دانشور
پزشکی

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

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

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[٤]، علی کمربندی شراه*[۵]

۱. استادیار گروه میکروب‌شناسی، 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

٤. کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

۵. کارشناس ارشد علوم سلولی و ملکولی، گروه سلولی و ملکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران، ایران

* نویسنده مسئول: علی کمربندی شراه E-mail: ali_ksh2010@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: بیماری تب مالت یا بروسلوز، نوعی بیماری مشترک میان انسان و دام است. امروزه برای تشخیص بروسلوز، چندین تست سرولوژیک وجوددارند که انجام هریک از این تست‌ها با محدودیت‌هایی همراه است. هدف از این مطالعه، استفاده از PCR با توجه به ژن‌های omp25 و trpE به‌منظور بررسی مولکولی درافراد مبتلا به بروسلوز است.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر، ۳۰ سویه کلینیکی مورد بررسی قرارگرفتند. تمام افراد مورد مطالعه دارای تست‌های ایمونولوژیک مثبت ازقبیل رایت و کومبس‌رایت بودند. نمونه‌ها در محیط کشت خون (BACTEC) و دمای۳۷ درجه سیلیسیوس به‌مدت پنج روز انکوبه و پس از آن روی محیط بروسلا آگار به‌مدت سه روز کشت‌داده‌شدند؛ از کلنی‌های حاصل برای استخراج DNA توسط کیت استفاده‌شد. DNA استخراج‌شده به‌عنوان الگو برای تشخیص دقیق سویه‌های باکتریایی با کمک پرایمرهای اختصاصی ژن‌های omp25 و trpE در واکنش PCR مورد استفاده قرارگرفت.

نتایج: نتایج حاصل از واکنش تکثیر و وجود باندهای ۴۸۶ و ۴۹۰ جفت بازی مربوط به ژن‌های omp25 و trpE نشان‌دهنده صحت پرایمرهای طراحی‌شده بود؛ با تکثیر این قطعات جنس باکتری بروسلا به‌صورت اختصاصی شناسایی‌شد.

