

## شناسایی همزمان و مقایسه بروسلahای بیماری زا در بین نمونههای سرمی و خون انسان به روش Multiplex PCR و تأیید نتایج آن با روش PCR-RFLP

الناز اکبرزاده<sup>۱</sup>، جمیله نوروزی<sup>۲</sup>، وهاب پیرافر<sup>۳</sup>، داریوش قاسمی<sup>۴</sup>، شیوا میرکلانتری<sup>۵</sup>، رضا میرنژاد<sup>۶</sup>

۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه ازاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲. دکتری میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه ازاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۳. کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران.

۴. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران.

۵- دکتری باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.

۶. دکتری باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران (مؤلف مسؤول)، تلفن ثابت: ۰۲۱-۸۸۰۳۹۸۸۳

rmirnejad@yahoo.com

### چکیده

**مقدمه:** مطالعات کمی در خصوص جداسازی بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس عامل بروسلوزیس از سرم بیماران انجام است، این مطالعه با هدف جداسازی همزمان بروسلahای بیماری زا از نمونههای سرمی انسان به روش Multiplex PCR طراحی گردید.

**روش ها:** در این مطالعه آزمایشگاهی، ۵۰ نمونه خون و سرم بیمار مشکوک با علامت بالینی بروسلوزیس، پس از تیترسنجی به محیط کشت بروسلا اگار تلقیح شده و برای تشخیص، از تکنیک مولکولی Multiplex-PCR با سه پرایمر استفاده شد. به منظور کشت نمونههای سرم، ۰/۵ ml از سرم در بروسلا براث تلقیح شده و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس و ۵٪ گاز دی اکسید کربن، گرمخانه گذاری شد. برای تأیید نتایج PCR، محصولات PCR با استفاده از آنزیم های برش دهنده TaqI و RsaI مطابق مطالعات قبلی تحت برش آنزیمی قرار گرفتند.

**یافته ها:** از میان ۵۰ نمونه خون ۴ مورد (۸٪) کشت مثبت بودند که هر ۴ مورد (۱۰٪) پس از بررسی خصوصیات و انجام تست های بیوشیمیایی و افتراقی به عنوان بروسلا ملی تنسیس شناسایی شدند. پس از انجام Multiplex PCR، ۹ مورد (۱۸٪) مثبت و ۴۱ مورد (۸۲٪) منفی بودند. در میان موارد مثبت سرم، باند مربوط به بروسلا ملی تنسیس در ۷ مورد (۷۸٪) و باند مربوط به بروسلا آبورتوس در ۲ مورد (۲۲٪) مشاهده گردید. از مجموع ۵۰ نمونه خون ۵ مورد (۱۰٪) مثبت و ۴۵ مورد (۹۰٪) منفی بودند که در تمامی آنها (۱۰٪) باند مربوط به بروسلا ملی تنسیس مشاهده گردید. تمام نتایج با روش PCR\_RFLP تأیید شد.

**نتیجه گیری:** مطالعه ما نشان داد که این روش ساده و سریع بوده و حساسیت آن برای جداسازی بروسلahها (به خصوص بروسلا آبورتوس و ملی تنسیس) از سرم در مقایسه با خون کامل، بیشتر است.

**کلمات کلیدی:** بروسلا، Multiplex-PCR، سرم خون، PCR-RFLP

وصول مقاله: ۹۳/۴/۱۶ اصلاحیه نهایی: ۹۳/۷/۱۹ پذیرش: ۹۳/۹/۱۹

**مقدمه**

امروزه روش‌های متعددی بر پایه PCR، جهت تشخیص جنس و گونه‌های مختلف بروسلوza از نمونه‌های کلینیکی مثل خون بیماران مبتلا به انواع حاد، نیمه حاد و مزمن بروسلوza طراحی و ابداع شده است (۱۲ و ۱۱ و ۹)؛ در حالیکه استفاده از نمونه‌های سرم بیماران علیرغم برتری‌های متعددی چون حذف اثر مواد ضد انعقاد و هموگلوبین، به عنوان ممانعت کننده‌های عمدۀ در واکنش<sup>۲</sup> PCR به علت مشکلات مربوط به جداسازی ژنوم باکتریایی، نسبت به بقیه روش‌های مولکولی تشخیص از خون کامل، کمتر مورد توجه قرار گرفته است (۱۴ و ۱۳). با توجه به اینکه مطالعات کمی در خصوص جداسازی این باکتری‌ها در سرم بیماران انجام شده است، این مطالعه با هدف جداسازی همزمان بروسلهای بیماری زا از نمونه‌های سرمی انسان به روش Multiplex PCR انجام گردید.

