

تشخیص مولکولی باکتری مولد بروسلوز، جداشده از بیماران مبتلا به تب مالت توسط بررسی ژن‌های omp25 و trpE با کمک PCR

نویسندگان: محمد ارجمندزادگان^۱، طاهره ناجی^۲، یوسف علیخانی^۳، مصطفی صابریان^۴، علی کمربندی شراه^{۵*}

۱. استادیار گروه میکروبی‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های سل و عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران
۲. استادیار گروه سلولی و مولکولی، گروه سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران، ایران
۳. دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران
۴. کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
۵. کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران، ایران

E-mail: ali_ksh2010@yahoo.com

* نویسنده مسئول: علی کمربندی شراه

چکیده

مقدمه و هدف: بیماری تب مالت یا بروسلوز، نوعی بیماری مشترک میان انسان و دام است. امروزه برای تشخیص بروسلوز، چندین تست سرولوژیک وجود دارند که انجام هر یک از این تست‌ها با محدودیت‌هایی همراه است. هدف از این مطالعه، استفاده از PCR با توجه به ژن‌های omp25 و trpE به منظور بررسی مولکولی در افراد مبتلا به بروسلوز است.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر، ۳۰ سویه کلینیکی مورد بررسی قرار گرفتند. تمام افراد مورد مطالعه دارای تست‌های ایمونولوژیک مثبت از قبیل رایت و کومبس رایت بودند. نمونه‌ها در محیط کشت خون (BACTEC) و دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت پنج روز انکوبه و پس از آن روی محیط بروسلا آگار به مدت سه روز کشت داده شدند؛ از کلنی‌های حاصل برای استخراج DNA توسط کیت استفاده شد. DNA استخراج‌شده به عنوان الگو برای تشخیص دقیق سویه‌های باکتریایی با کمک پرایمرهای اختصاصی ژن‌های omp25 و trpE در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از واکنش تکثیر و وجود باندهای ۴۸۶ و ۴۹۰ جفت بازی مربوط به ژن‌های omp25 و trpE نشان‌دهنده صحت پرایمرهای طراحی شده بود؛ با تکثیر این قطعات جنس باکتری بروسلا به صورت اختصاصی شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که با تکثیر نواحی خاص از ژن‌های omp25 و trpE که جزء ژن‌های حفاظت‌شده جنس بروسلا هستند، شناسایی باکتری بروسلا توسط روش PCR امکان‌پذیر خواهد بود.

واژگان کلیدی: بروسلا، تب مالت، روش مولکولی، PCR، روش مکمل

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ویکم-شماره ۱۱۰
اردیبهشت ۱۳۹۳

دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۱
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۳/۰۱/۲۳
پذیرش: ۱۳۹۳/۰۱/۲۶

مقدمه

بروسلوز، نوعی بیماری ژئونوز بوده که علاوه بر انسان می‌تواند طیفی وسیع از دام‌ها و نیز حیوانات وحشی را درگیر کرده، با ایجاد سقط‌های خودبه‌خودی در دام آلوده از طریق کاهش زادوولد آنها، خسارتی هنگفت به اقتصاد جامعه تحمیل کند (۱). در انسان، بروسلوز یک بیماری سیستمیک بوده که می‌تواند ارگان‌ها و نسوج زیادی را تحت تأثیر قرارداد و یک‌سری علائم غیراختصاصی ایجاد کند (۲). گونه‌های بروسلا در بدن حیوانات مختلف از جمله دام‌ها زندگی می‌کنند و انسان به‌طور عمده به‌صورت تصادفی از طریق تماس با دام‌های آلوده یا مصرف فرآورده‌های لبنی آنها آلوده می‌شود (۳). بروسلاها باکتری‌های گرم منفی، بدون اسپور و غیرمتحرک هستند که قادرند به‌صورت اختیاری و داخل سلولی زندگی کنند (۴). از شش گونه بروسلا تنها چهار گونه آن برای انسان بیماری‌زا بوده، قادرند در انسان، عفونت ایجاد کنند (۵). با توجه به اینکه عفونت‌های بروسلوز به‌طور عمده، غیراختصاصی هستند، تشخیص آنها اغلب بر مبنای یافته‌های آزمایشگاهی انجام می‌شود (۵). از آنجاکه تشخیص مستقیم عامل عفونت در نمونه‌ها، زیاد امکان‌پذیر نیست، اغلب در این گونه شرایط از آزمایش‌های غیرمستقیم مبتنی بر روش‌های سرولوژیک استفاده می‌شود (۶ و ۱). امروزه چند تست سرولوژیک وجود دارند که آزمایشگاه‌های مختلف از آنها برای تشخیص بروسلوز استفاده می‌کنند؛ با این حال هر یک از این تست‌ها از جنبه‌های مختلف با مشکلات و تنگناهایی مواجه‌اند که روی هم رفته، استفاده از آنها را محدود می‌سازند (۵). پیشرفت‌های اخیر در بیولوژی مولکولی به تشخیص سریع و دقیق بسیاری از عوامل عفونی، کمک‌هایی شایان کرده‌است. روش PCR، ردیابی و تشخیص باکتری‌ها و به‌خصوص باکتری‌های کند رشد و پرمشکل را تسهیل کرده، به کمک آن امکان تمایز میان گونه‌ها و سویه‌ها نیز فراهم شده‌است (۵)؛ در سالیان اخیر از این روش برای تشخیص جنس بروسلا و