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

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

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بروسلوز، نوعی بیماری زئونوز بوده که علاوه‌بر انسان می‌تواند طیفی وسیع از دام‌ها و نیز حیوانات وحشی را درگیرکرده، با ایجاد سقط‌های خودبه‌خودی در دام آلوده از طریق کاهش زادوولد آنها، خسارتی هنگفت به اقتصاد جامعه تحمیل‌کند (۱). در انسان، بروسلوز یک بیماری سیستمیک بوده که می‌تواند ارگان‌ها و نسوج زیادی را تحت تأثیر قرارداده و یک‌سری علایم غیراختصاصی ایجادکند (۲). گونه‌های بروسلا در بدن حیوانات مختلف ازجمله دام‌ها زندگی‌می‌کنند و انسان به‌طور عمده به‌صورت تصادفی از طریق تماس با دام‌های آلوده یا مصرف فراورده‌های لبنی آنها آلوده می‌شود (۳). بروسلاها باکتری‌های گرم منفی، بدون اسپور و غیرمتحرک هستند که قادرند به‌صورت اختیاری و داخل‌سلولی زندگی‌کنند (٤). از شش گونه بروسلا تنها چهار گونه آن برای انسان بیماری‌زا بوده، قادرند در انسان، عفونت ایجادکنند (۵). با توجه به اینکه عفونت‌های بروسلوز به‌طور عمده، غیراختصاصی هستند، تشخیص آنها اغلب برمبنای یافته‌های آزمایشگاهی انجام‌می‌شود (۵). ازآنجاکه تشخیص مستقیم عامل عفونت در نمونه‌ها، زیاد امکان‌پذیر نیست، اغلب در این گونه شرایط از آزمایش‌های غیرمستقیم مبتنی‌بر روش‌های سرولوژیک استفاده‌می‌شود(۱و٦). امروزه چند تست سرولوژیک وجوددارند که آزمایشگاه‌های مختلف از آنها برای تشخیص بروسلوز استفاده‌می‌کنند؛ بااین‌حال هریک از این تست‌ها از جنبه‌های مختلف با مشکلات و تنگناهایی مواجه‌اند که روی‌هم‌رفته، استفاده از آنها را محدودمی‌سازند (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 تسهیل‌کرده، 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 استفاده‌شده‌است (۱۳ و١٤)؛ برای این منظور با استفاده از پرایمرهایی که براساس سکانس‌های مختلف موجود در ژنوم بروسلا طراحی‌شده‌بودند، ست‌های مختلف PCR مورد استفاده قرارگرفتند؛ ازجمله سکانس ژن trpE که آنزیم آنترنیلات سنتتاز را در مسیر تولید تریپتوفان کدمی‌کند و ژن omp25 که یک پروتئین ۲۵ کیلو دالتونی را برای غشای خارجی بروسلا کدمی‌کند (١٤). با توجه به موارد یادشده و مشکلاتی که روش‌های سرولوژیکی متداول در تشخیص بروسلا دارند، امروزه توجه محققان به روش‌های مولکولی به‌ویژه روش PCR جلب‌شده‌است (۱۳)؛ برای این منظور با استفاده از پرایمرهایی که براساس دو سکانس مورد نظر در ژنوم بروسلا طراحی‌شده‌بودند، ست‌های مختلف PCR مورد استفاده قرارگرفتند (۱۳)؛ یکی از این سکانس‌ها برای ژن trpE با طول ٤٨٦ جفت باز و سکانس دیگر برای ژن omp25 با طول ٤۹۰ جفت باز که هر دو، اساس طراحی جفت پرایمرهای مدنظر قرارگرفتند؛ با توجه به موارد یادشده بر آن شدیم تا تشخیص بروسلوز را با توجه به ژن‌های مذکور بررسی‌کنیم.

مواد و روش کار

تهیه نمونه: در این طرح، ۳۰ سویه کلینیکی بروسلا که براساس استانداردهای میکروب‌شناسی تأییدشده‌بودند، مورد استفاده قرارگرفتند. تمامی نمونه‌ها از افراد با سرولوژی مثبت گرفته‌شده‌بودند که درنهایت از کلنی‌های به‌دست‌آمده در محیط‌های کشت بروسلا آگار برای استخراج ژنوم استفاده‌شد در این طرح، جنسیت مرد یا زن‌بودن، اهمیتی‌نداشت.

کشت و تست‌های تأییدی: از هر ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون گرفته‌شده، 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 نگهداری‌شد. محیط‌های BACTEC در دمای

Archive of SID

www.SID.ir

C ۳۷ برای ۷ تا ۳۰ روز انکوبه‌شدند؛ پس از زمان مورد نظر، هر نمونه روی یک پلیت حاوی بروسلا آگار کشت‌داده‌شد. پس از کشت، یک‌سری از پلیت‌ها در شرایط هوازی و یک‌سری دیگر در شرایط کم‌هوازی انکوبه‌شدند. کلنی‌های رشدکرده از لحاظ شکل، رنگ‌آمیزی گرم و اوره آز بررسی‌شدند.

استخراج DNA: در این مورد برای استخراج DNA از کلنی‌های رشدداده‌شده در محیط بروسلا آگار استفاده‌شد. کلنی‌ها از افراد بیمار با سرولوژی مثبت ازقبیل تست رایت مثبت به‌دست‌آمدند. استخراج DNA با استفاده از روش کیت INVITEK(GERMANY) صورت‌پذیرفت. صحت وجود DNA در استخراج، توسط دستگاه اسپکتوفوتومتری به‌اثبات‌رسید.

