ORIGINAL ARTICLE

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

Mohammad Reza Arabestani[1],
Ali Gholami[2],
Mohammad Yousef Alikhani[3],
Nasrin Bahmani[4],
Seyed Hamid Hashemi[3]

[1]Associate Professor, Brucellosis Research Center, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
[2] MSc in Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
[3] Professor, Brucellosis Research Center, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
[4] 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 otherbacteria, 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 tempretures 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

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(147): 97-107 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۴۷ فروردین سال ۱۳۹۶ (۱۰۷-۹۷)

ارزیابی روش Multiplex Real-time PCR به‌منظور شناسایی گونه‌های شایع باکتری بروسلا

محمد رضا عربستانی[۱]
علی غلامی[۲]
محمد یوسف علیخانی[۳]
نسرین بهمنی[۴]
سید حمید هاشمی[۵]

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 به‌منظور 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 ملی‌تنسیس (*B. melitensis*) و بروسلا آبورتوس (*B. abortus*) که بیشترین شیوع را دارند، طراحی شد. ژن‌های *ITS*، *BMEII-0466* و *BruAB2-0168* به‌عنوان ژن‌های هدف به‌ترتیب برای جنس بروسلا، بروسلا ملی‌تنسیس 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. به‌طور اختصاصی، پرایمرهای بروسلا ملی‌تنسیس و بروسلا آبورتوس به‌ترتیب در ۱۲۱ و ۲۸۵ جفت باز و دماهای ذوب معادل ۸۴ و ۸۷ درجه سانتی‌گراد، این باکتری‌ها را شناسایی می‌کنند. حساسیت به‌دست آمده برای پرایمر همگانی و بروسلا آبورتوس، ۵۰ fg و برای بروسلا ملی‌تنسیس ۱۰۰ fg بود.

استنتاج: با توجه به نتایج به‌دست آمده توسط این مطالعه، پرایمرهای طراحی‌شده حساسیت و اختصاصیت قابل‌قبول 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 ملی‌تنسیس، multiplex، real-time PCR

مقدمه

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

مولف مسئول: محمد یوسف علیخانی– همدان: دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، همدان، ایران Email: alikhani43@yahoo.com

۱. دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بروسلوز، گروه میکروب‌شناسی، همدان، ایران
۲. کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، همدان، ایران
۳. استاد، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بروسلوز، گروه میکروب‌شناسی، همدان، ایران
۴. دانشجوی دکترای تخصصی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بروسلوز، گروه میکروب‌شناسی، همدان، ایران
۵. استاد، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بروسلوز، گروه میکروب‌شناسی، همدان، ایران

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

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، داخل‌سلولی 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.melitensis*، *B.abortus*، *B.suis*، *B.canis*، *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 (۵،۲،۱)، 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 (۷،۶). افزون‌براین، به‌تازگی دو گونه شناخته‌شده در پستانداران دریایی؛ یعنی *B. ceti* و *B. pinnipedialis* توانایی ایجاد بیماری در انسان را دارند (۹،۸). *B.melitensis* شدت بیماری‌زایی بیشتر با کمترین دوز عفونی (ID_{50}) 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 بروسلایی 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 مشترک‌بودن آن سبب کنترل‌نشدن این بیماری شده است (۱۰)؛ ۲- بروسلا یک باکتری سخت رشد است و کشت‌دادن نمونه‌های بالینی برای جداسازی آن خطر بسیار دارد؛ ۳- آنتی‌بادی‌های ضد این باکتری با بعضی از باکتری‌های دیگر واکنش متقاطع دارند؛ از جمله: *Escherichia coli* $O_{157}H_7$، *Vibrio cholerae* O_1، *Yersinia enterocolitica* و *Salmonella O:30*؛ درنتیجه، برای این باکتری اختصاصی نیستند (۱۲،۱۱)؛ 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 تیتر 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، زمان‌بربودن 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 (۱۶-۱۴). 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

