

## ***Evaluation of Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction in Detecting Common Species of Brucella***

Mohammad Reza Arabestani<sup>1</sup>,  
Ali Gholami<sup>2</sup>,  
Mohammad Yousef Alikhani<sup>3</sup>,  
Nasrin Bahmani<sup>4</sup>,  
Seyed Hamid Hashemi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Associate Professor, Brucellosis Research Center, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

<sup>2</sup>MSc in Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

<sup>3</sup>Professor, Brucellosis Research Center, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

<sup>4</sup>PhD Student in Medical Bacteriology, Brucellosis Research Center, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

(Received June 15, 2016; Accepted October 22, 2016)

### ***Abstract***

**Background and purpose:** Brucellosis is a zoonotic disease. Given that serologic test has some specific characteristics such as difficult growth, problems associated with culture, and cross-reactions with other bacteria, in this study multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) method was used to detect the most common species of *Brucella* spp.

**Materials and methods:** This experimental study was performed in Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran, 2015, in two bioinformatical and analytical stages. A universal primer was designed to detect *Brucella* genus and two primers were prepared for *B. melitensis* and *B. abortus*, which are the most common species. The target genes for universal *Brucella*, *B. melitensis*, and *B. abortus* primers were *ITS*, *BMEII-0466*, and *BruAB2-0168*, respectively. In the analytical stage, specificity and sensitivity of the primers were evaluated.

**Results:** In this study, the universal primer of *Brucella* was detected in 83 bp at melt temperature of 82°C. Moreover, *B. melitensis* and *B. abortus* primers were specifically identified in 121 bp and 285 bp at melt temperatures of 84°C and 87°C, respectively. The sensitivity for the universal *Brucella* primer and *B. abortus* was 50 fg, while it was 100 fg for the *B. melitensis* primer.

**Conclusion:** The identified primers revealed high levels of sensitivity and specificity. Therefore, they can be considered along with culture in clinical trials.

**Keywords:** *B. abortus*, *B. melitensis*, multiplex, real-time PCR

# ارزیابی روش Multiplex Real-time PCR به منظور شناسایی گونه‌های شایع باکتری بروسلا

محمد رضا عربستانی<sup>۱</sup>

علی غلامی<sup>۲</sup>

محمد یوسف علیخانی<sup>۳</sup>

نسرین بهمنی<sup>۴</sup>

سید حمید هاشمی<sup>۵</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** بیماری بروسلوز یک بیماری مشترک انسان و دام است. با توجه به ویژگی‌هایی مانند سخت رشد بودن، خطرات مرتبط با کشت و وجود واکنش‌های متقاطع با باکتری‌های دیگر در آزمون سرولوژیک، در مطالعه حاضر روش Multiplex Real-time PCR به منظور شناسایی گونه‌های شایع باکتری بروسلا (*Brucella*) ارزیابی شد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه تجربی در دانشگاه علوم پزشکی همدان و در سال ۱۳۹۴ در دو مرحله بیوانفورماتیکی و آنالیتیکی صورت گرفت. در مطالعه حاضر، یک پرایمر همگانی برای شناسایی همه‌ی گونه‌های جنس بروسلا و دو پرایمر اختصاصی دیگر برای گونه‌های بروسلا ملی تنسیس (*B. melitensis*) و بروسلا آبورتوس (*B. abortus*) که بیشترین شیوع را دارند، طراحی شد. ژن‌های *JTS*، *BMEII-0466* و *BruAB2-0168* به عنوان ژن‌های هدف به ترتیب برای جنس بروسلا، بروسلا ملی تنسیس و بروسلا آبورتوس انتخاب گردیدند. اختصاصیت و حساسیت پرایمرها نیز در مرحله آنالیتیکی ارزیابی شدند.

**یافته‌ها:** پرایمر همگانی، جنس بروسلا را در ۸۳ جفت باز و دمای ذوب معادل ۸۲/۵ درجه سانتی‌گراد شناسایی می‌کند. به طور اختصاصی، پرایمرهای بروسلا ملی تنسیس و بروسلا آبورتوس به ترتیب در ۱۲۱ و ۲۸۵ جفت باز و دماهای ذوب معادل ۸۴ و ۸۷ درجه سانتی‌گراد، این باکتری‌ها را شناسایی می‌کنند. حساسیت به دست آمده برای پرایمر همگانی و بروسلا آبورتوس، ۵۰ fg و برای بروسلا ملی تنسیس ۱۰۰ fg بود.