انجام PCR: پرایمرهای مورد نظر برای دو ژن omp25 و trpE، انتخاب و سفارش‌داده‌شدند (۱٤). پرایمرهای انتخاب‌شده در جدول ۱ مشاهده‌می‌شوند.

جدول۱. پرایمرهای مورد استفاده و اندازه طول آنها (۱٤)

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

طی این روش از پرایمرهای اختصاصی یادشده در جدول ۱ برای ژن trpE که آنزیم آنترنیلات سنتتاز را در مسیر تولید تریپتوفان کدمی‌کند و برای ژن omp25 که یک پروتئین ۲۵ کیلودالتونی را برای غشای خارجی بروسلا کدمی‌کند، استفاده‌شد؛ برای اثبات این مسئله که ژن‌های مورد بحث، قابلیت استفاده به‌عنوان تشخیصی به‌صورت Genus Specificity را دارند، از Blast استفاده‌شد؛ نتیجه Blast مشخص‌کرد که این ترادف‌های ژنی، فقط در گونه‌های مختلف جنس بروسلا با Max ID مشاهده‌می‌شوند؛ سپس پرایمرها در واکنش PCR مورد استفاده قرارگرفتند؛ بدین منظور، ترکیب واکنش PCR و Program Amplification طراحی‌شد؛ سپس با توجه به TM پرایمرها دمای Annealing و Program PCR به‌صورت جدول ۲ طراحی‌شدند.

جدول۲. برنامهٔ PCR مورد استفاده در تشخیص جنس بروسلا

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

نوع و مقدار مواد مصرفی در PCR نیز در جدول شماره ۳ آورده‌شده‌است.

جدول۳. 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				

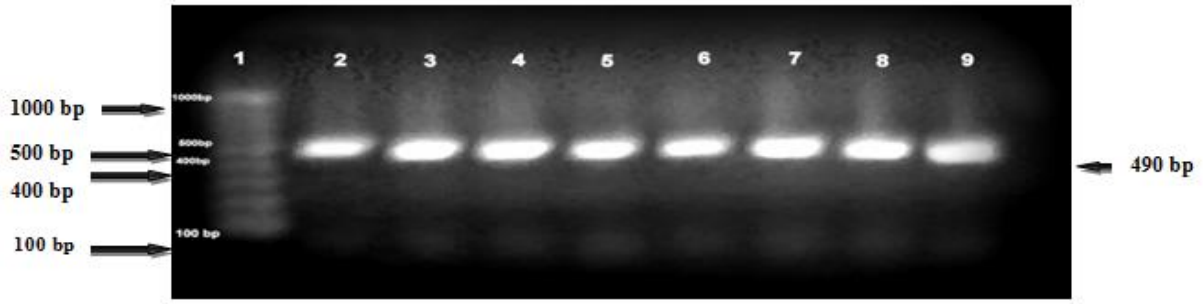
Archive of SID

www.SID.ir

درنهایت، برنامه PCR با چندبار آزمون و خطا برای دستیابی به بهترین باندها اجراشد؛ سپس محصول PCR با کمک الکتروفورز روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرارگرفت.

