985; 197-203.
28. Zowghi E; and Ebadi A; Naturally occurring of B. melitensis infection in cattle in Iran. Rev. sci. tech. OIE 1985; 4 4).
29. Zowghi E;and Ebadi A; Abortion due to Brucella abortus in sheep in Iran. Rev. sci. Tech.OIE. 1988; 72).
30. Zowghi E; and Ebadi A; Brucellosis in camel in Iran. Rev-sci. Teeh. 1988; OIE 72)
31. Rezaei-Sadaghiani R; Zowgh E; et al .Brucella melitensis infection in sheep- dogs in Iran. Arch. Inst. Razi 1996; 46/47.
32. Verger J.M; Grimont F; et al Brucella a monospecific genus as shown by deoxyribo- nucleic acid hybridization. Int. J.Syst. Bacteriol. 1985; 35 592-595.
33. Bricker B.J; Ewalt D.R; et al .Molecular characterization of Brucella strains isolated from marine mammals J. Clin. Microbiol. 2000; 38 1258-1262.
34. Clavareau C; Wellemans V; et al .Phenotypic and molecular characterization of a Brucella strain isolated from a mink whale Balaenoptera aculorostrata). Miocrobioogy 1998; 144 3267-3273.
35. Dawson C.E; Stubberfield E.J; et al .Phenotypic and molecular characterization of Brucella isolates from marine mammals. BMC Microbiology. 2008; 8 244.
36. Foster G; Mae Millan A.P; et al. A review of Brucella sp. Infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. Vet. Microbial. 2002; 90 563-580.
37. Bourg G; O .callagan D; et al. The genomic structure of Brucella strains isolated from marine mammals gives clues to evolutionary history within the genus. Vet Microbial . 2007; 125; 375-380.
38. Gonzalez- Barrientos R; Morales J.A; et al. Pathology of striped dolphins stenella coeruleoalba) infected with Brucella cell. J. Comp . Pathol. 2010; 142 347-352.
39. Sohn A.H; Probert W.S; et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal Brucella spp. Emerg. Infect. Dis. 2003; q 485-488.
40. Mc Donald W.L; Jamaludin R; et al. Characterization of a Brucella sp. Strain as a marine- mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in new Zealand. J.Clin. Microbial. 2006; 44 4363-4370.

41. Whatmore AM; Dawson C.E; et al. Marine mammal Brucella genotype associated with zoonotic infection. Emerg. Infect . Dis. 2008; 14 517-518.
42. GroussaudP;ShanksterS.J;et al. Molecular typing divides marine mammal strains of Brucella into at least three groups with distinct host preferences. J.Med.Microbiol. 2007;561512-1518.
43. Cloeckaert A; VergerJ.M; et al.Classification of Brucella spp. Isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. Microbes Infect. 2001; 3729-738.
44. Whatmore A.M; Perrett. L.L et al. Characterization of the genetic diversity of Brucella by Multilocus sequencing BMC. Microbiology . 2007; 734.
45. Banai M; and Corbel M; Taxonomy of Brucella . The open Vet.Sci.J. 2010; 4 85-101.
46. Scholz H.C; Hubalek Z; et al .Brucella microti sp.nov. isolated from the common vole microtus arvalis . Int. J. Syst. Evol. Microbial. 2008) – 38 357-382.
47. Scholz H.C; Hubalek Z; et al. Isolation of Brucella microti from soil. Emerg. Infevt. Dis 2008; 14 1316-1317.
48. Scholz H.C; Hofer E; et al .Isolation of Brucella microti from mandibular lymph nodes of red foxes. Vulpes vulpes in lower Austria. Vector Borne Zoo. Dis. 2009; 9 153-155.
49. De B.K; Stauffer L; et. al Novel Brucella strain Bo1) associated with a prosthetic breast implant infection. J.Clin. Microbial . 2008; 40 43-49.
50. Tiller R.V; Gee J.E;et al .Identification of an unusual Bo2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destruetive pneumonia. BMC microbial. 2010; 10: 23-33.
51. Scholz H.C; Nockler K; et al .Brucella inopinata sp. Nov isolated from a breast implant infection. Int. J. Syst. Evol. Microbio. 2010; 604): 801-808.
52. Meyr M.E; and Morgan W.J.B ; Designadtion of neotype strains and of biotype reference strains for species of genus Brucella Meyer and shaw.Int. J. Syst. Bacteriol. 1972; 23: 135-141.