گونه‌های آن به‌صورت اختصاصی استفاده شده‌است (۱۳ و ۱۴)؛ برای این منظور با استفاده از پرایمرهایی که بر اساس سکانس‌های مختلف موجود در ژنوم بروسلا طراحی شده‌بودند، ست‌های مختلف PCR مورد استفاده قرار گرفتند؛ از جمله سکانس ژن *trpE* که آنزیم آنترنیلات سنتتاز را در مسیر تولید تریپتوفان کد می‌کند و ژن *omp25* که یک پروتئین ۲۵ کیلو دالتونی را برای غشای خارجی بروسلا کد می‌کند (۱۴). با توجه به موارد یادشده و مشکلاتی که روش‌های سرولوژیکی متداول در تشخیص بروسلا دارند، امروزه توجه محققان به روش‌های مولکولی به‌ویژه روش PCR جلب شده‌است (۱۳)؛ برای این منظور با استفاده از پرایمرهایی که بر اساس دو سکانس مورد نظر در ژنوم بروسلا طراحی شده‌بودند، ست‌های مختلف PCR مورد استفاده قرار گرفتند (۱۳)؛ یکی از این سکانس‌ها برای ژن *trpE* با طول ۴۸۶ جفت باز و سکانس دیگر برای ژن *omp25* با طول ۴۹۰ جفت باز که هر دو، اساس طراحی جفت پرایمرهای مدنظر قرار گرفتند؛ با توجه به موارد یادشده بر آن شدیم تا تشخیص بروسلوز را با توجه به ژن‌های مذکور بررسی کنیم.

مواد و روش کار

تهیه نمونه: در این طرح، ۳۰ سویه کلینیکی بروسلا که بر اساس استانداردهای میکروبی شناسی تأیید شده‌بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی نمونه‌ها از افراد با سرولوژی مثبت گرفته شده‌بودند که در نهایت از کلنی‌های به‌دست آمده در محیط‌های کشت بروسلا آگار برای استخراج ژنوم استفاده شد در این طرح، جنسیت مرد یا زن بودن، اهمیتی نداشت.

کشت و تست‌های تأییدی: از هر ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون گرفته شده، ۵ میکرولیتر آن بی‌درنگ به سیستم محیط کشت BACTEC اضافه شده، به ۵ میلی‌لیتر دیگر آن، EDTA اضافه شد و برای استخراج DNA در دمای ۲۲- درجه نگهداری شد. محیط‌های BACTEC در دمای

استفاده شد. کلنی‌ها از افراد بیمار با سرولوژی مثبت از قبیل تست رایت مثبت به دست آمدند. استخراج DNA با استفاده از روش کیت INVITEK(GERMANY) صورت پذیرفت. صحت وجود DNA در استخراج، توسط دستگاه اسپکتوفوتومتری به اثبات رسید.