**استنتاج:** با توجه به نتایج به دست آمده توسط این مطالعه، پرایمرهای طراحی شده حساسیت و اختصاصیت قابل قبول و بالایی از خود نشان دادند که می‌توان برای ارزیابی آن‌ها در آزمایش‌های کلینیکی به همراه روش کشت استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** بروسلا آبورتوس، بروسلا ملی تنسیس، real-time PCR multiplex

## مقدمه

بروسلوزیس به عنوان یک بیماری مشترک انسان و دام است که مشکلات جدی بهداشتی و اقتصادی را در سراسر جهان به وجود می‌آورد. برخلاف اعلام روند رو به رشد کشورها در ریشه‌کنی بروسلا (*Brucella*)،

**مؤلف مسئول: محمد یوسف علیخانی** - همدان: دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی‌شناسی، همدان، ایران

۱. دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بروسلوز، گروه میکروبی‌شناسی، همدان، ایران

۲. کارشناس ارشد، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی‌شناسی، همدان، ایران

۳. استاد، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بروسلوز، گروه میکروبی‌شناسی، همدان، ایران

۴. دانشجوی دکتری تخصصی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بروسلوز، گروه میکروبی‌شناسی، همدان، ایران

۵. استاد، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بروسلوز، گروه میکروبی‌شناسی، همدان، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۶/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۸/۱

بیماری شده است (۱۰)؛ ۲- بروسلا یک باکتری سخت رشد است و کشت دادن نمونه‌های بالینی برای جداسازی آن خطر بسیار دارد؛ ۳- آنتی‌بادی‌های ضد این باکتری با بعضی از باکتری‌های دیگر واکنش متقاطع دارند؛ از جمله: *Vibrio cholerae* O<sub>1</sub>، *Escherichia coli* O<sub>157</sub>H<sub>7</sub>، *Salmonella* O:30 و *Yersinia enterocolitica* در نتیجه، برای این باکتری اختصاصی نیستند (۱۱، ۱۲)؛ ۴- تفسیر ایمنوگلوبولین‌های سرم بیمار برای تعیین عفونت فعال و مزمن و یا آلودگی قبلی با این باکتری، دشوار و تخمینی است (۱۳) و ۵- این باکتری‌ها در بعضی از موارد عود می‌کنند. تعیین تیتراژ باکتری در خون، برای اطلاع از روند درمان در برخی از بیماران حائز اهمیت است.

روش‌های متعددی از جمله: آزمون‌های میکروب-شناسی استاندارد به‌منظور جداسازی گونه‌های بروسلا از نمونه‌های خون، بافت، مایعات بدن و مغز استخوان، روش‌های سرولوژی برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضدبروسلاها و روش‌های مولکولی برای شناسایی DNA بروسلا وجود دارند. با توجه به اینکه روش استاندارد برای جداسازی و تشخیص بروسلا، روش کشت میکروبی است، اما با توجه به سخت رشد بودن باکتری و همچنین، وجود خطر در هنگام کارکردن برای جداسازی آن، زمان‌بر بودن کشت و در بسیاری موارد حساسیت پایین کشت میکروارگانیسم بسته به محیط کشت مورد استفاده، گونه بروسلا، مرحله بیماری و تعداد باکتری موجود در نمونه، از محدودیت‌های استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت به‌شمار می‌آید (۱۴-۱۶). با اینکه روش‌های سرولوژیکی مؤثر به‌نظر می‌رسند؛ اما به‌دلیل واکنش‌های متقاطع و نیز حساسیت پایین واکنش‌ها در نواحی با شیوع کم یا در موارد عفونت‌های تحت کلینیکی، استفاده از روش‌های شناسایی سریع، دقیق و دارای

این بیماری به‌عنوان یک عفونت مشترک باقی مانده است. سالیانه در حدود ۵۰۰,۰۰۰ مورد جدید بروسلا در جهان با شیوع عمده در خاورمیانه، کشورهای مدیترانه، آمریکای جنوبی و آسیای مرکزی رخ می‌دهد. در ایران نیز، بروز بروسلوز از شیوع بالایی برخوردار است (۳-۱).

