

مطالعه و مقایسه روش های تشخیصی (کشت - مولکولی) بروسلا در نمونه های جدا شده از بیماران مشکوک به تب مالت در مناطق مختلف تهران

سارا طالب زاده^۱، سعید ذاکر بستان آباد^{۲*}، راضیه نظری^۲

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی و علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

۲. گروه بیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بروسلوزیس یک عامل عمده زئونوز بوده و در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران، یک مشکل اساسی بهداشت جامعه می باشد. روش های جدید تشخیصی که دارای حساسیت بالایی می باشد و خطر عفونت در پرسنل آزمایشگاهی را به حداقل رسانده و از اهمیت بالایی برخوردار است. از جمله روش هایی که این مزایا را دارد، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) است. در این مطالعه روش های تشخیصی (کشت - مولکولی) بروسلا در نمونه های جدا شده از بیماران مشکوک به تب مالت در مناطق مختلف تهران را مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها: ۱۰۰ بیمار مشکوک به بروسلوز دارای علائم بیماری به آزمایشگاه مسعود تهران، بیمارستان بقیه الله، علوم پزشکی ایران برای نمونه گیری از خون مراجعه کردند. هر نمونه در محیط کشت خون (کاستاندا) تلقیح شده و در شرایط دمایی 37°C و ۵% دی اکسید کربن، به مدت ۲۱ تا ۳۰ روز قرار گرفت. سویه های استاندارد بروسلا از آزمایشگاه رفرانس تهیه و در شرایط استاندارد نگه داری شدند. کلیه مقاله های منتشر شده در خصوص پرایمرهای اختصاصی بروسلا جمع آوری و بررسی گردید و پرایمر اختصاصی B4/B5 که یک قطعه ژنی ۲۲۳ bp را تکثیر می کنند مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: از ۱۰۰ نمونه خون گرفته شده از افراد مشکوک به بروسلوز، دو نمونه کشت مثبت شد و DNA توسط کیت سیناژن جدا شد و پس از انجام PCR، ۱۵ مورد مثبت شدند. حساسیت روش PCR، ۱۰۰ درصد و ویژگی آن ۸۶/۷۳ درصد تعیین شد.

بحث: این مطالعه نشان داد که روش PCR دارای آلودگی بیولوژیکی کمی است و از حساسیت و دقت بالایی برخوردار می باشد. **نتیجه گیری:** با توجه به اهمیت فراوان تشخیص مولکولی بیماری های عفونی، حتی در حد ۱۰ نانو گرم از DNA باکتری در نمونه های آزمایشگاهی و هم چنین در بالا بودن حساسیت روش استفاده شده در تشخیص این گونه بیماری ها براساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر و پژوهش های پیشین، تکنیک PCR در مقایسه با روش کشت به نظر می رسد که از حساسیت و دقت بالاتری برخوردار می باشد. لذا این موضوع می تواند دلیلی برای جایگزین شدن این روش به عنوان روش تشخیصی در آزمایشگاه ها باشد.

کلید واژه ها: بروسلوز، کشت، PCR

مقدمه

مخاطبی آن مشاهده می شود. (۷)

هر چند این باکتری دارای رشد هوازی است اما برخی گونه های آن در شرایط دارای ۱۰ درصد CO_2 رشد بیش تری دارند. جنس بروسلا بر اساس اختلاف های موجود در بیماری زایی و نوع میزبان اختصاصی از شش گونه تشکیل شده است: بروسلا ملی تن سیس (بز و گوسفند)، بروسلا آبورتوس (گاو و گاومیش)، بروسلا سوئیس (عامل اصلی در خوک و نیز خرگوش، جوندگان و گوزن)، بروسلا اویس (گوسفند)، بروسلا کانیس (سگ)، بروسلا نفوتومه (موش جنگلی). کشف باکتری بروسلا در پستانداران منجر به معرفی دو گونه بروسلا ستاسا عامل عفونت در دلفین ها و وال ها و بروسلا پینی پدیا عامل عفونت در خوک های آبی

