مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/دوره بیستم/ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴ /۱۷-۱۰

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

الناز اکبرزاده[۱]، جمیله نوروزی[۲]، وهاب پیرانفر[۳]، داریوش قاسمی[۴]، شیوا میرکلانتری[۵]،رضا میرنژاد[۶]

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 بقیه ا...(عج)، تهران، ایران.

۴. کارشناس ارشد بیوتکنولوزی پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(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 بقیه ا...(عج)، تهران، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت: ۸۸۰۳۹۸۸۳-۰۲۱،
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 بروسلاهای 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 علائم 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 (۱۰۰٪) 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 ابورتوس* 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 (۱۰۰٪) باند مربوط به *بروسلا ملی تنسیس* مشاهده گردید. تمام نتایج با روش PCR_RFLP تایید شد.

نتیجه گیری: مطالعه ما نشان داد که این روش ساده و سریع بوده و حساسیت آن برای جداسازی بروسلاها (به خصوص بروسلا ابورتوس 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/20.1.2]

مقدمه

امروزه بروسلوزیس 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 می رسد (۲). تشخیص سریع و دقیق این عوامل، در پیشگیری از همه‌گیری و خسارت بیشتر بسیار با اهمیت هستند (۳). اما تشخیص بروسلوزیس دشوار است زیرا علائم و نشانه‌های بروسلوزیس انسانی اختصاصی نیستند. در حقیقت تشخیص بروسلوزیس نمی‌تواند بر اساس نشانه‌های بالینی باشد چرا که با بیماری‌های دیگری همچون مالاریا، تیفوئید و لپتوسپیروز اشتباه گرفته می‌شود (۶-۴). قابل اطمینان ترین روش برای تشخیص این بیماری، جداسازی باکتری از خون، سرم یا بافت‌های آلوده به وسیله روش‌های متداول کشت و بررسی ویژگی‌های فنوتیپی است (۷). اما کشت بروسلا با توجه به سخت رشد بودن بروسلا، وقت‌گیر، پرخطر و هزینه بر بوده و همیشه نیز مثبت نیست (۳)، لذا می‌تواند درمان را به تأخیر بیندازند به همین دلیل تست های سرولوژیکی که مهم‌ترین آن‌ها SAT[1] (تست آگلوتیناسیون سرمی استاندارد) است، جایگزین روش کشت شده است (۸) . تست‌های سرولوژیکی که معمولاً برای شناسایی بروسلا 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 بروسلوزیس هنوز مشکل عمده بهداشتی در انسان به خصوص در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌گردد (۱۰)، تکنیک های 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.

امروزه روش‌های متعددی بر پایه PCR، جهت تشخیص جنس و گونه‌های مختلف بروسلا از نمونه‌های کلینیکی مثل خون بیماران مبتلا به انواع حاد، نیمه حاد و مزمن بروسلوزیس طراحی و ابداع شده است (۱۲و ۱۱و ۹)؛ در حالیکه استفاده از نمونه‌های سرم بیماران علیرغم برتری‌های متعددی چون حذف اثر مواد ضد انعقاد و هموگلوبین، به عنوان ممانعت کننده‌های عمده در واکنش PCR[2] به علت مشکلات مربوط به جداسازی ژنوم باکتریایی، نسبت به بقیه روش های مولکولی تشخیص از خون کامل، کمتر مورد توجه قرار گرفته است (۱۴و ۱۳). با توجه به اینکه مطالعات کمی در خصوص جداسازی این باکتری‌ها در سرم بیماران انجام شده است، این مطالعه با هدف جداسازی همزمان بروسلاهای 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 بروسلوزیس، در طی ۵ ماه (مهرماه ۱۳۹۱ لغایت بهمن‌ماه ۱۳۹۱) از مراکز درمانی استان کرمان جمع‌آوری شد. از افراد بعد از بررسی تیتر آنتی بادی بروسلوزیس، ۱۰-۵ میلی‌لیتر خون توسط فرد متخصص گرفته‌شده 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 براث تلقیح شده و به همراه نمونه‌های سرم به آزمایشگاه ارسال شدند. سوش های استاندارد بروسلا ابورتوس S19 و بروسلا ملی تنسیس 16M از گروه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، به عنوان نمونه‌های کنترل مثبت تهیه شدند.