بروسلاها باکتری‌هایی کوچک، داخل سلولی اختیاری هوازی و کوکوباسیل گرم منفی هستند که گستردگی جهانی دارند و تشابه DNA تا حد بیشتر از ۹۰ درصد می‌باشد (۴). جنس بروسلا مرکب از ۱۰ گونه شناسایی شده است که شش گونه آن شامل: *B. canis*، *B. suis*، *B. abortus*، *B. melitensis*، *B. ovis* و *B. neotomae* جزو اعضای کلاسیک بروسلا در نظر گرفته می‌شوند. گونه‌های *B. ceti*، *B. pinnipedialis*، *B. microti* و *B. inopinata* به‌تازگی شناسایی شده‌اند (۱، ۲، ۵)، مهم‌ترین گونه‌های بیماری‌زا برای انسان، گونه‌های *B. melitensis*، *B. abortus* و به‌ندرت *B. suis* و *B. canis* هستند که میزبان ترجیحی آن‌ها به‌ترتیب، نشخوارکنندگان کوچک، گاو، خوک و سگ‌ها می‌باشند (۶، ۷). افزون‌براین، به‌تازگی دو گونه شناخته‌شده در پستانداران دریایی؛ یعنی *B. ceti* و *B. pinnipedialis* توانایی ایجاد بیماری در انسان را دارند (۸، ۹). شدت بیماری‌زایی بیشتر با کمترین دوز عفونی (ID<sub>50</sub>) در بین گونه‌ها را (۱۰ تا ۱۰۰) دارد. گونه‌های *B. melitensis*، *B. abortus* و *B. suis* به‌طور عمده و *B. canis* با شیوع کمتر مسئول بیشتر از ۵۰۰,۰۰۰ عفونت بروسلائی به‌صورت سالیانه در سراسر جهان هستند.

سه گونه اول بروسلا به‌دلیل ظرفیت‌های آن‌ها به‌عنوان عوامل بیوتروریسم مطرح هستند (۱). از جمله مواردی که در مورد بروسلوز اهمیت دارند: ۱- بروسلوز در ایران شیوع بالایی دارد و مشترک بودن آن سبب کنترل‌نشدن این

میکروارگانسیم‌ها در مرحله بیوانفورماتیکی، همه‌ی سویه‌های هر گونه برای شناسایی پوشش داده شدند. در مرحله آنالیتیکی، اختصاصیت پرایمرها بعد از استخراج ژنوم، هر پرایمر با تک تک گونه‌های بروسلا، با ژنوم انسان (از کشت سلول Hella)، باکتری‌های دیگر و مخمر کاندیدیایی ارزیابی شدند. حساسیت پرایمرها نیز با سنجش غلظت DNA استخراج شده باکتری‌های اختصاصی پرایمر و بررسی پایین‌ترین حد قابل شناسایی ارزیابی گردید.

#### میکروارگانسیم‌ها

در مطالعه حاضر سویه‌های باکتریایی شامل: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)، *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606)، *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)، *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)، *Escherichia coli* (ATCC 25922)، *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13044)، *Proteus mirabilis* (ATCC 7002)، *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13882)، *Salmonella enterica* (ATCC 35640) و *Shigella boydii* (ATCC 9207) و سویه‌های بروسلا شامل: *B. melitensis* (Rev.1 و biotype-1) و *B. abortus* (RB.51 و S.19، biotype-2) از مؤسسه تحقیقاتی انستیتو پاستور و آزمایشگاه مرجع ایران تهیه و خریداری شدند.

#### استخراج ژنوم

به منظور استخراج ژنوم باکتری، از روش جوشاندن استفاده گردید (۲۲). سویه‌های بروسلا بر روی محیط شکلات آگار (Chocolate agar) کشت داده شدند. یک لوپ از باکتری رشد کرده بر روی محیط برداشته و برای

حساسیت و اختصاصیت بالا از جمله روش‌های مبتنی بر PCR به منظور پیشگیری و کنترل بیماری بروسلا ضروری است (۱۳، ۱۷)؛ بنابراین، در مطالعه حاضر، برای تشخیص سریع و دقیق‌تر عوامل بیماری بروسلا به منظور استفاده از روش مولکولی حساس و دقیق Real-time PCR و بررسی دمای ذوب (Melting curve) سه زوج پرایمر طراحی شدند.

## مواد و روش‌ها

### طراحی پرایمر

این مطالعه در دانشگاه علوم پزشکی همدان در سال ۱۳۹۴ در دو مرحله انجام شد. مرحله اول شامل مطالعات بیوانفورماتیکی و مرحله دوم شامل آزمون‌های آنالیتیکی بود. در مرحله بیوانفورماتیکی، مجموعه‌ای از توالی نوکلئوتیدهای همه گونه‌های بروسلا موجود در بانک اطلاعاتی NCBI انتخاب شدند.