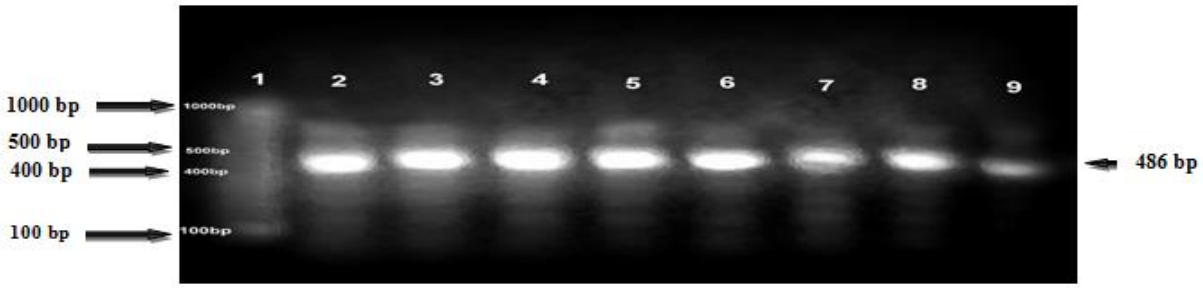
نتایج

در این طرح، ۳۰ سویه کلینیکی بروسلا که براساس استانداردهای میکروب‌شناسی تأییدشده‌بودند، برای استخراج DNA مورد استفاده قرارگرفتند؛ همچنین بهینه‌سازی آزمایش PCR و پرایمرهای مورد نظر با ژنوم تخلیص‌شده سویه‌های استاندارد بروسلا انجام‌گرفت. در شکل ۱، محصول PCR با استفاده از ژن omp25 با طول ٤٩٠ جفت باز مشاهده‌می‌شود.



شکل۱. محصول PCR برای ژن omp25، شماره ۱ مارکر DNA با طول ۱۰۰۰ جفت باز، شماره ۲ تا ۹ محصول PCR با طول ٤٩٠ جفت باز

در شکل ۲، محصول PCR با استفاده از ژن trpE با طول ٤٨٦ جفت باز مشاهده‌می‌شود.



شکل۲. محصول PCR برای ژن trpE، شماره ۱ مارکر DNA با طول ۱۰۰۰ جفت باز، شماره ۲ تا ۹ محصول PCR با طول ٤٨٦ جفت باز

با توجه به محصولات PCR، هر دو ژن یادشده توانستند به‌طور اختصاصی، جنس بروسلا را با روش PCR تشخیص‌دهند؛ همچنین گزارشی مبنی‌بر تشخیص بیماری بروسلوز به‌وسیله ژن trpE در ایران یافت‌نشد.

بحث

بروسلوز، بیماری حیوانات اهلی و وحشی است که می‌تواند از طرق مستقیم و غیرمستقیم به انسان نیز منتقل‌شود (۱). علایم و نشانه‌های بروسلوز انسانی، اختصاصی نیستند؛ درحقیقت، تشخیص بروسلوز نمی‌تواند براساس نشانه‌های بالینی باشد، زیرا می‌تواند با بیماری‌های دیگر همچون مالاریا، تیفوئید و... اشتباه‌گرفته‌شود (۲)؛ همچنین بروسلوز، موجب ضررهای اقتصادی زیادی در جهان شده‌است. سازمان بهداشت جهانی، آمار مبتلایان جدید به بروسلوز را در هر سال بیش از ۵۰۰ هزار نفر اعلام‌کرده‌است (۳ و۵)؛