[1] -Standard Agglutination Test (SAT)

[2] -Polymerase chain reaction (*PCR*)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/20.1.2]

کشت باکتری

جهت انجام کشت خون، ویال های حاوی محیط کشت BHI براث به مدت چهار هفته (به علت کند رشد بودن بروسلا) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در حضور ۵ درصد دی اکسید کربن گرم خانه گذاری شد. پس از این مدت، به منظور غنی‌سازی بروسلاهای موجود در نمونه، با سرنگ، مقدار ml ۱ از محیط داخل ویال کشیده شد و درون لوله سرپیچ دار حاوی بروسلا براث تلقیح شد.

همین طور به منظور کشت نمونه‌های سرم، با سرنگ ml ۲، حداکثر مقدار ml ۰/۵ از سرم کشیده شد و درون لوله سرپیچ دار حاوی بروسلا براث تلقیح شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط کم هوازی (با CO_2 ۵٪) و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از این مدت لوله‌ها از انکوباتور خارج‌شده، مقدار ml ۰/۵ از محتویات هر لوله بر روی دو پلیت حاوی بروسلا آگار به صورت خطی کشت داده شد. در نهایت یک گروه از پلیت ها در شرایط کم هوازی با CO_2 ۵٪ و گروه دیگر در شرایط هوازی و بدون CO_2 ۵٪، در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه گردیدند.

در صورت مشاهده رشد باکتری، به منظور اطمینان از عدم آلودگی، از کلنی‌های ایجادشده بر روی محیط بروسلا آگار در ۳ نوبت کشت خطی تهیه‌شده و هر نوبت به مدت ۷۲ ساعت در شرایط کم هوازی با CO_2 ۵% و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از مشاهده کلنی تک، نمونه‌های مثبت رنگ‌آمیزی شده و با روش‌های بیوشیمیایی و تست های افتراقی، جهت تأیید نهایی گونه بروسلا مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA از سرم

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و در دور g x ۱۵۰۰۰ 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 g x ۱۵۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. دوباره مایع رویی دور ریخته شد و ماده باقیمانده در ۴۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل قرار داده شد و در بن ماری ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. میکروتیوب روی یخ سرد شد و سپس در دور g x ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفوژ شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید (۱۵). در نهایت خلوص DNA استخراج‌شده و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Nanodrop مورد سنجش قرار گرفت. DNA های استخراج‌شده علاوه بر ارزیابی توسط اسپکتروفتومتر، بر روی ژل ۱ درصد نیز الکتروفورز شدند.

تهیه پرایمرها

طراحی پرایمرهای منتخب بر مبنای پلی مورفیسم در موقعیت اختصاصی گونه بروسلا 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 بروسلا) و دو پرایمر مختص گونه بوده است که هر کدام به یک توالی منحصر بفرد در کنار ناحیه الحاق شده، متصل می‌گردند.

توالی‌های به‌کار رفته در این مطالعه، یک سکانس 5'-TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3' مشترک بین گونه‌ها و پرایمر Forward برای بروسلا ملی تنسیس شامل 5'-AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA-3' و یک پرایمر Forward برای بروسلا آبورتوس شامل 5'-GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC-3' بود.

اجرای Multiplex PCR

به منظور بهینه‌سازی شرایط، با استفاده از ژنوم سویه‌های استاندارد بروسلا ملی تنسیس 16M و بروسلا ابورتوس S19 به عنوان الگو، واکنش Multiplex PCR با مقادیر مختلف پرایمرها و Master Mix ($MgCl_2$، dNTP و Taq پلی مراز) انجام‌شده و همچنین پروفایل های حرارتی و زمان در واکنش تغییر داده شد تا بهترین شرایط فراهم شود. در نهایت، واکنش PCR در میکروتیوب های استریل

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/20.1.2]

۰/۲ میلی‌لیتری به وسیله ۲ جفت پرایمر اختصاصی جهت شناسایی بروسلا ابورتوس و بروسلا ملی تنسیس در نمونه‌ها، به صورت ذیل تنظیم شد. میزان ۱۵μL مسترمیکس (1X PCR Buffer, 2.5 U taq DNA polymerase, 2mM $MgCl_2$, 0.15mM dNTP)، ۲μL پرایمر با غلظت ۲۰ پیکومول، ۵μL DNA الگو (۰/۵ میکروگرم) و ۶μL 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 TaqI و RsaI مطابق مطالعات قبلی تحت برش آنزیمی قرار گرفتند (۶).