در مطالعه حاضر، یک پرایمر همگانی برای شناسایی همه‌ی گونه‌های جنس بروسلا و دو پرایمر اختصاصی دیگر برای گونه‌های بروسلا ملی تنسیس (*B. melitensis*) و بروسلا آبوروس (*B. abortus*) که بیشترین شیوع را دارند، طراحی شد. در مرحله بیوانفورماتیکی، ژن‌های هدف در جنس بروسلا، بروسلا ملی تنسیس و بروسلا آبوروس، به ترتیب *BMEII-0466* و *BruAB2-0168* Alignment با نرم‌افزار Mega4 انتخاب شدند. سپس با نرم‌افزار Gene Runner و آنالیز با Oligo7، Blast و OligoAnalyzer در پایگاه اطلاعاتی NCBI صورت گرفت (۲۰، ۲۱). برای کاربرد در PCR، طول توالی آن‌ها متفاوت و قابل تفریق انتخاب شد و جهت کاربرد در Real-time PCR دمای  $T_m$  (Melt Temperature) توالی محصول گوناگون طراحی شد که با Melting مشخص می‌شود؛ به صورتی بود که با نبود همولوژی ژنوم با دیگر

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده برای این مطالعه

Product Tm (°C)	اندازه محصول (جفت باز)	Primer Tm (°C)	توالی پرایمر	نام باکتری
۸۲/۵	۸۳	۵۸	AAAGCAGGTGCTCTCCCA GTGGGGTCCGGAGGTTCAAG	<i>Brucella universal F</i> <i>Brucella universal R</i>
۸۴	۱۲۱	۵۸	TTGGCCTTTCCAGATTGCG TGAAAGAAGCGGCGAAATGG	<i>melitensis F</i> <i>melitensis R</i>
۸۷	۲۸۵	۵۸	ACAATGGTGCCTGGGACAAT TACCACCATCGGCCTTTTCC	<i>abortus F</i> <i>abortus R</i>

مرحله طویل‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۱۳). محصولات PCR برای هر پرایمر به واسطه شرکت تکاپو زیست (کشور ایران) تعیین توالی گردید. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در این مطالعه در جدول شماره ۱ آمده است.

#### واکنش Real-time PCR

واکنش‌های Real-time PCR در حجم نهایی ۲۵ µl صورت گرفت که شامل ۱۲/۵ µl از محلول SYBR Green PCR Master Mix (ساخت شرکت آواژن، کشور ایران)، ۱۰۰ nM از هر پرایمر و ۱۵ µl از نمونه DNA بود. آزمایش Real-time PCR در دستگاه ترموسایکلر (ساخت شرکت Biosystem، کشور آمریکا) با الگوی مرحله‌ی شروع ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ادامه یافت و با ۴۰ چرخه ۱۵ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه‌ای در ۵۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از تکثیر Real-time PCR، دمای منحنی ذوب با افزایش دما از ۵۵ درجه تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد، طی مراحل ۰/۳ درجه سانتی‌گراد اجرا گردید.

#### حساسیت و اختصاصیت آزمون

تعیین حساسیت واکنش PCR: ژنوم باکتری

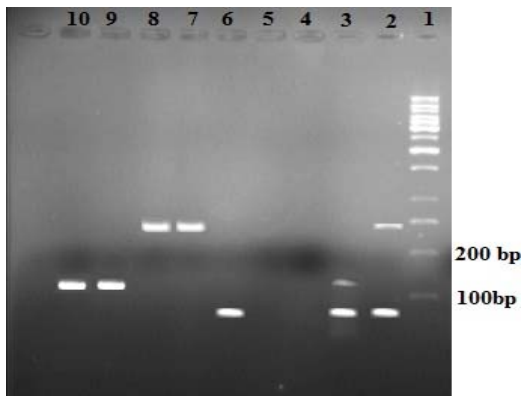
شستشو با Tris EDTA مخلوط شد. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. رسوبات باقی‌مانده پس از حل شدن دوباره در ۰/۱ ml آب مقطر، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. رسوبات باقی‌مانده مجدداً در ۰/۱ ml آب دوبار تقطیر حل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۰۰۰۰ rpm، مایع رویی حاوی DNA باکتری برای استفاده در PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

#### واکنش PCR

هر واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ µl شامل: ۱۲/۵ µl مستر میکس (PCR 2X Taq premix)، Mastermix تهیه‌شده از شرکت پارس‌توس زیست فناوری (کشور ایران)، ۱ µl از هر پرایمر F، ۱ µl از هر پرایمر R، ۳ µl از DNA الگو و ۱/۵ µl آب دوبار تقطیر است. برنامه چرخه حرارتی واکنش PCR برای ژن‌ها به صورت واسرشته‌سازی اولیه (Initial Denaturation) در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه PCR به ترتیب شامل: واسرشته‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر (Primer Annealing) ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل‌سازی (Extension) ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت، یک

بین گونه‌ای، این باکتری‌ها را به ترتیب در ۱۲۱ و ۲۸۵ باز و  $T_m$  معادل ۸۴ درجه و ۸۷ درجه سانتی‌گراد شناسایی نمودند (تصاویر شماره ۱ و ۲). این پرایمرها با ژنوم باکتری دیگر، ژنوم انسان و مخمر کاندیدا هیچ گونه همولوژی نداشتند. نتایج حساسیت به دست آمده برای پرایمر همگانی و *B. abortus*، ۵۰ fg و برای *B. melitensis*، ۱۰۰ fg بود (تصویر شماره ۳ و جدول شماره ۲).