انجام PCR: پرایمرهای مورد نظر برای دو ژن omp25 و trpE، انتخاب و سفارش داده شدند (۱۴). پرایمرهای انتخاب شده در جدول ۱ مشاهده می‌شوند.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده و اندازه طول آنها (۱۴)

Locus	Primer sequences	Length
trpE	F:5' GCGCGCMTGGTATGGCG 3' R:5' CKCSCCGCCATAGGCTTC 3'	486 bp
omp25	F:5' ATGCGCACTCTTAAGTCTC 3' R:5' GCCSAGGATGTTGTCCGT 3'	490 bp

ژنی، فقط در گونه‌های مختلف جنس بروسلا با Max ID مشاهده می‌شوند؛ سپس پرایمرها در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفتند؛ بدین منظور، ترکیب واکنش PCR و Program Amplification طراحی شد؛ سپس با توجه به TM پرایمرها دمای Annealing و Program PCR به صورت جدول ۲ طراحی شدند.

۳۷ C برای ۷ تا ۳۰ روز انکوبه شدند؛ پس از زمان مورد نظر، هر نمونه روی یک پلیت حاوی بروسلا آگار کشت داده شد. پس از کشت، یک سری از پلیت‌ها در شرایط هوازی و یک سری دیگر در شرایط کم‌هوازی انکوبه شدند. کلنی‌های رشد کرده از لحاظ شکل، رنگ آمیزی گرم و اوره آز بررسی شدند.

استخراج DNA: در این مورد برای استخراج DNA از کلنی‌های رشد داده شده در محیط بروسلا آگار

طی این روش از پرایمرهای اختصاصی یاد شده در جدول ۱ برای ژن trpE که آنزیم آنترنیلات سنتاز را در مسیر تولید تریپتوفان کد می‌کند و برای ژن omp25 که یک پروتئین ۲۵ کیلودالتونی را برای غشای خارجی بروسلا کد می‌کند، استفاده شد؛ برای اثبات این مسئله که ژن‌های مورد بحث، قابلیت استفاده به عنوان تشخیصی به صورت Genus Specificity را دارند، از Blast استفاده شد؛ نتیجه Blast مشخص کرد که این ترادف‌های

جدول ۲. برنامه PCR مورد استفاده در تشخیص جنس بروسلا

سیکل	درجه گرما (سیلسیوس)	زمان
اول	۹۴	۴ دقیقه
دوم	۹۴	۱ دقیقه
	۵۵	۱ دقیقه
سوم	۷۷	۵۰ ثانیه
	۷۲	۱۰ دقیقه

نوع و مقدار مواد مصرفی در PCR نیز در جدول شماره ۳ آورده شده است.

جدول ۳. نوع و مقدار مواد مصرفی در PCR

نوع ماده	H2O	Master mix	DNA	Primer F	Primer R
مقدار	6μL	12.5μL	2.5μL	2μL	2μL
مقدار کل	25μL				

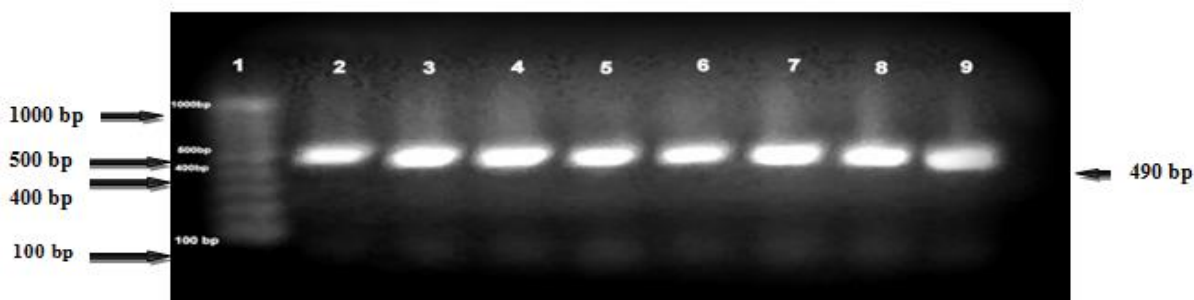
کمک الکتروفورز روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرارگرفت.