**روش بررسی****تهیه نمونه‌های بالینی**

در این مطالعه آزمایشگاهی، ۵۰ نمونه خون از بیماران مشکوک با علائم بالینی بروسلوza، در طی ۵ ماه (مهرماه ۱۳۹۱ لغایت بهمن‌ماه ۱۳۹۱) از مرکز درمانی استان کرمان جمع‌آوری شد. از افراد بعد از بررسی تیتر آنتی بادی بروسلوza، ۵-۱۰ میلی‌لیتر خون توسط فرد متخصص گرفته شده و سپس سرم آن‌ها جدا گردید. سعی گردید زمان خون گیری در هنگام تب و لرز بیمار باشد. در ادامه نمونه‌های خون در ویال حاوی محیط کشت BHI براحت تلقیح شده و به همراه نمونه‌های سرم به آزمایشگاه ارسال شدند. سوش‌های استاندارد بروسلابورتوس S19 و BHI میکروب‌شناسی ۱۶M از گروه دانشگاه تهران، به عنوان نمونه‌های کنترل مثبت تهیه شدند.

**امروزه بروسلوza در جوامع در حال توسعه و برخی از کشورهای پیشرفته به عنوان مسئله ملی مد نظر است (۱).** شیوع این بیماری عفونی در میان کشورهای خاورمیانه (عربستان سعودی، ایران، فلسطین، سوریه، اردن و عمان)، آسیای مرکزی و آمریکای جنوبی سالانه به بیش از ۵۰۰ هزار مورد جدید می‌رسد (۲). تشخیص سریع و دقیق این عوامل، در پیشگیری از همه‌گیری و خسارت بیشتر بسیار با اهمیت هستند (۳). اما تشخیص بروسلوza دشوار است زیرا علائم و نشانه‌های بروسلوza انسانی اختصاصی نیستند. در حقیقت تشخیص بروسلوza نمی‌تواند بر اساس نشانه‌های بالینی باشد چرا که با بیماری‌های دیگری همچون مalaria، تیفوئید و لپتوسپیروز اشتباه گرفته می‌شود (۴-۶). قابل اطمینان ترین روش برای تشخیص این بیماری، جداسازی باکتری از خون، سرم یا بافت‌های آلوده به وسیله روش‌های متداول کشت و بررسی ویژگی‌های فوتیبی است (۷). اما کشت بروسلابا با توجه به سخت رشد بودن بروسلابا وقت‌گیر، پرخطر و هزینه بر بوده و همیشه نیز مثبت نیست (۳)، لذا می‌تواند درمان را به تأخیر بیندازند به همین دلیل تست‌های سرولوژیکی که مهم‌ترین آن‌ها<sup>۱</sup> SAT (تست آگلوتیناسیون سرمی استاندارد) است، جایگزین روش کشت شده است (۸). تست‌های سرولوژیکی که معمولاً برای شناسایی بروسلابا مورد استفاده قرار می‌گیرند، گاهی به علت واکنش متقاطع با سایر باکتری‌های گرم منفی، نتایج غیراختصاصی را نشان می‌دهند (۹). با توجه به آن که بیماری بروسلوza هنوز مشکل عمدۀ بهداشتی در انسان به خصوص در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌گردد (۱۰)، تکنیک‌های تشخیص مولکولی به عنوان ابزارهای کلیدی به منظور پیشگیری، تشخیص و پیگیری درمان بیماری در انسان با هدف شناسایی سریع و شروع درمان آنتی بیوتیکی مناسب و به موقع ضرورت می‌یابد.