نتایج تعیین توالی: تعیین توالی محصول PCR نیز کاملاً اختصاصی باکتری و قطعه‌ی هدف بود.



**تصویر شماره ۱:** الکتروفورز محصول PCR، شماره چاهک‌ها به ترتیب از سمت راست به چپ: چاهک شماره ۱: مارکر ۱۰۰ bp (ساخت شرکت Fermentas، کشور آمریکا)، چاهک ۲: الکتروفورز محصول دی‌پلکس برای *B. abortus* که باند ۸۳ جفت بازی مربوط به پرایمر همگانی و باند ۲۸۵ جفت باز مربوط به پرایمر اختصاصی *B. abortus* است. چاهک شماره ۳: الکتروفورز محصول دی‌پلکس برای *B. melitensis* که باند ۸۳ جفت بازی مربوط به پرایمر همگانی و باند ۱۲۱ زوج باز مربوط به پرایمر *B. melitensis* می‌باشد. چاهک‌های شماره ۴ و ۵: نمونه‌های کنترل منفی هستند. چاهک شماره ۶: الکتروفورز محصول PCR برای باکتری *B. ovis* با پرایمر همگانی. چاهک‌های شماره ۷ و ۸: الکتروفورز محصول PCR برای باکتری *B. abortus* با پرایمر اختصاصی آن و شناسایی آن در ۲۸۵ زوج باز. چاهک‌های شماره ۹ و ۱۰: الکتروفورز محصول PCR برای باکتری *B. melitensis* با پرایمر اختصاصی آن و شناسایی آن در ۱۲۱ جفت باز

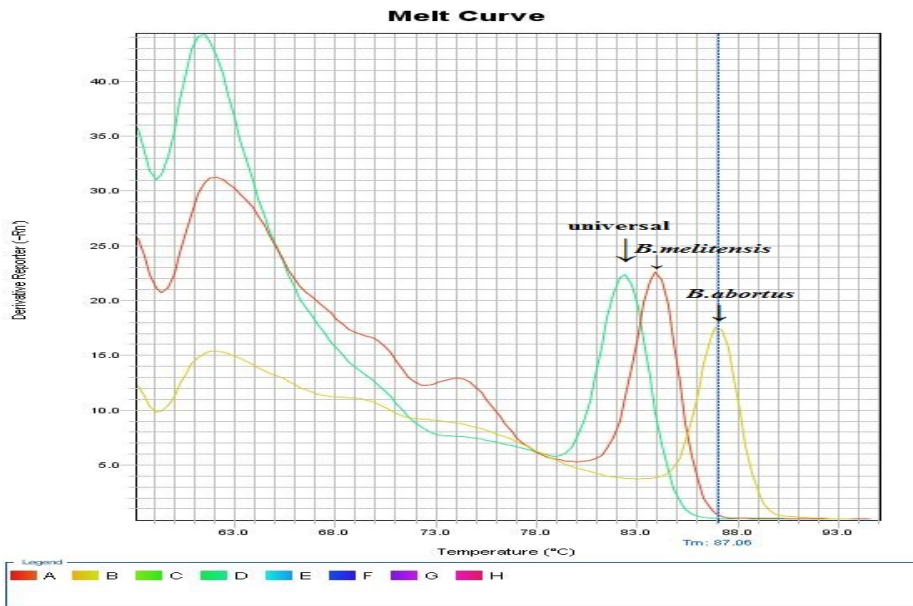
استخراج شده توسط NanoDrop 8000 UV-Vis Spectrophotometer (ساخت شرکت Thermo Fisher Scientific Inc، کشور آمریکا) تعیین غلظت شد (از ۱۰۰ pg تا ۲۵ fg) و از ۱ تا ۱۰<sup>۴</sup> CFU/ml رقت تهیه شد و با Real-time PCR ارزیابی گردید.

تعیین اختصاصیت واکنش PCR: مراحل اختصاصیت پرایمر با آزمایش بر روی نمونه‌های DNA باکتریایی گونه‌های بروسلا، ژنوم باکتری‌های غیربروسلا و همچنین DNA غیرباکتریایی مانند نمونه سلولی انسان (از منابع کشت سلولی هلا تهیه شد) و نمونه سلولی قارچ (*Aspergillus fumigatus* و *Candida albicans*) ارزیابی شد.