درنهایت، برنامه PCR با چندبار آزمون و خطا برای دستیابی به بهترین باندها اجراشد؛ سپس محصول PCR با

نتایج

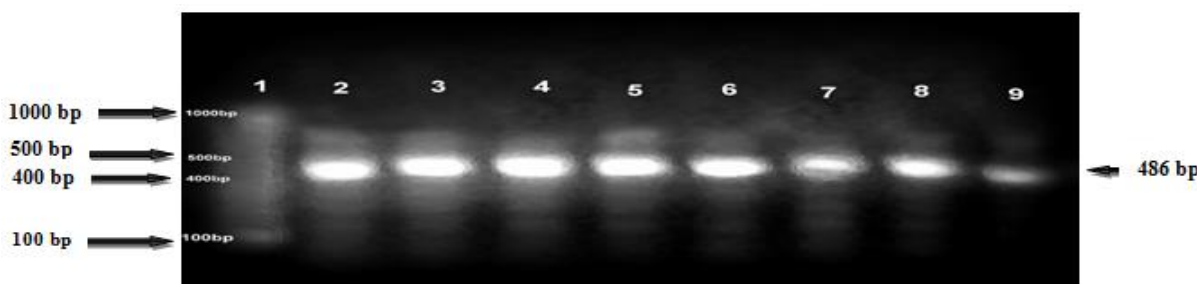
تخلیص شده سویه‌های استاندارد بروسلا انجام گرفت. در شکل ۱، محصول PCR با استفاده از ژن omp25 با طول ۴۹۰ جفت باز مشاهده می‌شود.

در این طرح، ۳۰ سویه کلینیکی بروسلا که براساس استانداردهای میکروبی‌شناسی تأیید شده بودند، برای استخراج DNA مورد استفاده قرارگرفتند؛ همچنین بهینه‌سازی آزمایش PCR و پرایمرهای مورد نظر با ژنوم



شکل ۱. محصول PCR برای ژن omp25، شماره ۱ مارکر DNA با طول ۱۰۰۰ جفت باز، شماره ۲ تا ۹ محصول PCR با طول ۴۹۰ جفت باز

در شکل ۲، محصول PCR با استفاده از ژن trpE با طول ۴۸۶ جفت باز مشاهده می‌شود.



شکل ۲. محصول PCR برای ژن trpE، شماره ۱ مارکر DNA با طول ۱۰۰۰ جفت باز، شماره ۲ تا ۹ محصول PCR با طول ۴۸۶ جفت باز

PCR تشخیص دهند؛ همچنین گزارشی مبنی بر تشخیص بیماری بروسلوز به وسیله ژن trpE در ایران یافت نشد.

با توجه به محصولات PCR، هر دو ژن یادشده توانستند به طور اختصاصی، جنس بروسلا را با روش

بحث

بیماری‌های دیگر همچون مالاریا، تیفوئید و... اشتباه گرفته شود (۲)؛ همچنین بروسلوز، موجب ضررهای اقتصادی زیادی در جهان شده است. سازمان بهداشت جهانی، آمار مبتلایان جدید به بروسلوز را در هر سال بیش از ۵۰۰ هزار نفر اعلام کرده است (۳ و ۵)؛

بروسلوز، بیماری حیوانات اهلی و وحشی است که می‌تواند از طرق مستقیم و غیرمستقیم به انسان نیز منتقل شود (۱). علایم و نشانه‌های بروسلوز انسانی، اختصاصی نیستند؛ درحقیقت، تشخیص بروسلوز نمی‌تواند براساس نشانه‌های بالینی باشد، زیرا می‌تواند با