بروسلا انگل اجباری حیوانات و انسان بوده و از مشخصه های آن، زیستن درون سلولی می باشد. بروسلا، هوازی و گرم منفی است. این ارگانسیم بدون اسپور بوده و کپسول در کلنی صاف و

نویسنده مسئول :

گروه بیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران

پست الکترونیکی : saeedzaker20@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۳۱

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۳۱

گردید. (۴، ۱۹)

انسان نسبت به ۴ گونه از شش گونه بروسلا حساس است. این گونه ها به ترتیب شدت بیماری زایی برای انسان عبارتند از: بروسلا ملی تنسیس، بروسلا سوئیس، بروسلا آبورتوس، بروسلا کانیس. بروسلا اویس و بروسلا نئوتومه برای انسان بیماری زا نیستند. دوره کمون بیماری در انسان بسیار متغیر است و غالباً تعیین آن مشکل است. (۸)

اختلاف بین این گونه ها و انواع بیووارها در حال حاضر بر اساس سروتایپینگ، حساسیت به رنگ ها، نیاز به CO_2 ، تولید H_2S و خواص متابولیک می باشد. (۶)

انتقال آن به انسان از طریق فرآورده های شیری آلوده و غیر پاستوریزه، تماس مستقیم با حیوان آلوده و یا استنشاق ذرات آئروسل آلوده اتفاق می افتد. تشخیص قطعی بروسلوزیس علی رغم استفاده از تکنیک های کشت و سرولوژیک به عنوان یک معضل باقی مانده است. (۲۰)

چندین روش متداول برای تشخیص بیماران بروسلوزیس استفاده می گردد که از جمله آن ها روش های کشت نمونه خونی بیمار می باشد که حساسیت آن به میزان ۵۳ تا ۹۰ درصد متغیر است. از روش های دیگر می توان به انواع تست های آگلوتیناسیون، الایزا و PCR اشاره کرد. در هنگام عدم وجود شرایط کشت، برای تشخیص بروسلوز به طور معمول از روش های سرولوژیکی و تست های آگلوتیناسیون استفاده می شود. این آنتی بادی ها مدت زمان طولانی در سرم بیماران وجود داشته و تشخیص آن برای بررسی میزان شیوع بیماری در مناطق اندمیک حایز اهمیت است. آنتی بادی تولید شده بر ضد لیپوپلی ساکاید صاف بروسلا تمایل زیادی به اتصال به باکتری های گرم منفی دیگر هم چون یرسینیا انتروکولیتیکا، ویبریو کلرا، اشرشیاکلی و فرانسسیلا تولرانزیس داشته و همین باعث افزایش اتصال اشتباه یا بوده که احتمال پاسخ کاذب نیز بالا Cross Reaction می رود. (۲، ۳، ۱۱) اگرچه روش کشت به عنوان روش استاندارد طلایی در تشخیص میکروبیولوژیک محسوب می شود اما به دلیل نیاز به محیط کشت اختصاصی، طولانی بودن مدت زمان رشد باکتری و لذا موارد منفی بسیار، از کارایی آن در تشخیص برخی میکروارگانیسم ها از جمله بروسلا کاسته شده است. با توجه به آنکه علائم بیماری تب مالت غیر اختصاصی است و اغلب با سایر بیماری های تب دار عفونی قابل اشتباه می باشد و از طرفی جداسازی عامل بیماری زا از خون و دیگر مایع های بدن به سادگی میسر نمی باشد. (۵) روش های متداول و مرسوم کنونی که در آزمایشگاه های تشخیص طبی، آزمایشگاه های تحقیقاتی و مواد غذایی به منظور تشخیص عوامل ایجاد کننده عفونت ها