حساسیت و اختصاصیت بالا از جمله روش‌های مبتنی بر PCR به‌منظور پیشگیری و کنترل بیماری بروسلا ضروری است (۱۷،۱۳)؛ بنابراین، در مطالعه حاضر، برای تشخیص سریع و دقیق‌تر عوامل بیماری بروسلوز به‌منظور 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 بروسلای 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 ملی‌تنسیس (*B. melitensis*) و بروسلا آبورتوس (*B. abortus*) که بیشترین شیوع را دارند، طراحی شد. در مرحله بیوانفورماتیکی، ژن‌های هدف در جنس بروسلا، بروسلا ملی‌تنسیس و بروسلا آبورتوس، به‌ترتیب *ITS*، *BMEII-0466* و *BruAB2-0168* انتخاب شدند. سپس Alignment با نرم‌افزار Mega4 (۱۹،۱۸)، طراحی با نرم‌افزار Gene Runner و آنالیز با Oligo7، OligoAnalyzer و Blast در پایگاه اطلاعاتی NCBI صورت گرفت (۲۱،۲۰). برای کاربرد در PCR، طول توالی آن‌ها متفاوت و قابل‌تفریق انتخاب شد و جهت کاربرد در Real-time PCR دمای Tm (Melt Temperature) توالی محصول گوناگون طراحی شد که با Melting مشخص می‌شود؛ به‌صورتی بود که با نبود همولوژی ژنوم با دیگر میکروارگانیسم‌ها در مرحله بیوانفورماتیکی، همه‌ی سویه‌های هر گونه برای شناسایی پوشش داده شدند. در مرحله آنالیتیکی، اختصاصیت پرایمرها بعد از استخراج ژنوم، هر پرایمر با تک‌تک گونه‌های بروسلا، با ژنوم انسان (از کشت سلول Hella)، باکتری‌های دیگر و مخمر کاندیدیایی ارزیابی شدند. حساسیت پرایمرها نیز با سنجش غلظت DNA استخراج‌شده باکتری‌های اختصاصی پرایمر و بررسی پایین‌ترین حد قابل‌شناسایی ارزیابی گردید.

میکروارگانیسم‌ها

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)، *Shigella boydii* (ATCC 9207) و سویه‌های بروسلا شامل: (*biotype-1* و *Rev.1*) *B.melitensis* و (*biotype-2*، *S.19* و *RB.51*) *B.abortus* از مؤسسه تحقیقاتی انستیتو پاستور و آزمایشگاه مرجع ایران تهیه و خریداری شدند.

استخراج ژنوم

به‌منظور 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 رشدکرده بر روی محیط برداشته و برای

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای طراحی‌شده برای این مطالعه

نام باکتری	توالی پرایمر	Primer Tm (^{0}c)	اندازه محصول (جفت باز)	Product Tm (^{0}c)
Brucella universal F *Brucella* universal R	AAAGCAGGTGCTCTCCCA GTGGGGTCGGAGGTTCAAG	۵۸	۸۳	۸۲/۵
melitensis F *melitensis* R	TTGGCCTTTTCCAGATTGCG TGAAAGAAGCGGCGAAATGG	۵۸	۱۲۱	۸۴
abortus F *abortus* R	ACAATGGTGCGTGGGACAAT TACCACCATCGGCCTTTTCC	۵۸	۲۸۵	۸۷

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

واکنش PCR

هر واکنش PCR در حجم نهایی µl ۲۵ شامل: µl ۱۲/۵ مستر میکس (PCR 2X Taq premix Mastermix) تهیه‌شده از شرکت پارس‌طوس زیست فناور (کشور ایران)، µl ۱ از هر پرایمر F، µl ۱ از هر پرایمر R، µl ۳ از DNA الگو و µl ۱/۵ آب دوبار تقطیر است. برنامه چرخه حرارتی واکنش PCR برای ژن‌ها به‌صورت واسرشته‌سازی اولیه (Initial Denaturation) در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه PCR به‌ترتیب 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 درنهایت، یک مرحله طویل‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۱۳). محصولات PCR برای هر پرایمر به‌واسطه 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 µl ۲۵ صورت گرفت که شامل µl ۱۲/۵ از محلول SYBR GreenPCR Master Mix (ساخت شرکت آوا ژن، کشور ایران)، nM ۱۰۰ از هر پرایمر و µl ۵ 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

استخراج‌شده 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 10^4 CFU/ml تا ۱ رقت تهیه شد و با Real-time PCR ارزیابی گردید.