www.SID.ir

تشخیص متداول این بیماری براساس آزمایش‌های سرولوژیک استوار است (۱۳). اگرچه برترین روش، جداکردن ارگانیسم است، درعمل، محدودیت‌های زیادی هم دارد. در غیاب کشت‌های مثبت بروسلوز، تشخیص اغلب به وجود پادتن در سرم، شیر، ترشح‌های واژن و مایع منی بستگی‌دارد (۱۳)؛ بنابراین روش‌های سرولوژیک به‌عنوان یک نشانهٔ غیرمستقیم در تشخیص مورد استفاده قرارمی‌گیرند؛ اگرچه حضور پادتن نیز نمی‌تواند همیشه به‌عنوان یک نمونهٔ فعال بروسلوز تلقی‌شود و باید واکنش متقاطع در حضور سایر بیماری‌های عفونی نیز مورد توجه قرارگیرد (۵). اهمیت بیماری و وجود روش‌های مختلف برای تشخیص آن سبب‌شده‌است که محققان همواره به‌دنبال به‌دست‌آوردن راهی برای تشخیص سریع و دقیق بیماری باشند. انتقال بروسلوز از طریق شیر، متداول‌ترین روش اشاعهٔ بیماری محسوب‌می‌شود. بیشتر دام‌های آلوده از راه شیر، میکروب بروسلا را دفع‌می‌کنند؛ بااین‌حال، اغلب، تعداد باکتری بروسلا در اواخر دورهٔ شیردهی بیشتر است (٤). اگرچه جداسازی و شناسایی باکتری بروسلا تاکنون به‌عنوان معتبرترین و دقیق‌ترین روش تشخیص به‌شمارمی‌آید، 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، ازجمله محدودیت‌های دیگر این روش است. ضمن آنکه در بهترین شرایط و با استفاده از تمام مقدورات، محیط‌های کشت فقط درصد کمی از جمعیت میکروبی یک نمومه قادر به رشد می‌باشد و تکرارپذیری آن نیز با توجه به محیط‌های کشت همواره قابل‌انجام نیست (۵)؛ همچنین تصویر بالینی از بروسلوز تنها نمی‌تواند همیشه به تشخیص منجرشود، ازآنجاکه علایم، غیراختصاصی و اغلب غیرمعمولی هستند، تشخیص به حمایت با استفاده از تست‌های آزمایشگاهی نیازدارد و اگرچه بسیاری از تست‌های سرولوژیک و روش‌های کشت خون خودکار در تشخیص بروسلوز توسعه‌یافته‌اند، هنوز مشکلاتی برجسته در تشخیص این بیماری وجوددارند (۱۳)؛ علاوه‌بر مشکلات یادشده، کارکردن با این ارگانیسم، خطری برای انتقال ارگانیسم به کارکنان آزمایشگاه محسوب‌می‌شود، بنابراین بیماری بروسلوز، یکی از شایع‌ترین علت‌های شناخته‌شدهٔ انتقال عفونت‌های آزمایشگاهی است و ۲ درصد از کل موارد بروسلوز از آزمایشگاه ایجادمی‌شوند (۱۳ و١٤). نکته‌ای مهم که در اینجا قابل‌اشاره است اینکه حساسیت‌های کشت خون گستره‌ای از ۵۲ درصد تا ۹۰ درصد دارند، درحالی‌که مثبت‌بودن کشت خون به میزان قابل‌توجهی در اشکال مزمن و کانونی این بیماری کاهش‌می‌یابد؛ همچنین روش‌های سرولوژیکی آنچنان‌که گفته‌شد اختصاصیت‌ندارند و تیترهای آنتی‌بادی، اغلب برای یک دورهٔ طولانی پس از درمان، حتی در موارد پوشش کامل بیماری، مثبت باقی‌می‌مانند (۱۳)؛ این مطلب، بیانگر آن است که اگر شخصی دارای بیماری بروسلوز باشد، پس از یک هفته، تیتر آنتی‌بادی آن بالامی‌رود و ممکن است برای یک دورهٔ طولانی بالا باقی‌بماند؛ حال اگر این شخص به‌طور کامل در عرض چند هفته درمان‌شود، باز هم تست سرولوژیکی این شخص، مثبت خواهدشد که این امر، ضعف روش‌های سرولوژیکی را نمایان‌می‌کند؛ همچنین تست سرولوژیکی در اوایل بیماری به دلیل نبود تیتر آنتی‌بادی کافی، منفی خواهدشد درصورتی‌که شخص به بیماری بروسلوز مبتلاست. یکی از ویژگی‌های اصلی بروسلوز، این است که خطر عود بیماری، حتی پس از درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب بالا باقی‌می‌ماند و روش‌های سرولوژیکی متداول مورد استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، قادر نیستند حالت عود بیماری بروسلوز را تشخیص‌دهند (۱۳).