53. Foster G; Oysterman B.J; et al. Brucella ceti sp.nor. and Brucella pinnipedialis sp.nov.for Brucella strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int.J. Syst. Evol. Microbial . 2007; 57 2688-2693.
54. Tindal B.J; KampferP; et al. Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. Int.J.Syst. Evol. Microbial. 2006; 56 2715-2720.
55. Tindal B.J; Rosselo-MoraR; et al Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes.int . J. Syst. Evol. Microbial . 2010; 60 249-266.
56. StampJ.T; McEwan A.D; et al. Enzootic abortion in ewes. Transmission of the disease. Vet. Rec. 1950; 62 251-254.
57. Del Vecchio V.G; Kapatral V; et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen Brucella melitensis. Proc. Natl. Acad . Sci. USA. 2002; 90.443-448.
58. Seleem M.N; Boyle S.M; et al. Brucella a pathogen without classic virulence genes. Vet. Microbial. 2008; 129 1-14.
59. Fretin D; Fauconnier A; et al. The sheathed flagellum of Brucella melitensis is involved in persistence in a murine model of infection. Cell Microbial. 2005; 7: 687-698.
60. Chain P.S.G; Comerci D.J; et al. Whole- genome analysis of speciation events in pathogenic Brucella. Infect. Immun. 2005; 738353-8361.
61. Halling. S.M; Peterson-Burch B.D; et al. Completion of the genome sequence of Brucella abortus and comparison to the highly similar genomes of Brucella melitensis and Brucella suis. J.Bacteriol. 2005; 187; 2715-2726.
62. Paulsen I.T; Sechadri R; et al .The B. suis genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99 13148-13153.
63. Tsolis R.M; Sechadri R; et al. Genome degradation in B.ovis corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. Plos One 2009; 4: e 5519.
64. Rest R.F; and Robertson.D.C; Characterization of the electron transport system in Brucella abortus.J.Bacteriol . 1975; 122 139-144.
65. Smith H.A; Williams E; et al .Foethal erythritol; a cause of the localization of B. abortus in bovine contagious abortion Nature 1962; 193: 47-49.
66. Plummet M; Minimal requirements for growth of Brucella suis and other Brucella species.Z.b.L Bakt. 1991; 275 436-450.
67. Xie X. Orally administrable brucellosis- vaccine: suis strain 2 vaccine. Vaccine 1986; 4 212-216.
68. Bhat U.R; Carlson R.W; et al .Distribution and phylogenetic significance of 27-hydroxy octacosanoic acid in lipoply saccharides from bacteria belonging to the alpha-2 subgroup of proteobacterial int.J.Sys. Bacterial . 1991; 41 213-217.
69. Moreno E; Cloeckaert A; et al. Brucella evolution and taxonomy. Vet. Microbial. 2002; 90 209-227.
70. Ferguson G.P; Datta A; et al .Similarity to peroxisomal- membrane protein family reveals that sinorhizobium and Brucella Bae. A affevt lipid- A fatty acids. Pro. Nat. Acad. Sci. USA. 2004; 101.5012-5017.
71. Lapaque N; Takeuchi O; et al .Differential inductions of TNF-a and IGTP.IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipoplysaccarides. Cell Microbial . 2006; 8: 401-413.
72. Tsolis R.M; Young G.M ; et al. From bench to bedside stealth of enteroinvasive pathogens. Nat. Rev. 2008; 6 883-892.
73. MorenoE; Speth D.L; Immunochemical characterization of Brucella lipopolysaccharides and polysaccharides. Infect. Immune. 1981; 31: 214-222.
74. Mekle P.J; Perry M.B; et al. Fine structure of A and M antigens from Brucella biovars. Infect. Immun. 1989; 37; 2820-2828.
75. Godfrold F; Cloeckaert A; et al .Genetic organization of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis

region of Brucella melitensis 16m wbk). Res Microbiol. 2000; 151; 655-668.
76. Greiser-Wilke I; Moenning V; et al - Characterization of monoclonal antibodies against Brucella melitensis. Zentrabl. Vet.Med.B. 1985)32; 616-627.
77. Zowghi. E; and Ebadi A; isolation and identification of Yersinia enterocolitica o:g in cattle in Iran. Arch. Inst. Razi. 1985; 36/37.