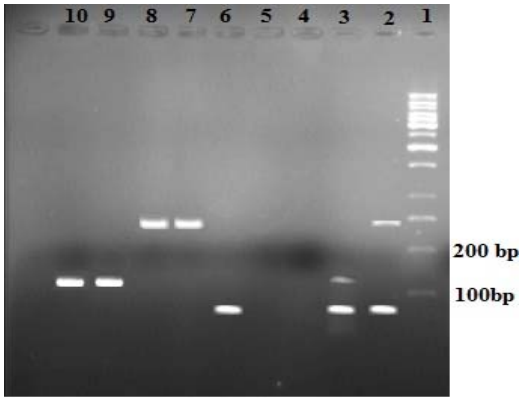
تعیین اختصاصیت واکنش PCR: مراحل اختصاصیت پرایمر با آزمایش بر روی نمونه‌های DNA باکتریایی گونه‌های بروسلا، ژنوم باکتری‌های غیربروسلا و همچنین DNA غیرباکتریایی مانند نمونه سلولی انسان (از منابع کشت سلولی هلا تهیه شد) و نمونه سلولی قارچ (*Aspergillus fumigatus* و *Candida albicans*) ارزیابی شد.

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

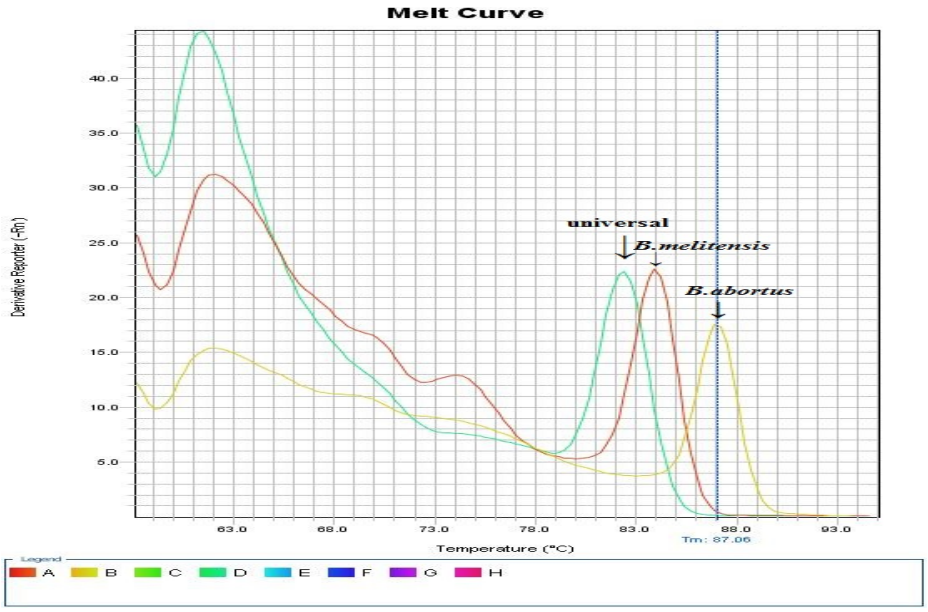
یافته‌ها

در مرحله بیوانفورماتیکی، پس از طراحی پرایمرها به‌وسیله نرم‌افزارهای بیان‌شده در روش کار، نتایج BLAST نشان داد که پرایمرهای طراحی‌شده اختصاصی هستند. نتایج مرحله کلینیکی پرایمرهای طراحی‌شده 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 Tm معادل ۸۲/۵ درجه سانتی‌گراد شناسایی می‌کند. پرایمرهای *B.melitensis* و *B.abortus* نیز، به‌طور اختصاصی بدون همولوژی بین گونه‌ای، این باکتری‌ها را به‌ترتیب