در این میان روش PCR، روشی سریع و اختصاصی در تشخیص بروسلوز است. روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز که در دههٔ اخیر گسترشی قابل‌توجه یافته‌است ازجمله روش‌هایی است که دارای مزایای بسیاری بوده،

Archive of SID

www.SID.ir

تاحدودی، محدودیت‌های موجود در کشت را برطرف‌می‌کند؛ با استفاده از این روش در کمتر از یک روز می‌توان عامل بیماری‌زا را مشخص‌کرد. ویژگی و حساسیت بالای روش PCR می‌تواند به‌عنوان ابزاری با ارزش برای تشخیص بروسلوز درنظرگرفته‌شود. قدرت و قابلیت تکرار در زمان‌ها و مراکز مختلف، سادگی و سرعت قابل‌انجام و از همه مهم‌تر، عدم واکنش متقاطع با باکتری‌های منصوب و قدرت تشخیص عامل عفونی در نمونه‌های مختلف مرضی و محیطی، به‌ویژه در موارد عود مجدد بیماری، کم‌خطربودن برای کارکنان آزمایشگاه و نیاز به حداقل داشتن نمونه ازجمله مزیت‌های این روش هستند؛ البته مهم‌ترین محدودیت آن، حساسیت بالای PCR است که بایستی مراقبت شدید به‌ویژه از نظر آلودگی نمونه‌ها به‌عمل آید (۱۳).

در این تحقیق از مجموع ۳۰ نمونهٔ کشت‌شدهٔ سویه‌های استاندارد بروسلا، PCR توانست هر ۳۰ مورد را با توجه به پرایمرهای ژن‌های omp25 و trpE مثبت ارزیابی‌کند که معادل ۱۰۰ درصد نمونه‌هاست. با توجه به ژن‌های انتخاب‌شده در این تحقیق برای تشخیص جنس بروسلا و با توجه به اختصاصی‌بودن این دو ژن برای جنس بروسلا، ما در این تحقیق نشان‌دادیم که با استفاده از این دو ژن می‌توان به‌طور اختصاصی با استفاده از روش PCR، جنس بروسلا را تشخیص‌داد؛ ما حساسیت این دو ژن را برای جنس بروسلا ۱۰۰ درصد یافتیم. در تحقیقی که به سال ۱۳۸۵، *قوسیان مقدم* و همکارانشان درخصوص مقایسهٔ روش‌های کشت و سرولوژی با PCR انجام‌دادند، حساسیت PCR را ۵۸ درصد اعلام‌کرده‌بودند که به‌احتمال به دلیل نوع نمونه‌گیری یا عدم انتخاب ژن‌های مناسب مخصوص بروسلا بوده‌است (۵)؛ همچنین در تحقیق *حسینی دوست* و همکارانشان که در سال ۱۳۸٤ با موضوع ارزیابی تشخیص بروسلا آبورتوس با PCR و مقایسهٔ آن با روش کشت صورت‌گرفته‌است، حساسیت PCR را ٦۰ درصد اعلام‌کرده‌اند که به‌احتمال به دلیل حساسیت پایین پرایمرهای انتخاب‌شده بوده‌است (۲). نکته‌ای مهم که در اینجا شایان است اینکه تاکنون گزارشی از ژن trpE برای تشخیص جنس بروسلا در ایران مشاهده‌نشده‌است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام‌شد؛ همچنین از مسئولان دانشگاه علوم پزشکی همدان به‌ویژه جناب آقای دکتر *علیخانی* که در انجام این تحقیق ما را یاری‌فرمودند، 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 techniqes., 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 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 Immuniy 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, Vasconcellos SA, etal. A multiplex PCR for the detection of Brucella spp .and Leptospira spp DNA from aborted bovinefetuses. 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.

Archive of SID
www.SID.ir

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
21st Year, No.110
April- May, 2014

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

Mohammad Arjmandzadegan[1], Tahere Naji[2], Yousef Alikhani[3], Mostafa Saberian[4], 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, Pharmacutical 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,Pharmacutical 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

Received: 2014/03/11
Last revised: 2014/04/12
Accepted: 2014/04/15

www.SID.ir