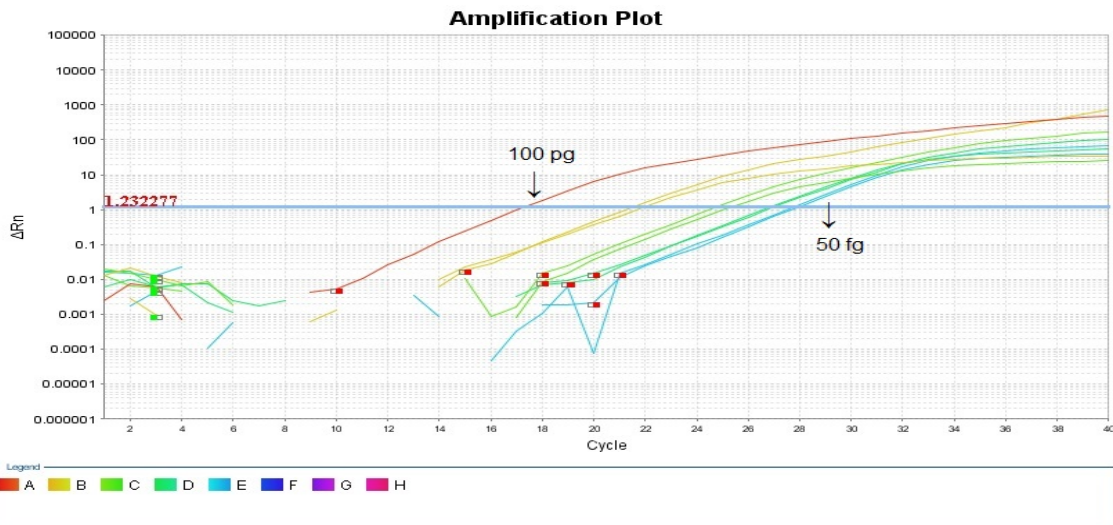
توالی‌یابی (Sequencing): یک نمونه از هر محصول PCR مربوط به جنس بروسلا و گونه‌های بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی‌تسیس، با همکاری شرکت تکاپوزیست توسط شرکت Bioneer کشور کره جنوبی توالی‌یابی شد. اطلاعات مربوط به توالی‌یابی با کمک نرم‌افزار Chromas تجزیه و تحلیل گردید.

## یافته‌ها

در مرحله بیوانفورماتیکی، پس از طراحی پرایمرها به وسیله نرم‌افزارهای بیان‌شده در روش کار، نتایج BLAST نشان داد که پرایمرهای طراحی شده اختصاصی هستند. نتایج مرحله کلینیکی پرایمرهای طراحی شده با گونه‌های باکتریایی بروسلا و جنس بروسلا، نشان داد که پرایمرها کاملاً اختصاصی هستند؛ یعنی پرایمر همگانی تمامی گونه‌های بروسلا را در ۸۳ جفت باز و دمای  $T_m$  معادل ۸۲/۵ درجه سانتی‌گراد شناسایی می‌کند. پرایمرهای *B. melitensis* و *B. abortus* نیز، به‌طور اختصاصی بدون همولوژی



تصویر شماره ۲: نمودارهای Melting مربوط به سه پرایمر *B. abortus*, *B. melitensis*, *universal* که به ترتیب در دمای ۸۲/۵، ۸۴ و ۸۷ درجه سانتی گراد از یکدیگر قابل تفریق هستند.



تصویر شماره ۳: نمودارهای حساسیت پرایمر *B. abortus* از رقت ۱۰۰ pg تا ۵۰ fg نمایش داده شده است. برای اطمینان از صحت انجام آن از هر رقت دو نمونه استفاده شد (Pg= pictogram و fp= femtogram).

جدول شماره ۲: تعیین رقت از ژنوم *Brucella* برای اندازه گیری حساسیت پرایمر

Ct-value	Real-time PCR			غلظت DNA
	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	پرایمر همگانی	
۱۸	+	+	+	100 pg DNA per PCR
۲۲	+	+	+	10 pg DNA per PCR
۲۵	+	+	+	1 pg DNA per PCR
۲۷	+	+	+	100 fg DNA per PCR
۲۸	+	-	+	50 fg DNA per PCR
-	-	-	-	25 fg DNA per PCR
-	-	-	-	Sample preparation control