<sup>2</sup>-Polymerase chain reaction (PCR)

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرددستان/دوره بیستم/فدوردهن و اردیبهشت ۱۳۹۶

<sup>1</sup>-Standard Agglutination Test (SAT)

ریخته شد و ماده باقیمانده در ۴۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل قرار داده شد و در بن ماری ۱۰۰ درجه سلسیوس به ۱۰ دقیقه جوشانده شد. میکروتیوب روی یخ سرد شد و سپس در دور  $9 \times 15000$  به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفوژ شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید (۱۵). در نهایت خلوص DNA استخراج شده و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر Nanodrop مورد سنجش قرار گرفت. DNA های استخراج شده علاوه بر ارزیابی توسط اسپکتروفوتومتر، بر روی ژل ۱ درصد نیز الکتروفورز شدند.

#### تهیه پرایمرها

طراحی پرایمرهای منتخب بر مبنای پلی مورفیسم در موقعیت اختصاصی گونه بروسلای از عنصر ژنتیکی IS711 در کروموزوم انجام شد. به عبارت دیگر طراحی Multiplex PCR در این مطالعه، شامل یک پرایمر مشترک به نام IS711 (اختصاصی جنس بروسلای) و دو پرایمر مختص گونه بوده است که هر کدام به یک توالی منحصر بفرد در کنار ناحیه الحق شده، متصل می‌گردند.

توالی های به کار رفته در این مطالعه، یک سکانس ۵'-TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3' مشترک بین گونه ها و پرایمر Forward برای بروسلای ملی تنسیس شامل ۵'-AAATCGCGTCCTGCTGGTCTGA-3' و یک پرایmer Forward برای بروسلای آبورتوس شامل ۵'-GACGAACGGAATTTCATCCC-3' بود.

#### اجرای Multiplex PCR

به منظور بهینه سازی شرایط، با استفاده از ژنوم سویه های استاندارد بروسلای ملی تنسیس ۱۶M و بروسلای آبورتوس S19 به عنوان الگو، واکنش Multiplex PCR با مقادیر مختلف پرایمرها و dNTP، MgCl<sub>2</sub> Master Mix (Taq پلی مراز) انجام شده و همچنین بروفایل های حرارتی و زمان در واکنش تعییر داده شد تا بهترین شرایط فراهم شود. در نهایت، واکنش PCR در میکروتیوب های استریل

#### کشت باکتری

جهت انجام کشت خون، ویال های حاوی محیط کشت BHI برات به مدت چهار هفته (به علت کند رشد بودن بروسلای در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در حضور ۵ درصد دی اکسید کربن گرم خانه گذاری شد. پس از این مدت، به منظور غنی سازی بروسلاهای موجود در نمونه، با سرنگ، مقدار ۱ ml از محیط داخل ویال کشیده شد و درون لوله سرپیچ دار حاوی بروسلای برات تلقیح شد. همین طور به منظور کشت نمونه های سرم، با سرنگ ۲ ml، حداکثر مقدار ۰/۵ ml از سرم کشیده شد و درون لوله سرپیچ دار حاوی بروسلای برات تلقیح شد. سپس لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط کم هوایی (با ۰/۵٪ CO<sub>2</sub>) و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از این مدت لوله ها از انکوباتور خارج شده، مقدار ۰/۵ ml از محتویات هر لوله بر روی دو پلیت حاوی بروسلای آگار به صورت خطی کشت داده شد. در نهایت یک گروه از پلیت ها در شرایط کم هوایی با ۵٪ CO<sub>2</sub> و گروه دیگر در شرایط هوایی و بدون ۵٪ CO<sub>2</sub> در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸-۷۲ ساعت انکوبه گردیدند.

در صورت مشاهده رشد باکتری، به منظور اطمینان از عدم آلدگی، از کلنی های ایجاد شده بر روی محیط بروسلای آگار در ۳ نوبت کشت خطی تهیه شده و هر نوبت به مدت ۷۲ ساعت در شرایط کم هوایی با ۵٪ CO<sub>2</sub> و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از مشاهده کلنی تک، نمونه های مثبت رنگ آمیزی شده و با روش های بیوشیمیابی و تست های افتراقی، جهت تأیید نهایی گونه بروسلای مورد بررسی قرار گرفتند.