می گردند دارای نقایص و معایب زیادی هستند در حالی که تکنیک PCR علاوه بر نداشتن این نقایص دارای مزایای زیادی از جمله دقت و سرعت بالا، قدرت تشخیص طیف وسیعی از عوامل بیماری زا در مقادیر بسیار کم و سادگی این روش را می توان نام برد. روش مولکولی PCR از لحاظ حساسیت از روش محیط کشت بهتر عمل می کند. در برخی مطالعه ها گزارش شده است که حساسیت و اختصاصی بودن روش PCR در تشخیص بروسلوزیس به میزان ۹۸ درصد است. (۱) برای تعیین گونه های بروسلا از روش های کلاسیک مانند: تست اوره آز، نیاز به CO_2 ، تولید H_2S ، رشد در محیط های حاوی تیونین و فوشین، آگلوتیناسیون و لیز با فائز اشاره کرد. (۱) مطالعه حاضر طراحی گردید تا روش های تشخیصی (کشت - مولکولی) بروسلا در نمونه های جدا شده از بیماران مشکوک به تب مالت در مناطق مختلف تهران مورد مقایسه و ارزیابی قرار گیرد.

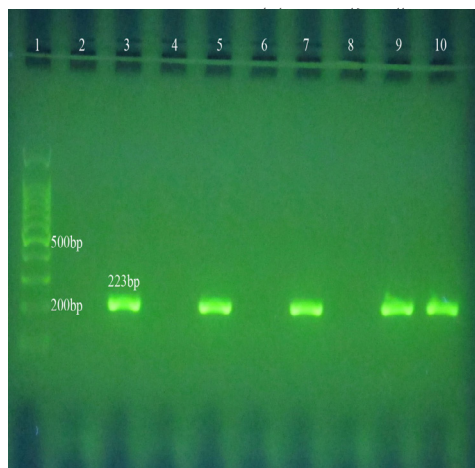
روش کار

نمونه گیری: طی این مرحله خون بیماران مشکوک به بروسلوز که مراجعه کننده به آزمایشگاه مسعود در تهران، بیمارستان بقیه الله و علوم پزشکی ایران بودند، جمع آوری گردید و تمامی نمونه های خون بالینی در محیط کشت اختصاصی کاستاندا کشت داده شد.

کشت: به منظور جدا سازی باکتری از خون، کشت در محیط دو فازی کاستاندا انجام شد. محیط کاستاندا از دو قسمت مایع و جامد تشکیل شده، که گلبول های قرمز لیز شده (رسوب داده) و تولید گاز مشخص کننده رشد باکتری می باشد. از هر فرد ۵ میلی لیتر خون گرفته شد که بلافاصله به محیط کشت کاستاندا اضافه گردید و محیط های کاستاندا در دمای $37^{\circ}C$ به مدت ۲۱ تا ۳۰ روز در انکوباتور قرار گرفته شد.

استخراج DNA: استخراج DNA طبق روش ارائه شده در کیت استخراج DNA (DNG Plus) از شرکت سیناژن انجام شد.

انجام PCR: طی این روش از پرایمرهای اختصاصی 3'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-5' و 3'-CGCGCTTGCTTTTCAGGTCTG-5' استفاده شد که منجر به تکثیر یک قطعه ۲۲۳ جفت بازی از توالی کد کننده یک پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی (BSCP31) در تمام گونه های استاندارد بروسلا و نیز نمونه های خون کامل گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از Master mix (خریداری شده از شرکت Ampliqon) بر روی نمونه های DNA استخراج شده از خون و همین طور جدا



شکل ۱: رنگ آمیزی ژل آگارز با (کیاژن)