نیاز دارد و اگرچه بسیاری از تست‌های سرولوژیک و روش‌های کشت خون خودکار در تشخیص بروسلوز توسعه یافته‌اند، هنوز مشکلاتی برجسته در تشخیص این بیماری وجود دارند (۱۳)؛ علاوه بر مشکلات یادشده، کارکردن با این ارگانیزم، خطری برای انتقال ارگانیزم به کارکنان آزمایشگاه محسوب می‌شود، بنابراین بیماری بروسلوز، یکی از شایع‌ترین علت‌های شناخته شده انتقال عفونت‌های آزمایشگاهی است و ۲ درصد از کل موارد بروسلوز از آزمایشگاه ایجاد می‌شوند (۱۳ و ۱۴). نکته‌ای مهم که در اینجا قابل اشاره است اینکه حساسیت‌های کشت خون گستره‌ای از ۵۲ درصد تا ۹۰ درصد دارند، درحالی‌که مثبت بودن کشت خون به میزان قابل توجهی در اشکال مزمن و کانونی این بیماری کاهش می‌یابد؛ همچنین روش‌های سرولوژیکی آنچنان‌که گفته شد اختصاصیت ندارند و تیتراهای آنتی‌بادی، اغلب برای یک دوره طولانی پس از درمان، حتی در موارد پوشش کامل بیماری، مثبت باقی می‌مانند (۱۳)؛ این مطلب، بیانگر آن است که اگر شخصی دارای بیماری بروسلوز باشد، پس از یک هفته، تیترا آنتی‌بادی آن بالایی رود و ممکن است برای یک دوره طولانی بالا باقی بماند؛ حال اگر این شخص به طور کامل در عرض چند هفته درمان شود، باز هم تست سرولوژیکی این شخص، مثبت خواهد شد که این امر، ضعف روش‌های سرولوژیکی را نمایان می‌کند؛ همچنین تست سرولوژیکی در اوایل بیماری به دلیل نبود تیترا آنتی‌بادی کافی، منفی خواهد شد در صورتی‌که شخص به بیماری بروسلوز مبتلاست. یکی از ویژگی‌های اصلی بروسلوز، این است که خطر عود بیماری، حتی پس از درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب بالا باقی می‌ماند و روش‌های سرولوژیکی متداول مورد استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، قادر نیستند حالت عود بیماری بروسلوز را تشخیص دهند (۱۳).

در این میان روش PCR، روشی سریع و اختصاصی در تشخیص بروسلوز است. روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز که در دهه اخیر گسترشی قابل توجه یافته است از جمله روش‌هایی است که دارای مزایای بسیاری بوده،

تشخیص متداول این بیماری براساس آزمایش‌های سرولوژیک استوار است (۱۳). اگرچه برترین روش، جداکردن ارگانیزم است، درعمل، محدودیت‌های زیادی هم دارد. در غیاب کشت‌های مثبت بروسلوز، تشخیص اغلب به وجود پادتن در سرم، شیر، ترشح‌های واژن و مایع منی بستگی دارد (۱۳)؛ بنابراین روش‌های سرولوژیک به‌عنوان یک نشانه غیرمستقیم در تشخیص مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ اگرچه حضور پادتن نیز نمی‌تواند همیشه به‌عنوان یک نمونه فعال بروسلوز تلقی شود و باید واکنش متقاطع در حضور سایر بیماری‌های عفونی نیز مورد توجه قرار گیرد (۵). اهمیت بیماری و وجود روش‌های مختلف برای تشخیص آن سبب شده است که محققان همواره به دنبال به دست آوردن راهی برای تشخیص سریع و دقیق بیماری باشند. انتقال بروسلوز از طریق شیر، متداول‌ترین روش اشاعه بیماری محسوب می‌شود. بیشتر دام‌های آلوده از راه شیر، میکروب بروسلا را دفع می‌کنند؛ با این حال، اغلب، تعداد باکتری بروسلا در اواخر دوره شیردهی بیشتر است (۴). اگرچه جداسازی و شناسایی باکتری بروسلا تاکنون به‌عنوان معتبرترین و دقیق‌ترین روش تشخیص به‌شمار می‌آید، این روش با محدودیت‌هایی همانند «آنکوباسیون کشت طولانی، پاسخ مثبت طی چهار تا شش روز و در مواردی تا دو هفته و بیشتر و در ۲ درصد موارد پس از ۲۷ روز نتیجه مثبت دادن»، روبه‌روست (۱۳)؛ تأیید هویت کلنی پس از صرف زمان لازم برای کشت و نیاز به مواد غذایی خاص با شرایط آزمایشگاهی ویژه، از جمله محدودیت‌های دیگر این روش است. ضمن آنکه در بهترین شرایط و با استفاده از تمام مقدمات، محیط‌های کشت فقط درصد کمی از جمعیت میکروبی یک نمونه قادر به رشد می‌باشد و تکرارپذیری آن نیز با توجه به محیط‌های کشت همواره قابل انجام نیست (۵)؛ همچنین تصویر بالینی از بروسلوز تنها نمی‌تواند همیشه به تشخیص منجر شود، از آنجاکه علائم، غیراختصاصی و اغلب غیرمعمولی هستند، تشخیص به‌حمایت با استفاده از تست‌های آزمایشگاهی