#### استخراج DNA از سرم

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه در میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و در دور  $9 \times 15000$  به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و بخش رویی دور ریخته شد. رسوب باقیمانده در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل قرار داده شد و در دور  $9 \times 15000$  برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. دوباره مایع رویی دور

همراه با مارکر وزن مولکولی الکتروفورز گردیدند. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، باندهای ایجاد شده توسط دستگاه Trans illuminator مشاهده شد و از آنها عکسبرداری صورت گرفت.

### نتایج

#### کشت باکتری از خون و سرم

نتایج اولیه کشت پس از گذشت ۷۲ ساعت الی ۱۰ روز بررسی شدند. از میان ۵۰ نمونه خون متعلق به ۵۰ بیمار مشکوک به بروسلوزیس، ۴ مورد (۸٪) کشت مثبت بودند که هر ۴ مورد (۱۰٪) پس از بررسی خصوصیات کلتهای بر روی محیط بروسلا آگار، رنگ آمیزی گرم و انجام تست های بیوشیمیایی و افتراقی به عنوان بروسلا ملی تنیسیس شناسایی شدند. نتیجه کشت کلیه نمونه‌های سرمی متعلق به بیماران ذکر شده (۱۰٪) منفی بود.

#### نتایج PCR نمونه‌های بالینی

از مجموع ۵۰ نمونه سرم متعلق به افراد مشکوک به بروسلوزیس، پس از انجام Multiplex PCR و ژل الکتروفورز، ۹ مورد (۱۸٪) مثبت و ۴۱ مورد (۸۲٪) منفی بودند. در میان موارد مثبت سرم، باند مربوط به بروسلا ملی تنیسیس در ۷ مورد (۷٪) و باند مربوط به بروسلا ابورتوس در ۲ مورد (۲٪) مشاهده گردید (شکل ۱).

از مجموع ۵۰ نمونه خون متعلق به افراد ذکر شده، پس از انجام Multiplex PCR و ژل الکتروفورز، ۵ مورد (۱۰٪) مثبت و ۴۵ مورد (۹۰٪) منفی بودند که در تمامی آنها (۱۰٪) باند مربوط به بروسلا ملی تنیسیس مشاهده گردید. لازم به ذکر است که کلیه موارد PCR مثبت خون، از نظر PCR نمونه‌های سرم مربوط به آنها نیز مثبت شدند.

#### نتایج مربوط به PCR-RFLP

الگوی برش آنزیمی توسط آنزیم RsaI برای محصولات PCR مثبت بروسلا ملی تنیسیس به صورت قطعات ۶۲۸ bp و ۱۰۵ bp و الگوی برش آنزیمی توسط آنزیم TaqI برای محصولات PCR مثبت بروسلا ابورتوس به صورت قطعات

۱۰ میلی لیتری به وسیله ۲ جفت پرایمر اختصاصی جهت شناسایی بروسلا ابورتوس و بروسلا ملی تنیسیس در نمونه‌ها، به صورت ذیل تنظیم شد. میزان  $\mu\text{L}$  ۱۵ میکرومیکس (۱X PCR Buffer, 2.5 U taq DNA polymerase, (2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15mM dNTP),  $\mu\text{L}$  ۲ پرایمر با غلظت ۲۰ پیکومول،  $\mu\text{L}$  ۵ الگو (۰.۵ میکرو گرم) و  $\mu\text{L}$  آب مقطر در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر و در طی ۳۰ سیکل، تحت برنامه زمانی ترموسایکلر شامل: مرحله باز شدن ۲ رشته DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، مرحله باز شدن ۲ رشته به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، مرحله اتصال پرایمرها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۶ درجه سلسیوس، مرحله طویل شدن رشته هدف به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد.