در ۱۲۱ و ۲۸۵ باز و Tm 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 هیچ‌گونه همولوژی نداشتند. نتایج حساسیت به‌دست‌آمده برای پرایمر همگانی و *B.abortus*، ۵۰ fg و برای *B.melitensis*، ۱۰۰ fg بود (تصویر شماره ۳ و جدول شماره ۲).

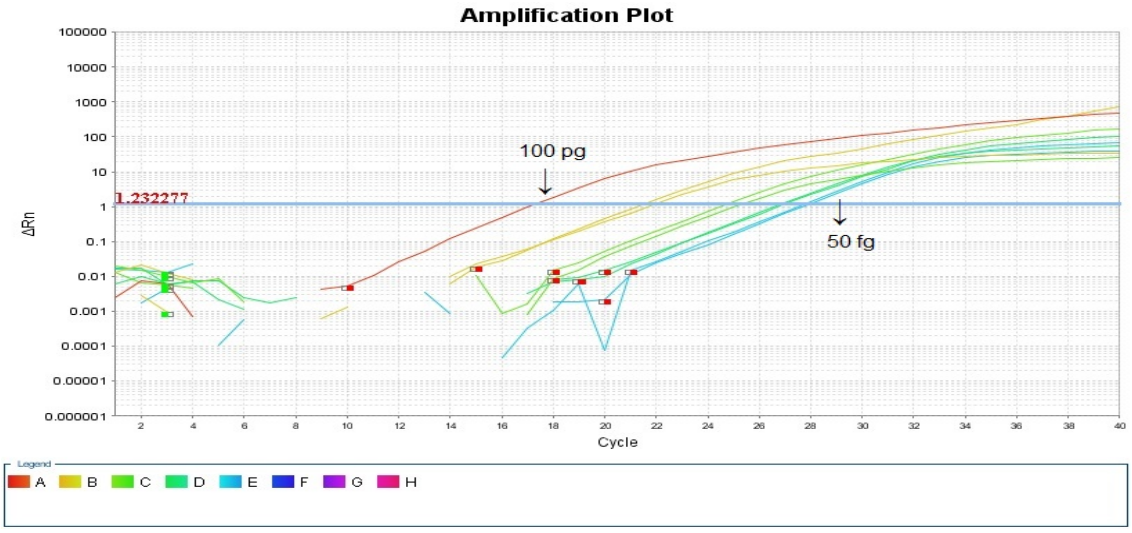
نتایج تعیین توالی: تعیین توالی محصول PCR نیز کاملاً اختصاصی باکتری و قطعه‌ی هدف بود.



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR، شماره چاهک‌ها به‌ترتیب از سمت راست به چپ: چاهک شماره ۱: مارکر ۱۰۰ bp (ساخت شرکت Fermentas، کشور آمریکا)، چاهک۲: 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



تصویر شماره ۲: نمودارهای Melting مربوط به سه پرایمر universal، *B.melitensis* و *B. abortus* که به‌ترتیب در دمای ۸۲/۵، ۸۴ و ۸۷ درجه سانتی‌گراد از یکدیگر قابل‌تفریق 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 اندازه‌گیری حساسیت پرایمر