## بحث

می‌شود (۲۶،۲۵). در این مطالعه، حساسیت و اختصاصیت سه ژن هدف *BMEII-0466 ITS* و *BruAB2-0168* ارزیابی شدند. ژن‌های هدف بسیار اختصاصی هستند. تکنیک Real-time PCR با تعدادی از باکتری‌های دیگر به غیر از جنس بروسلا، ژنوم انسان و تعدادی قارچ ارزیابی گردید و هیچ‌گونه تکثیر غیراختصاصی در آن مشاهده نشد. نتایج به دست آمده با نتایج محققان دیگر که از ژن‌های هدف دیگری مانند ژن *IS711* استفاده کرده بودند، مقایسه شد و نتایج مشابهی به دست آمد (۲۷). کمترین میزان حساسیت آزمون انجام شده برای پرایمر همگانی و *B.abortus*، ۵۰ fg و برای *B.melitensis*، ۱۰۰ fg مشاهده شد که مشابه نتایج به دست آمده توسط Probert و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۲۳) و Redkar و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۲۶) بود. Redkar و همکاران گزارش داده بودند که حداقل میزان حساسیت برای شناسایی بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس ۱۵۰ fg است. حداقل میزان حساسیت حاصل شده با استفاده از ژن هدف *IS711* توصیف شده توسط Newby و همکاران در سال ۲۰۰۳، ۷/۵ fg گزارش گردید (۲۴). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ توسط Jama'ayah و همکاران در کشور مالزی، گونه‌های بروسلا با روش High-resolution melt (HRM) analysis شناسایی شدند که در مقایسه با مطالعه انجام گرفته، این روش می‌تواند به صورت دقیق بین گونه‌های مختلف باکتری بروسلا تمایز قائل شود؛ هرچند که برای تفسیر نتایج به نرم‌افزار مخصوص نیاز است (۲۸). اگر از یک ژن مرجع نیز در بررسی نمونه‌ها استفاده شود، می‌توان سیر درمان و میزان مؤثر بودن آن را با محاسبه کردن تعداد کپی، ارزیابی کرد.

یک روش Multiplex Real-time PCR با استفاده از دمای ذوب اختصاصی در مطالعه حاضر، طراحی گردید که یک زوج پرایمر اختصاصی جنس بروسلا و دو زوج پرایمر اختصاصی برای گونه‌های شایع بروسلا، بروسلا ملی تنسیس و بروسلا آبورتوس داشت. در سالیان اخیر، چندین محقق تکنیک‌های Real-time PCR با حساسیت و اختصاصیت‌های منحصر به فرد را برای شناسایی جنس و گونه‌های بروسلا پیشنهاد کردند (۲۴،۲۳). افتراق بین باکتری‌های بروسلا توسط این پرایمرها با توجه به اختلاف دمایی ۲ الی ۳ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از دمای ذوب آسان است. همچنین، باندهای تکثیر یافته DNA هدف با توجه به اختلاف طول محصولات در نظر گرفته شده بر روی ژل آگار در خصوص باکتری‌های *B.melitensis* (طول محصول تکثیر شده، ۲۸۵ جفت باز) و *B. abortus* (طول محصول تکثیر شده، ۱۲۱ جفت باز) از یکدیگر قابل تفریق هستند (تصویر شماره ۱). این حالت درباره نمودارهای دمای ذوب نیز وجود دارد؛ یعنی درباره این دو گونه بروسلا، دو منحنی ذوب دمایی مربوط به پرایمر همگانی در ۸۲/۵ درجه سانتی‌گراد و باکتری مورد نظر با ۸۴ و ۸۷ درجه سانتی‌گراد در یک نمونه ایجاد می‌شوند. آن‌ها در صورتی ایجاد می‌شوند که انجام آزمایش به صورت Multiplex باشد که نقطه قوتی برای استفاده از این آزمایش در شناسایی نمونه‌های کلینیکی است.

استفاده از تکنیک Real-time PCR مزایای زیادی از قبیل زمان کوتاه، حساسیت بالا و نیاز نداشتن به مراحل پس از PCR معمولی دارد. همچنین، در این تکنیک از آنالیز دمای ذوب برای تمایز گونه‌های باکتریایی که روش بسیار ساده‌ای است، استفاده



بروسلوز، ممکن است بتواند به عنوان یک روش تشخیصی به همراه کشت میکروبی در آزمایشگاه‌های کلینیکی استفاده شود.

### سپاسگزاری

هزینه مطالعه این طرح از محل اعتبارات طرح شماره ۹۳۱۲۱۲۶۶۰۷ دانشگاه علوم پزشکی همدان پرداخت شده است. بدین وسیله، از معاونت آموزشی، تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان تشکر و قدردانی می‌شود.