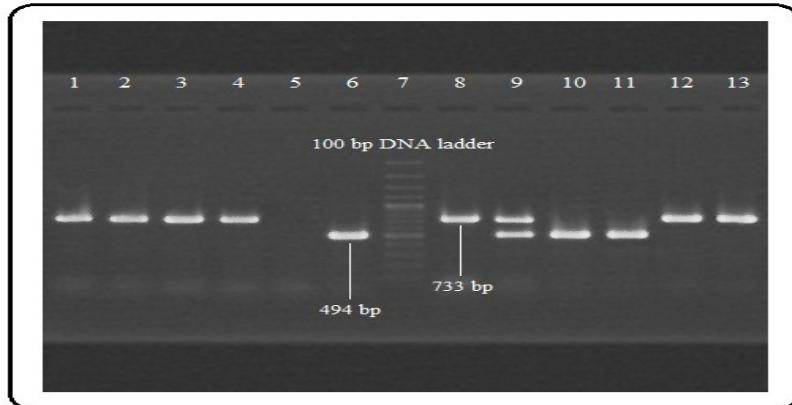
پس از اتمام سیکل‌ها، محصول PCR در کنار مارکر وزن مولکولی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، با ولتاژ ۸۰ ولت، حدود ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید و بر روی دستگاه ترانس لومیناتور، باندهای مربوطه مورد ارزیابی قرار گرفتند. مابقی محصول PCR نیز در ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد.

#### اجرای PCR-RFLP

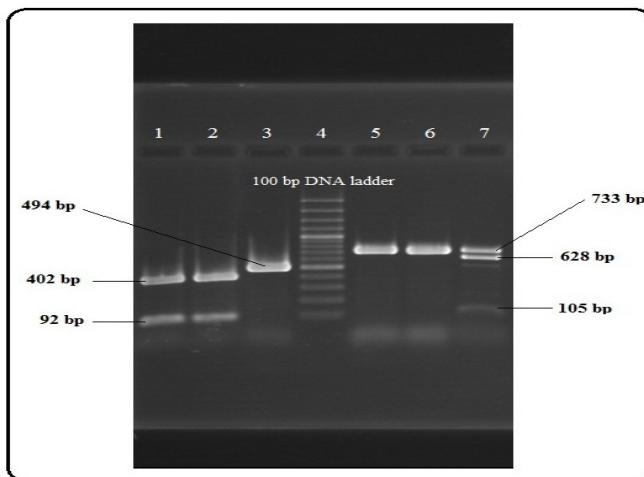
برای تأیید نتایج PCR، محصولات PCR با استفاده از آنزیم های برش دهنده RsaI و TaqI و مطابق مطالعات قبلی تحت برش آنزیمی قرار گرفتند (۶).

ترکیب واکنش برای انجام PCR-RFLP  $1.5 \mu\text{l}$  بافر ۷  $\mu\text{l}$  آنزیم برش دهنده (10-20  $\mu\text{u}/\mu\text{l}$ )،  $10\text{-}20\text{X}$  مخصوص PCR،  $6.3 \mu\text{l}$  آب مقطر استریل (-nuclease-) بود. که بعد از تهیه آن حاوی آنزیم های جداگانه، میکروتیوب های حاوی آنزیم های RsaI در بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت و میکروتیوب های حاوی آنزیم TaqI در ترموبلاک با دمای ۶۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند. بعد از دو ساعت، محصولات آنزیمی ر روی ژل آگارز با غلظت ۲٪

بالینی مورد تأیید قرار گرفتند (شکل ۲). ۹۲ bp و ۴۰۲ bp بالینی ایجادشده و بدین ترتیب، محصولات PCR مثبت



شکل ۱: محصول PCR حاصل از تکثیر توالی‌های اختصاصی بروسلا ابورتوس و بروسلا ملی تنسیس در نمونه‌های بالینی. چاهک شماره ۷: مارکر (100 bp); چاهک شماره ۶: کنترل مثبت بروسلا ابورتوس؛ چاهک شماره ۸: کنترل مثبت بروسلا ملی تنسیس؛ چاهک شماره ۹: کنترل مثبت



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز برش آنزیمی بروسلا ابورتوس و بروسلا ملی تنسیس.