ترکیب واکنش برای انجام PCR-RFLP، 1.5 µl بافر 10X ، 0.2 µl آنزیم برش دهنده (10-20 u/µ) ، 7 µl محصول PCR، 6.3 µl آب مقطر استریل (nuclease-free) بود. که بعد از تهیه آن حاوی آنزیم های جداگانه، میکروتیوب های حاوی آنزیم های RsaI در بن‌ماری ۳۷ درجه سلسیوس به مدت 2 ساعت و میکروتیوب های حاوی آنزیم TaqI در ترموبلاک با دمای ۶۲ درجه سلسیوس به مدت 2 ساعت قرار داده شدند. بعد از دو ساعت، محصولات آنزیمی روی ژل آگارز با غلظت 2% همراه با مارکر وزن مولکولی الکتروفورز گردیدند. پس از رنگ‌آمیزی 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 (۱۰۰٪) پس از بررسی خصوصیات کلنی بر روی محیط بروسلا آگار، رنگ‌آمیزی گرم و انجام تست های بیوشیمیایی و افتراقی به عنوان بروسلا ملی تنسیس شناسایی شدند. نتیجه کشت کلیه نمونه‌های سرمی متعلق به بیماران ذکرشده (۱۰۰٪) 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 تنسیس در ۷ مورد (۷۸٪) و باند مربوط به بروسلا ابورتوس در ۲ مورد (۲۲٪) مشاهده گردید (شکل ۱).

از مجموع ۵۰ نمونه خون متعلق به افراد ذکرشده، پس از انجام Multiplex PCR و ژل الکتروفورز، ۵ مورد (۱۰٪) مثبت و ۴۵ مورد (۹۰٪) منفی بودند که در تمامی آن‌ها (۱۰۰٪) باند مربوط به بروسلا ملی تنسیس مشاهده گردید. لازم به ذکر است که کلیه موارد PCR مثبت خون، از نظر PCR نمونه‌های سرم مربوط به آن‌ها نیز مثبت شدند.

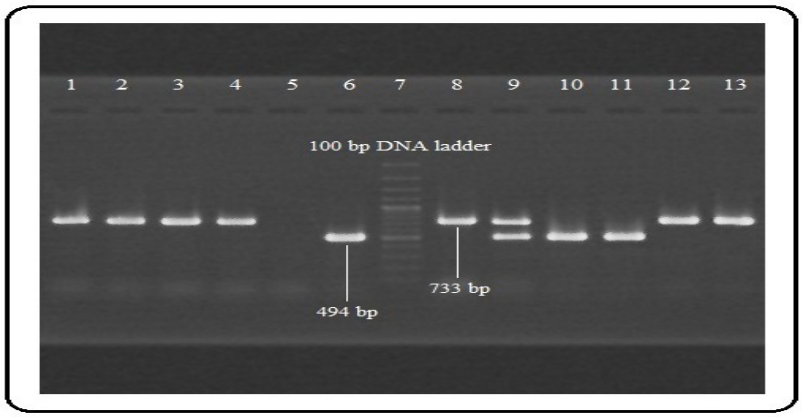
نتایج مربوط به PCR-RFLP

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

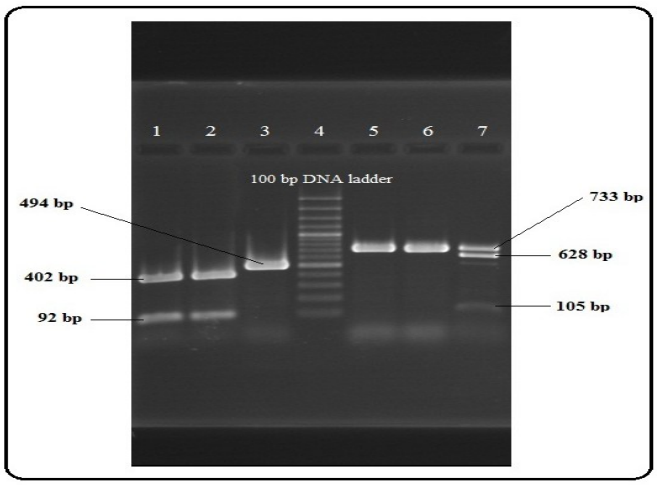
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/20.1.2]