حساسیت این دو ژن را برای جنس بروسلا ۱۰۰ درصد یافتیم. در تحقیقی که به سال ۱۳۸۵، قوسیان مقدم و همکارانشان در خصوص مقایسه روش‌های کشت و سرولوژی با PCR انجام دادند، حساسیت PCR را ۵۸ درصد اعلام کرده بودند که به احتمال به دلیل نوع نمونه‌گیری یا عدم انتخاب ژن‌های مناسب مخصوص بروسلا بوده است (۵)؛ همچنین در تحقیق حسینی دوست و همکارانشان که در سال ۱۳۸۴ با موضوع ارزیابی تشخیص بروسلا آپورتوس با PCR و مقایسه آن با روش کشت صورت گرفته است، حساسیت PCR را ۶۰ درصد اعلام کرده‌اند که به احتمال به دلیل حساسیت پایین پرایمرهای انتخاب شده بوده است (۲). نکته‌ای مهم که در اینجا شایان است اینکه تاکنون گزارشی از ژن *trpE* برای تشخیص جنس بروسلا در ایران مشاهده نشده است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شد؛ همچنین از مسئولان دانشگاه علوم پزشکی همدان به ویژه جناب آقای دکتر علیخانی که در انجام این تحقیق ما را یاری فرمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Peiri H, Maleknejad P. Comparison of serum and whole blood sample PCR for diagnosis of human brucellosis in Iran. eleventh congress of Microbiology , Iran, Gilan 2010:20-23.
2. Hosseini dost R, Ahmadi A, Ahmadi Z, et al. PCR Detection of brucellosis abortus and comparison with culture techniques., the university of Baghiatollah 2005; NO.7:234-239.
3. Baily GG, krahnjB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of brucella melitensis and brucella abortus by DNA amplification, The Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1992;95(4): 271-275.
4. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of brucella abortus bio 1,2 and 4 , B.melitensis , B.ovis and B.suis bio 1 by PCR, Journal of Clinical Microbiology 1994; 32(11): 2660-2666.
5. Dictrich D, Voigt M. The laboratory diagnosis of brucellosis, pathology that adds value, Path Care 2008,45:1-2.
6. Leal-klevezas DS, Martinez I, Lopez A, Martinez JP. Single-step PCR for detection of brucella spp from blood and milk of infected animals. Journal of Clinical Microbiology 1995;33(12): 3087-3090.
7. Mantnr BG, Amaranth SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis , Indian Journal of Medical Microbiology 2007; 25(2): 188-202.
8. Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R. Genetic bases of the Rifampin Resistance Phenotype in

ناحدودی، محدودیت‌های موجود در کشت را برطرف می‌کند؛ با استفاده از این روش در کمتر از یک روز می‌توان عامل بیماری‌زا را مشخص کرد. ویژگی و حساسیت بالای روش PCR می‌تواند به عنوان ابزاری با ارزش برای تشخیص بروسلوز در نظر گرفته شود. قدرت و قابلیت تکرار در زمان‌ها و مراکز مختلف، سادگی و سرعت قابل انجام و از همه مهم‌تر، عدم واکنش متقاطع با باکتری‌های منصوب و قدرت تشخیص عامل عفونی در نمونه‌های مختلف مرضی و محیطی، به ویژه در موارد عود مجدد بیماری، کم‌خطر بودن برای کارکنان آزمایشگاه و نیاز به حداقل داشتن نمونه از جمله مزیت‌های این روش هستند؛ البته مهم‌ترین محدودیت آن، حساسیت بالای PCR است که بایستی مراقبت شدید به ویژه از نظر آلودگی نمونه‌ها به عمل آید (۱۳).