چاهک ۱ و ۲: محصول PCR مثبت بروسلا ابورتوس که تحت برش آنزیمی با آنزیم اختصاصی TaqI قرار گرفته و برش خورده است؛ چاهک ۳: محصول PCR مثبت بروسلا ابورتوس که تحت برش آنزیمی قرار نگرفته و به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است؛ چاهک ۴: مارکر (100bp DNA ladder, SM#333)؛ چاهک ۵: محصول PCR مثبت بروسلا ملی تنسیس که تحت برش آنزیمی قرار نگرفته و به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است؛ چاهک ۶: محصول PCR مثبت بروسلا ملی تنسیس که تحت برش آنزیمی با آنزیم اختصاصی TaqI قرار گرفته و برش خورده است؛ چاهک ۷: محصول PCR مثبت بروسلا ملی تنسیس که تحت برش آنزیمی با آنزیم اختصاصی RsaI قرار گرفته و برش خورده است.

نتایج تست تعیین اختصاصیت پرایمرها  
نتایج تعیین میزان اختصاصی بودن هر یک از جفت پرایمرهای مورد استفاده با ژنوم گونه‌های نزدیک شامل

آگار ۸٪ ارزیابی شد و کشت هیچ یک از نمونه‌های سرم نتیجه‌ای در بر نداشت. تفاوت نتایج کشت در این مطالعه با نتایج محققان ذکر شده می‌تواند به نوع محیط‌های کشت به کاربرده شده و نیز نوع نمونه کشت شده مربوط باشد که می‌تواند حساسیت روش کشت را تحت تأثیر قرار دهد. در هر صورت با توجه به نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که خون نمونه مناسب تری برای کشت در مقایسه با سرم باشد. مطالعات مختلف، حساسیت‌های گوناگونی را برای روش PCR با نمونه‌های سرم و خون قائل شده‌اند. Zerva و همکاران، در سال ۲۰۰۱، ۶۴٪ نمونه‌های سرم و ۶۱٪ نمونه‌های خون کامل را توسط روش PCR شناسایی نمودند (۱۳). همین طور Queipo-Ortuno و همکاران، در سال ۲۰۰۵ ۶۳٪ نمونه‌های سرم آزمایش شده توسط روش real-time PCR و ۶۰٪ نمونه‌های خون مورد بررسی با روش PCR-ELISA را مثبت گزارش کردند (۱۵). در هر دو مطالعه، حساسیت روش مولکولی PCR با نمونه‌های سرم بیشتر از خون کامل ارزیابی شد. در بررسی حاضر نیز موارد مثبت بیشتری توسط روش Multiplex PCR با نمونه‌های سرم تشخیص داده شدند. به طوری که ۵۸٪ نمونه‌های سرم و تنها ۵۰٪ نمونه‌های خون با این روش مورد شناسایی قرار گرفتند. بنابراین نتایج این مطالعه با نتایج تحقیقات صورت گرفته توسط این محققان همخوانی داشت. این در حالی است که Mitka و همکاران، در سال ۲۰۰۷ و Al-Ajlan و همکاران، در سال ۲۰۱۰ به نتایج متفاوتی دست یافتند. آن‌ها استفاده از نمونه‌های خون برای تشخیص بروسلوزیس را مناسب تر از سرم عنوان نمودند که بر خلاف نتایج مطالعه حاضر بود (۲۰ و ۱۹) با وجود یکسان بودن نوع نمونه‌ها، این تفاوت می‌تواند به علت نحوه استخراج ژنوم و یا شرایط مختلف موجود در مراحل انجام PCR باشد.

این مطالعه همانند نتایج تحقیق Kumar و همکاران، در سال ۲۰۱۱ نشان داد که روش مولکولی Multiplex PCR دارای مزیت‌هایی جهت شناسایی و افتراق بروسلالا است

مهمه علمی دانشگاه علوم پزشکی گرددستان/دوره بیستم/فهودین و اردیبهشت ۱۳۹۶

پرسپیبا انتروکولیتیکا نشان داد که پرایمرها کاملاً اختصاصی بوده و تنها با گونه‌های بروسلالا واکنش می‌دهند.