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

بحث

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 ملی‌تنسیس و بروسلا آبورتوس داشت. در سالیان اخیر، چندین محقق تکنیک‌های Real-time PCR با حساسیت و اختصاصیت‌های منحصربه‌فرد 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 تکثیریافته DNA هدف با توجه به اختلاف طول محصولات در نظر گرفته‌شده بر روی ژل آگار درخصوص باکتری‌های *B.melitensis* (طول محصول تکثیرشده، ۲۸۵ جفت باز) و *B. abortus* (طول محصول تکثیرشده، ۱۲۱ جفت باز) از یکدیگر قابل‌تفریق 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 Tm ۸۴ و ۸۷ درجه سانتی‌گراد در یک نمونه ایجاد می‌شوند. آن‌ها درصورتی ایجاد می‌شوند که انجام آزمایش به‌صورت 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 نیازنداشتن 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 می‌شود (۲۶،۲۵). در این مطالعه، حساسیت و اختصاصیت سه ژن هدف *ITS*، *BMEII-0466* و *BruAB2-0168* ارزیابی شدند. ژن‌های هدف بسیار اختصاصی هستند. تکنیک Real-time PCR با تعدادی از باکتری‌های دیگر به‌غیر از جنس بروسلا، ژنوم انسان و تعدادی قارچ ارزیابی گردید و هیچ‌گونه تکثیر غیراختصاصی در آن مشاهده نشد. نتایج به‌دست آمده با نتایج محققان دیگر که از ژن‌های هدف دیگری مانند ژن *IS711* استفاده کرده بودند، مقایسه شد و نتایج مشابهی به‌دست آمد (۲۷). کمترین میزان حساسیت آزمون انجام‌شده برای پرایمر همگانی و *B.abortus*، ۵۰ fg و برای *B.melitensis*، ۱۰۰ fg مشاهده شد که مشابه نتایج به‌دست‌آمده 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 ملی‌تنسیس ۱۵۰ fg است. حداقل میزان حساسیت حاصل‌شده با استفاده از ژن هدف *IS711* توصیف‌شده 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 انجام‌گرفته، این روش می‌تواند به‌صورت 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 محاسبه‌کردن تعداد کپی، ارزیابی کرد.

به‌نظر می‌رسد تکنیک Real-time PCR با استفاده از روش دمای ذوب مزایایی مانند: سریع‌بودن، بسته‌بودن سیستم از نظر آلودگی، نیازنداشتن به مراحل پس از PCR و اختصاصی‌بودن آزمون دارد. استفاده از ژن‌های *ITS*، *BMEII-0466* و *BruAB2-0168* به‌ترتیب برای شناسایی جنس بروسلا، بروسلا ملی‌تنسیس و بروسلا آبورتوس با انتخاب طول‌های متفاوت، درنظرگرفتن دمای ذوب اختصاصی، داشتن حساسیت لازم و با استفاده از ژن مرجع در نمونه‌های کلینیکی و ارزیابی‌های بیشتر بر روی نمونه‌های افراد مبتلا به بروسلوز، ممکن است بتواند به‌عنوان 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. بدین‌وسیله، از معاونت آموزشی، تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Christopher S, Umapathy 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 laborator-yfeatures 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. Cloeckaert 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. 8. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. Brucella ceti sp. nov.andBrucellapinnipedialis sp. nov.for Brucella strains with cetaceans and seals as their preferredhosts. 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 patientwith spinal osteomyelitis in New Zealand. J Clin Microbiol. 2006;44(12): 4363–4370.
10. ZeinalianDastjerdi M, FadaeiNobari 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. Trávniček,M. Importance of Serological Diagnostics in ovine Epididymitiscaused 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, etal. 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, Vasconcellos SA, et al. Diagnosis of Canine Brucellosis: Comparison between Serological and Microbiological Tests and a PCR Based on Primers to 16S-23S rDNA Interspacer. 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, DizaE,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 Ml, 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 greenI, 59-exonuclease and hybridization probe assay.Appl Environ Microbiol. 2003;69(8): 4753-4759.

25. Queipo-OrtunoMI, Colmenero JD, Reguera JM, Garcia-OrdonezMA, PachonME, GonzalezM,et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assayand melting curve analysis in serum samples. ClinMicrobiol Infect 2005;11(9):713–718.
26. Redkar R, Rose S, Bricker B, DelVecchio V. Real-time detection of Brucella abortus, Brucellamelitensis 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.