78. Greiser-wik.I; Moenning V; et al .Monoclonal antibodies and characterization. of epitopes of smooth Brucella lipopolysaccharides. Ann. Inst. Pasteur. 1987; 136: 549-560.
79. Kittelberger R; Bundesen P.G; et al .Serological cross reactivity between B. abortus and Y. enterocolitica o.g. IV. Evaluation of th M- and C- epitope antibody response for the specific detection fo B.abortus infections. Vet. Microbial . 1998; 60: 45-57.
80. Munoz P.M.C; Marin M; et al. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to Y. enterolitica o:g. clin. Diag. Lab. Immunal. 2005; 12: 141-51.
81. Hibink F; Fenwick.S.G; et al. Non-spcific seroreactions against B. abortus in ruminant in new Zealand and presence of Y.enterolitica o:g.N.Z. Vet.J. 1995; 43: 175-178.
82. GerbierG; Garin-BastuJi.B; et al .False positive serological raections in bovine brucellosis evidence of the role of Y.enterocolitica serotype o:g in an field trial. Vet. Res. 1997; 28:375-383.
83. Godfroid J; Saegerman G; et al. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when specific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. Vet. Microbial. 2002; 90: 461-477.
84. Corbel M.J; Recent advances in the study of Brucella antigens and their serological cross reactions. Vet. Bull. 1985; 54: 927-942.
85. Corbel M.J; DNA analysis of Brucella present and future. In: Brucella melitensis: Verger J.M; Plummet M; Eds. Martinus Nijhoff Pub. The hague. 1985; Pp. 21-27.
86. Hoyer. B.H; McCullugh N.B; Homologies of deoxyribonucleic acids from Brucella ovis. Canine abortion organisms and other Brucella species. J.Bacteriol. 1968; 96; 1783-1790.
87. Rajashekara J; Glasner J.D; et al .Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in Brucella species. J. Bacterial. 2004; 186: 5040-5051.
88. Cardoso P.G; Macedo G.C; et al. Brucella spp. noncanonical LPS structure biosynthesis and interaction with host immune system. Microbial. Cell Fact. 2006)5:4-16.
89. Marquis H; Ficht T.A; The omp2 gene locus of B. abortus encodes for two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. Infect immune. 1993; 61 3785-3790.
90. Edmonds M; Cloeckaert A; et al .Brucella species lacking the major outer membrane protein omp25 are attenuated in mice and protect against B. melitensis. and B. ovis. Vet Microbial. 2002; 88 205-221.
91. Sola-Landa A; Pizaro-cerdo J; et al. A two – component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in B.abortus and Controls Cell invasion and virolence. Mol. Microbial. 1998; 29; 125-138.
92. Guzman-verri G; Manterola. L; et al. The two-component system Bur R/Bvrs essential for Brucella abortus virulence regulates the expression of outer membranc proteins with counterparts in membranes of the rhizobiacae. Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99; 2375-2380.
93. Tabor A; Saman E; et al .Molecular characterization occurrence and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of Brucella abortus. In fect. Immurol. 1996; 64:100-107.
94. Tabor A; Deceelle B; et al. Outer membrane proteins omp10 omp16 and omp19 of Brucella spp.are lipoproteins Infect Immunol. 1999; 67: 4690-4662.
95. Cloeckaert A; Tibor A; et al. Brucella outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. Clin. Diag. lab . Immunol. 1999; 6: 627-629.
96. Tiber A; Wansard V; et al. Effect of omp10 or omp 19 deletion on Brucella abortus outer membrane properties and virulence in mice. Infect . Immunol. 2002; 70: 5540-5546.
97. Cloeckaer A; Verger J.M; et al. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of Brucella. FEMS microbial. Lett. 1996; 145:1-8.
98. Vizcaino N; Cloeckaert A; et al. cloning nucleotide sequence and expression of the B.militensis omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein . Infect . Immunol . 1996; 64: 3744-3751.
99. Kovach M.E; Elzer P; et al .Cloning and nucleotide sequence analysis of a Brucella abortus gene encoding an 18KDa immunoreactive protein . Microb . Pathog. 1997; 22: 241-246.
100. Ficht T.A; Bearden S.W; et al. DNA sequence and expression of the 36KDa omp gene of B.abortus. Infect. Immune. 1989; 57: 3281-3291.