#### نتایج تست تعیین حساسیت PCR

با توجه به این که غلظت DNA ژنومی در نمونه اولیه برای سوش‌های استاندارد بروسلالا/بورتوس S19 و بروسلالا ملی تنسیس ۱۶M ng/ $\mu$ l ۹۵۵ بوده است، برای محاسبه حساسیت واکنش چندین رقت تهیه گردید و سپس برای رقت‌های تهیه شده واکنش PCR انجام شد. نتیجه این بود که تا رقت  $10^{-4}$  (معادل  $10^{-2} \times 10^{-2} \text{ ng}/\mu\text{l} \times 10^{-2}$ ) از ژنوم اولیه باند حاصل شد ولی بهترین محصول در رقت  $10^{-3}$  (معادل  $10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) از DNA ژنومی اولیه به دست آمد.

#### بحث

در اغلب مطالعات صورت گرفته بر مبنای تکنیک PCR در تشخیص بروسلوزیس، نمونه‌های خون کامل مورد بررسی قرار گرفته‌اند. استفاده از سرم به جای خون کامل مزایای بسیاری را برای تکنیک‌های تکثیر اسید نوکلئیک به همراه دارد؛ از جمله این که اثر مانع کنندگی آنتی کواگولات، هموگلوبین، DNA انسانی و سایر عوامل حاضر در خون کامل در سرم از میان برداشته می‌شوند (۱۳).

Al-Nakkas و همکاران در سال ۲۰۰۵ به منظور کشت خون از سیستم BACTEC 9240 بهره برده و توسط این روش، از مجموع ۲۶۳ نمونه خون مشکوک به بروسلوزیس با تیتر سرمی بالاتر از ۱:۱۶۰، ۸۹ مورد مثبت را شناسایی نمودند (۱۶). کاظمی و همکاران، در سال ۲۰۰۸ و حسینی دوست و همکاران، در سال ۱۳۸۴، ۶۴٪ نمونه‌های بالینی را با روش کشت شناسایی کردند (۱۷). در مطالعه کاظمی و همکاران از نمونه‌های خون و محیط‌های کشت مایع Soya bean casein و تریپتون سویا براث استفاده شده بود و حسینی دوست و همکاران نیز نمونه‌های بالینی را در روش کشت به کاربردند. در مطالعه حاضر درصد موارد شناسایی شده توسط روش کشت کمتر بود، به طوری که موفقیت روش کشت خون با محیط‌های بروسلالا براث و

که بر خلاف سایر روش‌های معمول، کمتر تحت تأثیر آلدگی نمونه‌ها با میکرووارگانیسم‌های دیگر قرار می‌گیرد.

### نتیجه‌گیری

هرچند در مورد انجام Multiplex PCR با استفاده از ۳ پرایمر بر روی نمونه‌های سرمی مطالعات بیشتری لازم است، ولی به طور کلی می‌توان گفت که این روش ساده و سریع بوده و حساسیت آن برای جداسازی بروسلهای (به خصوص بروسلا ابورتوس و ملی تنفسی) در مقایسه با خون بیشتر است.

### تقدیر و تشکر

از کارکنان آزمایشگاه بیولوژی مولکولی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) به خاطر همکاری در اجرای این مطالعه کمال تشکر را داریم.

(۲۱). مهم‌ترین مزیت آن، شناسایی و افراق بروسلهای از یکدیگر در مدت زمان کوتاه است. تشخیص و افراق بروسلهای از یکدیگر با روش‌های معمول چندین روز به طول می‌انجامد که می‌تواند در درمان سریع افراد بسیار مهم باشد. از مزایای دیگر این روش، نیاز کم به نمونه می‌باشد، همان طور که این مطالعه نشان داد که روش Multiplex PCR قدرت شناسایی  $9/5 \text{ ng} / \mu\text{l}$  ژنوم را در نمونه‌ها دارد. همچنین برای انجام Multiplex PCR نیازی به ارگانیسم زنده بروسلا که یک خطر بالقوه برای کارکنان آزمایشگاه می‌باشد نیست، لذا می‌تواند در آزمایشگاه‌های بالینی به عنوان یک روش مطمئن و ایمن مطرح گردد. در نهایت از مزیت‌های این روش، استفاده از پرایمرهایی با اختصاصیت بالا برای شناسایی و افراق گونه‌های بروسلا در نمونه است