در این تحقیق از مجموع ۳۰ نمونه کشت شده سویه‌های استاندارد بروسلا، PCR توانست هر ۳۰ مورد را با توجه به پرایمرهای ژن‌های *omp25* و *trpE* مثبت ارزیابی کند که معادل ۱۰۰ درصد نمونه‌هاست. با توجه به ژن‌های انتخاب شده در این تحقیق برای تشخیص جنس بروسلا و با توجه به اختصاصی بودن این دو ژن برای جنس بروسلا، ما در این تحقیق نشان دادیم که با استفاده از این دو ژن می‌توان به طور اختصاصی با استفاده از روش PCR، جنس بروسلا را تشخیص داد؛ ما

- brucella spp, Journal of Clinical Microbiology 2004;42: 5439-5443.
9. Martinez G, Pizarro J, Moreno E, Moriyon I. The outer membranes of brucella Are resistant to bactericidal cationic peptides, Infection and Immunity 1995;63: 3054-3061.
10. Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A. Evaluation of Different PCR Assays for Early Detection of Acute and Relapsing Brucellosis in Humans in Comparison with Conventional Methods, Journal of Clinical Microbiology 2007; 45: 1211-1218.
11. Imaoka K, Kimura M, Suzuki M, Kamiyama T, Yamada A. Simultaneous Detection of the Genus Brucella by Combinatorial PCR, Japanese Journal of Infectious Diseases 2007; 60(2-3): 137-139.
12. Richtzenhain LJ, Cortez A, Heinemann MB, Soares RM, Sakamoto SM, Vasconcelos SA, et al. A multiplex PCR for the detection of Brucella spp .and Leptospira spp DNA from aborted bovine fetuses. Veterinary Microbiology 2002;87(2): 139-147.
13. Romero C, Gamazo M. Pardo I, Lopez G. Specific detection of Brucella DNA by PCR. Journal of Clinical Microbiology 1995;33: 615-617.
14. Whatmore A, Perrett L, MacMillan A. Characterisation of the genetic diversity of Brucella by multilocus sequencing, BMC Microbiology [electronic resource 2007;80: 7-34.

Molecular diagnosis of brucellosis-causing bacteria isolated from patients with brucellosis with the help of trpE and omp25 genes by PCR

Mohammad Arjmandzadegan¹, Tahere Naji², Yousef Alikhani³, Mostafa Saberian⁴, Ali Kamarbandi sharah^{5*}

1. Tuberculosis and Pediatric Infection Disease Reserch Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

2. Cell and Molecular Biology Department, Pharmaceutical Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3. Pediatric Infection Disease Research Center, Hamedan University of Medical Sciences, Hmedan, Iran.

4. School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5. Master of science, cell and mollecular biology Department, Pharmaceutical science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

E-mail: ali_ksh2010@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Brucellosis is a zoonotic disease in humans and animals. Nowadays, several serological tests for brucellosis diagnosis are available but all of these tests have their own limits. The aim of the present study was to use PCR according to omp25 and trpE genes for the molecular analysis of the individuals with brucellosis.

Materials and Methods: In this study, 30 clinical isolates were studied. All the patients were diagnosed with positive immunological tests such as Wright and Coombs. Samples of blood were cultured (BACTEC) and incubated at 37 degrees Celsius for 5 days and then they were cultured for 3 days on Brucella agar. DNA was extracted from the colonies by Kit. The extracted DNA was used as template for accurate diagnosis of bacterial strains with gene-specific primers in PCR reactions omp25 and trpE.

Results: In this study, all the samples selected were seropositive from which the colonies were obtained. DNA extracted from the colonies by the use of kit was proved by spectrophotometer device. Also, the results of the amplification reaction and the amplified bands of 486 and 490 bp for omp25 and trpE genes indicate the validity of the primers. By reproduction of these components, the genus Brucella was specifically identified.

Conclusion: Using the PCR technique, on the contrary to the serological diagnostic methods, facilitates the tracing and identifying the bacteria, especially those with slow growth rate. In this research, the trpE gene which has been not used in the diagnosis of brucellosis in Iran was exploited. The results of this study indicate that by amplification of some specific regions of the omp25 and trpE genes which are belonged to the conserved parts of the genus Brucella, identifying the bacteria Brucella under PCR method is possible.

Keywords: Brucellosis, PCR, Molecular Method, Immunological, Complement method