### References

1. Christopher S, Umaphy BL, Ravikumar KL. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *J Lab Physicians*.2010; 2(2): 55-60.
2. Eini P, Esna-Ashari, Mobaien AR, Hasanzadeh M .A Retrospective evaluation of epidemiological, clinical and laboratory-features of brucellosis in 230 patients in Hamadan, Iran: a brief report. *Med J*. 2012; 70(2): 130-135.
3. Garshasbi M, Ramazani A, Sorouri R, Javani S, Moradi S. Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Iran. *Braz J Microbiol*. 2014;45(2):533-538
4. Poester F, Nielsen K, Samartino L, Yu W L.Diagnosis of Brucellosis. *Open Vet Sci J* .2010; 4: 46-60.
5. Khan M, Humayoon M, Manee M. Epididymo-orchitis and Brucellosis. *BJU Int*. 1989; 63(1):87-89.
6. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int J Antimicrob Agents*.2010; Suppl:S12–17.
7. Cloeckert A, Vizcaino N. DNA polymorphism and taxonomy of *Brucella* species. In: *Brucella molecular and cellular biology* . Lopez-Goni I, Moriyon I, editors Horizon bioscience .United Kingdom, Norfolk . 2004. P:1–24.
8. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckert A. *Brucella ceti* sp. nov.and *Brucella pinnipedialis* sp. nov.for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* .2007;57(11):2688–2693.
9. McDonald WL, Jamaludin R, Mackereth G, Hansen M, Humphrey S, Short P. Characterization of a *Brucella* sp. strain as marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *J Clin Microbiol*. 2006;44(12): 4363–4370.
10. Zeinalian Dastjerdi M, Fadaei Nobari R, Ramazanpour J. Epidemiological features of human brucellosis in central Iran, 2006- 2011.

- Public Health .2012; 126 (12): 1058-1062.
11. Chin JC, Pang B, Carrigan M. Comparison of seroreactivity of rams with brucellosis in a complement fixation test, whole cell ELISA and by immunoblotting. *Vet Microbiol.*1991; 26(3):291-299.
  12. Kováčová, D, Zubrický P, Babinčáková, M, Trávníček, M. Importance of Serological Diagnostics in ovine Epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Bull Vet Inst Pulawy.*2007;51: 219-224.
  13. Espy M, Uhl J R, Sloan M L, Buckwalter S P, Jones M. F, Vetter E, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1): 165–256.
  14. Keid LB, Soares RM, Vieira NR, Megid J, Salgado VR, Vasconcelos SA, et al. Diagnosis of Canine Brucellosis: Comparison between Serological and Microbiological Tests and a PCR Based on Primers to 16S-23S rDNA Interspace. *Vet Res Commun.* 2007; (8):951-965.
  15. Arabestani MR, Fazzeli H, Nasr Esfahani B. Identification of the most common pathogenic bacteria in patients with suspected sepsis by multiplex PCR. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8:461–8.
  16. Fazzeli H, Arabestani MR, Esfahani BN, Khorvash F, Pourshafie MR, Moghim S, et al. Development of PCR-based method for detection of Enterobacteriaceae in septicemia. *J Res Med Sci.* 2012;17:671–5.
  17. Mitka S, Anetaki S C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A. Evaluation of different PCR assays for the early detection of acute and relapsing human brucellosis in comparison with conventional methods. *J Clin Microbiol.*2007; 45(4): 1211-1218.
  18. Arabestani MR, Fazzeli H, Nasr Esfahani B. Identification of the most common pathogenic bacteria in patients with suspected sepsis by multiplex PCR. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(4):461-468
  19. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(22):4673-4680.
  20. Fazzeli H, Arabestani MR, Esfahani BN, Khorvash F, Pourshafie MR, Moghim S, et al. Development of PCR-based method for detection of Enterobacteriaceae in septicemia. *J Res Med Sci.* 2012;17(7):671-675
  21. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215(3):403-410.
  22. Queipo-Ortuño MI, Colmenero JDD, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15 (2): 293-296.
  23. Probert WS, Schradar KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(3): 1290-1293.
  24. Newby DT, Hadfield TL, Roberto FF. Real-time PCR detection of *B. abortus*: a comparative study of SYBR green I, 59-exonuclease and hybridization probe assay. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(8): 4753-4759.

25. Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Reguera JM, Garcia-Ordóñez MA, Pachón ME, González M, et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(9):713–718.
26. Redkar R, Rose S, Bricker B, De Vecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol Cell Probes*. 2001;15(1):43–52.
27. Bogdanovich T, Skurnik M, Lubeck PS, Ahrens P, Hoofar J. Validated 5 nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella*. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(5): 2261-2263.
28. Zahidi JM, Heu JY, Hashim R, Noor AM, Hamzah SH, Ahmad N. Identification of *Brucella* spp. isolated from human brucellosis in Malaysia using high-resolution melt (HRM) analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015; 81(4): 227–233.