101. Vizaino N; VergerJ.M; et al. DNA polymorphism at the omo-31 locus of Brucella spp.evidence for a large deletion in B.abortus and other species-specific markers. Microbiology. 1997; 143:2913-2921.
102. FichtT.A; Husseinen H.S; et al. Species-specific sequences at the omp2 locus of Brucella type strains.I.J.syst. Bacteriol. 1996; 46: 329-331.
103. Ficht T.A; Bearde S.W; et al. Genetic variation at the omp2 porin locus of the Brucella Species-specific markers. Mol. Mocrobiol. 1990; 4: 1135-1142.
104. Cloeckaer A; Verger J.M: et al. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25KDa and 36KDa outer membrane proteins of Brucella. Microbiology. 1995; 141: 2111-2121.
105. Michaux S; pillissonJ; et al. Presence of independent chromosomes in the B. melitensis 16M genome. J.Bacteriol. 1993; 175: 701-705.

106. Crasta O.R; Folkerts O; et al. Genome sequence of Brucella abortus vaccine strain S19 compared to virulence strain yield candidate virulencegenes. Plos ONE. 2008; 35)e 2193.
107. Foster J.T; Beckstrom-stemberg S.M; et al .Whole genome-based phylogeny and divergene of the genus Brucella. J.Bacteriol. 2009; 141: 2864-2870.
108. Whatmore A.M; Current understanding of the genetic diversity of Brucella an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect. Genet. Evol. 2009; 9: 1168-1184.
109. Kovach M.E; Phillips R.W; et al. pBBR1 MCS: a broad- host range cloning vector. Biotechniques. 1994; 16: 800-802.
110. Kovach M.E; Elzer P.H; et al .Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBRIMCS. Carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene . 1995; 166: 175-176.
111. Jumas-BilakE; Characon M.S; et al .Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus Brucella. Mol. Microbiol 1998; 27: 99-106.
112. Wattman A.R; Williams K.P; et al .Analysis of ten Brucella genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. J.Bacteriol. 2009; 191: 3569-3579.
113. Selcuk. Klic; Ivan N.Ivanov; et al. MLVA Genotyping of human Brucella isolates from turkey J. clin. Microbiol. 2011; 10: 1128-1149.
114. Scholz. J.C ;and Vergnaud G; Molecular characterization of Brucella species Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz. 2013; 321) 149-162.
115. Vizcaino N; Cloeckaert A; et al. Charaterzation of a Brucella species 25 KDa DNA fragment deleted from B.abortus reveals a large gene cluster related to the synthesis of a polysaccharide. Infect. Immunol. 2001; 69: 6738-6748.
116. Brions G; de la nino. I.N; et al. Brucella abortus cyclic B1 2- glucan mutant have reduced viruknce in mice and are defective in intracellular replication in hela cells. Infect. Immunol. 2001; 69: 4528-4538.
117. De lannino. I.N; Briones G; et al. Molecular cloning and characterization of cgs the B.abortus cyclic B1-2) glucansynthetase gene: genetic complementation of Rhizobium meliloti ndv B and agrobaeterium tumefociens chr B mutants.J.Baeteriol. 1998; 180: 4392-4400.
118. Halling S.M; and Zehr E.S; Polymorphism in Brucella spp. due to highly repeated DNA. J.Bacteriol. 1990; 172: 6637-6640.
119. Halling S.M; and Bricker B.J; Characterization and occurrence of two repeated palindromic DNA elements of Brucella spp.Bru-RS1 and Bru-RS2. Mol. Microbio. 1994; 14 681-689.
120. Halling S.M;Tatum F.M; et al .Sequence and characterization of an insertion sequence IS711. from Brucella ovis. Gene. 1993; 133: 123-127.
121. Ouahrani A; Michaux S; et al .Identification and sequence analysis of IS6501 an insertion sequence in Brucella spp. relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. J.Gen. Mirobiol. 1993; 139: 3265-3273.
122. Ocampo-Sosa A; and Garcia-lobo J.M; Demonestration of IS711 trasposition in Brucella ovis and B.pinnipedialis.BMC Microbiology. 2008; 8:17.
123. Brikcer B.J; and Halling S.M; Differentiation of B. abortus bv.1.2 and 4 B.melitensis B.ovis and B.sius bv.1 by PCR.J.Clin. Microbial. 1994; 32: 2660-2666.