### References

1. Ben-Tekaya H, Gorvel JP, Dehio C. Bartonella and Brucella-weapons and strategies for stealth attack. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2013;3: a010231
2. Zhen Q, Lu Y, Yuan X, Qiu Y, Xu J, Li W, et al. Asymptomatic brucellosis infection in humans: implications for diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection* 2013;19:E395-7.
3. Archibald LK, Reller LB. Clinical microbiology in developing countries. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7:302-5.
4. Parlak M, Guducuoglu H, Bayram Y, Cikman A, Aypak C, Kilic S, et al. Identification and determination of antibiotic susceptibilities of brucella strains isolated from patients in Van , Turkey by conventional and molecular methods. *International Journal of Medical Sciences* 2013;10:1406-11.
5. Elfaki MG, Uz-Zaman T, Al-Hokail AA, Nakeeb SM. Detection of brucella DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction .*Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2005;53:1-7.
6. Memish Z. Brucellosis control in Saudi Arabia: prospects and challenges. *Journal of Chemotherapy* 2001;13:7-11.
7. Musser JM, Schwartz AL, Srinath I, Waldrup KA. Use of serologyand bacterial culture to determine prevalence of brucella spp. In feral Swine (sus scrofa) in proximity to a beef cattle herd positive for brucella suis and Brucella abortus. *Journal of Wildlife Diseases* 2013;49:215-20.
8. Islam MA, Khatun MM, Werre SR, Sriranganathan N, Boyle SM. A review of brucella seroprevalence among humans and animals in Bangladesh with special emphasis on

- epidemiology, risk factors and control opportunities. *Veterinary Microbiology* 2013;166:317-26.
9. Kamal IH, Al Gashgari B, Moselhy SS, Kumosani TA, Abulnaja KO. Two-stage PCR assay for detection of human brucellosis in endemic areas. *BMC Infectious Diseases* 2013;13:145.
10. Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, Colmenero JD, Corbel MJ, Falagas ME, et al. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. *PLoS Medicine* 2007;4:e317.
11. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology* 2002;90:435-46.
12. Mirnejad R, Mohamadi M, Piranfar V, Mortazavi SM, Kachuei R. A duplex PCR for rapid and simultaneous detection of brucella spp. in human blood samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2013;6:453-6.
13. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:1661-4.
14. Debeaumont C, Falconnet PA, Maurin M. Real-time PCR for detection of brucella spp. DNA in human serum samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2005;24:842-5.
15. Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P. Comparison between lightcycler real-time polymerase chain reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. *Clinical Infectious Diseases* 2005;40:260-4.
16. Al-Nakkas A, Mustafa AS, Wright SG. Large-scale evaluation of a single-tube nested PCR for the laboratory diagnosis of human brucellosis in Kuwait. *Journal of Medical Microbiology* 2005;54:727-30.
17. Kazemi B, Namin SY, Dowlatshahi M, M Bandepour ,F Kafilzadeh, L Gachkar, et al. Detection of brucella by peripheral blood PCR and comparison with culture and serological methods in suspected cases. *Iranian Journal of Public Health* 2008;37:6.
18. Hosseini-Doust S R, Ahmadi A, Ahmadi Z, Hajia M ,Safiri Z, Golmanesh L. Detection of brucella abortus by PCR assay and comparison with culture assay. *Journal of Military Medicine* 2005;7:239-44.
19. 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;45:1211-8.
20. Al-Ajlan HH, Ibrahim AS, Al-Salamah AA. Comparison of different PCR methods for detection of brucella spp. in human blood samples. *Polish Journal of Microbiology* 2011;60:27-33.
21. Kumar S, Tuteja U, Sarika K, Singh D, Kumar A, Kumar O. Rapid multiplex PCR assay for the simultaneous detection of the brucella genus, *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2011;21:89-92.