Cairo University

Faculty of Veterinary Medicine

Department of Microbiology, Immunology and Mycology

Name: **Omnia Mohamed El-Sayed**

Nationality: Egyptian

Date of birth: 30/ 8/ 1980

Place of birth: Giza

Specification: Microbiology, Immunology and Mycology

Thesis title: "Use of Polymerase Chain Reaction Assay for Differentiation of Vaccinal Strains 19 and RB51 among Brucella Field Isolates."

Supervisors: Prof. Dr. Salah El-Din Abd El-kreem Selim

Dr. Ihab Ibrahim Moussa

Dr. Adel Sayed Amin

Abstract

The diagnosis of brucellosis is the corner stone in any control and eradication program. Therefore, the main objective of the present study was to apply more advanced techniques for rapid and accurate diagnosis of Brucellosis that can overcome the draw backs of the traditional techniques. Firstly, DNA was successfully extracted from different Brucella strains. Different PCR assays were applied in the present study, either singly or in a multiplex format, that enable to detect and differentiate most of *Brucella* species. The PCR assay detection limit was evaluated in a preliminary study. The obtained results recommend the PCR assay as a valuable, rapid, very specific, highly sensitive and safe laboratory diagnostic test that can be used not only for detection of Brucella antigen either in culture or in clinical samples but also in differentiating most of virulent and vaccine strains.

جامعه القاهرة

كلية الطب البيطرى

قسم الميكروبيولوجيا

الأسم : أمنية محمد السيد أحمد

الجنسية : مصرية

تاريخ الميلاد : ١٩٨٠/٨/٣٠

جهة الميلاد : الجيزة

التخصص : ميكروبيولوجيا

عنوان الرسالة: استخدام اختبار البلمرة المتسلسل فى التمييز بين عترتى لقاح ١٩ و آربى ٥١ وعترات البروسيلا المعزولة من الحقل

المشرفين: أ.د. صلاح الدين عبد الكريم سليم

د. إيهاب ابراهيم موسى

أ. د. عادل سيد امين

المستخلص العربى

تهدف الرسالة الى استخدام تقنيات تفاعل البلمرة المتسلسل لتشخيص مرض البروسيلا كأحد الأختبارات الدقيقة و السريعة و الحساسة للحصول على اسرع النتائج بدلا من الطرق الكلاسيكية التى تستغرق وقتا طويلا و تفتقر الى الحساسية اللازمة للتمييز بين العترات المختلفة. فى البدء تم استخلاص الحمض النووى الخاص بميكروب البروسيلا من جميع العترات التى خضعت للأختبار و في دراسة أولية تم تقييم حساسية الاختبار باستخدام زوجين مختلفين من بادئات التفاعل. ثم تم تطبيق عدة اختبارات مختلفة من اختبار البلمرة المتسلسل باستخدام عدة أزواج مختلفة من بادئات التفاعل إما في صورة فردية أو في صورة مركبة حتى تم التمييز والتفريق بنجاح بين كل عترات البروسيلا المختلفة المستخدمة .

TABLE OF CONTENTS

	Page
1. INTRODUCTION	**01**
2. REVIEW OF LITERATURE	**06**
2.1. Brucella vaccines	06
2.1.1. Strain-19	08
2.1.2. Rev. 1	
2.1.3. RB51	12
2.2. DNA of *Brucella* species	17
2.3. Diagnosis of Brucellosis	26
2.3.1. Diagnosis by conventional methods	26
2.3.1.1. Isolation and identification	26
2.3.1.2. Serological and immunological diagnosis of Brucellosis	29
2.3.2. Detection of Brucella DNA by PCR	34
2.3.2.1. Reference strains:	34
2.3.2.2. Diagnosis of Brucellosis in field samples	43
2.3.3. Detection and differentiation of Brucella vaccines	53
2.3.3.1. Using classical methods	53
2.3.3.2. Using recent techniques	55
3. MATERIALS and METHODS	**60**
3.1. Materials	60
3.1.1. Brucella strains	60
3.1.2. Clinical samples	60

3.1.3. Chemicals and reagents 61
3.1.4. Equipment 65
3.2. Methods 66
3.2.1. Prepration of different Brucella strains 66
3.2.2. Extraction of the Brucella genomic DNA 66
3.2.3. Visualization of extracted DNA 69
3.2.4. Quantitation of extracted DNA 69
3.2.5. DNA amplification by PCR assay 70
3.2.6. Application of PCR on field samples 72
3.2.7. Procedures adopted to avoid cross contamination and carry over contamination during PCR 72
3.2.8. Visualization of PCR products 73
3.2.9. PCR limit of detection of Brucella DNA 73
4. RESULTS 74
4.1. Extraction of DNA 74
4.2. The Sensitivity of the PCR assay 76
4.3 PCR amplification assays for detection and identification of Brucella 78
5. DISCUSSION 91
6. SUMMARY 101
7. REFERENCES 104

List of Abbreviations

A_{260}:	OD at wave length 260 nm.
A_{280}:	OD at wave length 280 nm.
AMOS:	Abortus, Melitensis, Ovis and Suis
B.:	Brucella.
Bp:	base pair.
CFU:	Colony forming unit.
DNA:	Deoxyribonucleic acid.
dNTPs:	deeoxy nucleotide triphosphates.
EDTA:	Ethelyne diamine Tetra acetic acid.
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay.
ERIC:	Enterobacterial Repetitive Intergenic consensus.
IgG:	Immunoglobuline.
IS711:	Insertion sequence 711.
KDa:	Kilodalton.
M:	Molar.
MRT:	Milk Ring Test.
NET:	N (Sodium Chloride), E(EDTA) and T(Tris).
OIE:	Office International Des Epizootic.
Omp2A gene:	outer membrane protein 2A gene.
PCR:	polymerase chain reaction.
Pst 1:	restriction enzyme.
RB51:	*B. abortus strain RB51* (vaccine strain).
RBPT:	Rose Bengal Plate test.
REP:	Repetitive Extragenic Palindromic sequence.
RFLP:	Restriction fragment length Polymorphism.
S19:	*B. abortus strain 19* (vaccine strain).
SAT:	Slow Tube Agglutination Test.
SDS:	Sodium dodocyle sulphate.
16 S r RNA:	16 subunit ribosomal ribonucleic acid
Spp:	Species.
RAPD:	randomly amplified polymorphic DNA
TBE:	Tris borate EDTA
TE:	Tris EDTA