124. Bricker B.J; and Halling S.M; Enhancement of the Brucella AMOS PCR assay for the differentiation of B.abortus vaccine strain S.19 and RB51.J. Clin. Microbial 1995; 33: 1640-1642.
125. Ewalt D.R; an Bricker B.J; Validation of the abbreviated Brucella AMOS PCR as a rapid scereening method for differentiation of B.abortus field strain isolates and the vaccine strains 19 and RB51. J.Clin. Microbial. 2000; 38: 3085-3086.
126. Bricker B.J; Ewalt D.R; Evaluation of the Brucella abortus species – specific polymerase chain reaction assay an improved version of the Brucella AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. J.vet. Diag . Invest. 2003; 15: 374-378.
127. De Ley J; Mannheim W; et al. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of Brucella and CDC group Vd. Int. Sys. Bacterial. 1987; 37:35-42.
128. Stackebrandt E; Murray R.G; et al. Proteobacteria classis nov. a name for the phylogenetic taxon that includes the purple bacteria and their relatives. Int.J. Sys. Bateriol . 1998; 38: 321-325.
129. Dorsch M; Moreno E; et al. Nucleotide sequence of the 16s-rRNA from Brucella abortus Nucleic acids .Res. 1989; 17: 1765.
130. Moreno E; Stacke brands E; et al. Brucella abortus 16s-rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class proteobacteria.J. Bacteriol. 1990; 162: 3569-3579.
131. Holmes B; Poppoff M;et al. Ochrobactrum anthropic gen. nov.sp.nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd.int.J.Sys Bacterial. 1998; 38: 406-416.
132. Velasco J; RomeroC; et al .Evaluation of the relatedness of Brucella spp. and ochrobacterum anthropic and description of O. intermedium sp.nov. a new species with a closer relationship to Brucella spp.Int.J.Syst. Bacterio. 1998; 48: 759-768.
133. Sierra R;Comerci D.J;et al .A homologue of an operon required for DNA transfer in agrobacterium is required in Brucella abortus for virulence and intracellular multiplication. J. Bacteriol . 2000; 182: 4849-4855.
134. Scholz H.C; Dahouk S; et al. Genetic diversity and phylogenetic relationships of bacteria belonging to the Ochrobactrum-Brucella group by rec A and 16S-rRNA gene-based comparative sequence analysis. Syst.Appl. Microbiol. 2008; 31:1-16.
135. Gevers D; CohanF.M; et al .Opinion re-evaluating prokaryotic species. Nat. rev. 2005; 3: 733-739.
136. PappasG; Papadimitrion P; et al. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect. Dis. 2006; 6:91-99.

137. Barquero- Calvo E;Code-Alvarez R; et al.The differential interaction of Brucella and Ochrobactrum with innate immunity reveals traits related to the evolution of stealthy pathogens . PLOS ONE. 2009; 46): e 5893.
138. Gee J.E; De B.K; et al.Use of 16S-rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of Brucella isolates. J. Clin. Microbial 2004; 42: 3649-3654.
139. Renoux G; La notion despec dans le genre Brucella. Ann. Inst. Pasteur paris). 1958; 94: 179-206.
140. Meyer M; and Cameron H.S; Metabolic characterization of the genus Brucella: 1- statistical evaluation of oxidative rates by which type 1 of each species can be identified.J. Bacterial. 1961a; 82: 387-395.
141. MeyerM and Cameron H; M.C.G.B.: II-oxidative metabolic patterns of described biotypes. J.Bacteriol. 1961b; 82: 396-400.
142. MeyerM; Characterization of genus Brucella: IV-correlation of oxidative metabolic pattern and phage susceptibility: 1961; 82: 950-953.
143. Morgan W.B; The examination of Brucella cultures for lysis by phage: J.Gen. Microbial. 1963; 30: 437-443.
144. Lepez- Goffi I; Garcia- Yoldi D ; Evaluation of a multiple PCR assay Brucellaladder) for molecular typing of all Brucella species including the vaccine strains. J. Clin. Microbiol. 2008) 46: 3484-3487.
145. Mayer-Scholl A; Dreager A; et al. Adavacement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described Brucella species. J. Microbiol. Methods. 2010; 80: 112-114.
146. Al Dahouk S; Le Fleche P; et al. Evaluation of Brucella MLVA typing for human brucellosis . J. Microbiol. Methods 2007; 69: 137-145.