bp ۴۰۲ و bp ۹۲ بود که این الگوها در تمامی موارد مثبت بالینی ایجادشده و بدین ترتیب، محصولات PCR مثبت بالینی مورد تأیید قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۱: محصول PCR حاصل از تکثیر توالی‌های اختصاصی بروسلا ابورتوس و بروسلا ملی تنسیس در نمونه‌های بالینی. چاهک شماره ۷: مارکر (۱۰۰ bp DNA ladder, SM#333)؛ 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 قرارگرفته 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 نخورده 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 *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اگروباکتریوم تومفاسینس*، *اشریشیا کلی* O157، *ویبریو کلرا*، *سالمونلا انتریتیدیس*،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/20.1.2]

یرسینیا انتروکولیتیکا نشان داد که پرایمرها کاملاً اختصاصی بوده و تنها با گونه‌های بروسلا واکنش می‌دهند.

نتایج تست تعیین حساسیت PCR

با توجه به این که غلظت DNA ژنومی در نمونه اولیه برای سوش های استاندارد *بروسلا ابورتوس* S19 و *بروسلا ملی تنسیس* 16M، ۹۵۵ ng/µl بوده است، برای محاسبه حساسیت واکنش چندین رقت تهیه گردید و سپس برای رقت‌های تهیه‌شده واکنش PCR انجام شد. نتیجه این بود که تا رقت $۱۰^{-۴}$ (معادل $۹/۵ \times ۱۰^{-۲}$ ng/µl) از ژنوم اولیه باند حاصل شد ولی بهترین محصول در رقت $۱۰^{-۲}$ (معادل ۹/۵۵ ng/µl) 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 قرارگرفته‌اند. استفاده از سرم به جای خون کامل مزایای بسیاری را برای تکنیک‌های تکثیر اسید نوکلئیک به همراه دارد؛ از جمله این که اثر ممانعت کنندگی آنتی کواگولانت ها، 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، ۴% نمونه‌های بالینی را با روش کشت شناسایی کردند (۱۸و 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 بافتی دامی را در روش کشت به کاربردند. در مطالعه حاضر درصد موارد شناسایی‌شده توسط روش کشت کمتر بود، به طوری که موفقیت روش کشت خون با محیط‌های بروسلا براث و آگار ۸٪ ارزیابی شد و کشت هیچ یک از نمونه‌های سرم نتیجه‌ای در بر نداشت. تفاوت نتایج کشت در این مطالعه با نتایج محققان ذکرشده می‌تواند به نوع محیط‌های کشت به‌کاربرده شده و نیز نوع نمونه کشت شده مربوط باشد که می‌توانند حساسیت روش کشت را تحت تأثیر قرار دهند. 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، ۴% نمونه‌های سرم و ۶۱% نمونه‌های خون کامل را توسط روش PCR شناسایی نمودند (۱۳). همین طور Queipo-Ortuno و همکاران، در سال ۲۰۰۵، ۳/۳% نمونه‌های سرم آزمایش‌شده توسط روش real-time PCR و ۰% 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 ۸% نمونه‌های سرم و تنها ۰% 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 (۲۰و 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 مولکولیMultiplex PCR دارای مزیت‌هایی جهت شناسایی و افتراق بروسلاها است

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/20.1.2]

(۲۱). مهم‌ترین مزیت آن، شناسایی و افتراق بروسلاها از یکدیگر در مدت زمان کوتاه است. تشخیص و افتراق بروسلاها 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 ۹/۵ ng/µl 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 افتراق گونه‌های بروسلا در نمونه است که بر خلاف سایر روش‌های معمول، کمتر تحت تأثیر آلودگی نمونه‌ها با میکروارگانیسم های 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 بروسلاها (به خصوص *بروسلا ابورتوس* و *ملی تنسیس*) 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.

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 indeveloping 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

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/20.1.2]

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 ofClinical 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 Health2008;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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-03-29]

[DOI: 10.22102/20.1.2]