Safe View-I DNA Stain

نمونه ۴، ۶، ۸: نمونه های خون منفی نمونه

۵، ۷، ۹، ۱۰: نمونه های خون مثبت ۲۲۳ جفت بازی

بحث

بروسلوزیس بیماری حیوانات اهلی و وحشی می باشد که می تواند از طریق مستقیم و غیر مستقیم به انسان نیز منتقل شود. علائم و نشانه های بروسلوزیس انسانی اختصاصی نیستند. (۱۸، ۱۳، ۱۲) در حقیقت تشخیص بروسلوزیس نمی تواند بر اساس نشانه های بالینی باشد، زیرا می تواند با بیماری های دیگر هم چون مالاریا، تیفوئید و لپتوسپیروز اشتباه گرفته شود. بنابراین تشخیص این میکروارگانیسم توسط محیط کشت، یا به وسیله روش های سرولوژی و مولکولی لازم می باشد. (۱۷، ۱۰) در این مطالعه ۲ نمونه با روش کشت و ۱۵ مورد PCR از نمونه های خونی بیماران مشکوک به بروسلوز جداسازی گردید. در مطالعه ای که توسط خسروی و همکارانش در سال ۲۰۰۶ انجام شده گونه های بروسلا ملی تن سیس و آبرتوس با استفاده از روش های کشت و PCR از بیماران جداسازی شده است. طی این بررسی ۳۰ نمونه بیمار مبتلا به بروسلوز مورد بررسی قرار گرفت که در روش کشت، حساسیت تشخیص آن به میزان ۲۶ درصد بوده است، این نتیجه در حالی است که در مطالعه حاضر از خون بیماران مشکوک به بروسلوز استفاده گردید که درصد تشخیص آن ۲ درصد است. هم چنین در مطالعه خسروی از روش PCR نیز برای تشخیص بیماری بروسلوز استفاده شده است که به میزان ۹۳ درصد در شناسایی بروسلا در بیماران بروسلوزی مؤثر بوده است، در حالی که میزان حساسیت روش PCR مورد استفاده در مطالعه حاضر در تشخیص بیماران مشکوک به بروسلوزیس ۱۰۰ درصد است که بیان گر حساسیت روش PCR می باشد و این اختلاف حساسیت احتمالاً به دلیل نوع پرایمرهای استفاده شده می باشد. (۹) Rabab و همکاران در سال ۲۰۰۰، بر روی ۵۰ نمونه خون، بررسی بیماری بروسلوز را انجام دادند. از ۱۷ نمونه

تازه های بیو تکنولوژی سلولی - مولکولی دوره ششم، شماره بیست و سوم،

شده از کلنی رشد یافته در محیط کشت، صورت گرفت. پس از بهینه شدن ست اولیه PCR، حساسیت و ویژگی پرایمرها تعیین و شرایط برای آزمایش نمونه ها آماده شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر به قرار زیر بود (۱۵). برای تأیید نتیجه PCR از سوش های استاندارد دانشگاه علوم پزشکی ایران استفاده شد.

الکتروفورز روی ژل آگارز: ۴ الی ۵ میکرولیتر از هر یک از محصولات PCR درون چاهک قرار گرفت. جهت تعیین وزن باندها ۲ میکرولیتر مارکر ۱۰۰ bp (کیاژن) نیز همراه نمونه ها ران گردید (از سایز مارکر جهت تأیید قطعه PCR استفاده گردید). سپس نمونه ها به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه با ولتاژ ۹۰ الکتروفورز شد. نتیجه بر روی دستگاه ایلومینیتور UV مشاهده و نتایج ثبت گردید.

Initial denaturation	93°C for 5 min
Thermo-Cycle file	40 cycles
Denaturation	90°C for 1 min
Annealing	60°C for 1 min
Extension	72°C for 1 min
Final extension	72°C for 10 min
store	8°C

برنامه استفاده شده برای PCR

یافته ها

نتایج نمونه گیری: نتایج کشت ۱۰۰ نمونه خون مورد بررسی به این شرح بوده است: تعداد ۲ مورد (یعنی ۲٪ موارد) مثبت می باشد. با در نظر گرفتن روش کشت به عنوان استاندارد طلایی، حساسیت و ویژگی PCR در این مطالعه به ترتیب ۱۰۰٪ و ۸۶/۷۳٪ محاسبه گردید.

کشت	شماره نمونه
-	۱-۱۰۰
+	۵-۷ به جز

نتایج کشت مربوط به ۱۰۰ نمونه مورد بررسی

نتایج PCR: ۱۰۰ نمونه خون مورد بررسی به این شرح بوده است: تعداد ۱۵ مورد (یعنی ۱۵٪ موارد) مثبت می باشد. پس از انجام PCR نتایج به دست آمده حاکی از شناسایی و تشخیص بروسلای جدا شده از بیماران در شکل ۱ قابل مشاهده می باشد.

خونی مبتلا به بروسلا ۸ نفر بروسلوز مثبت شناسایی شدند که بیان گر حساسیت ۱۰۰٪ این روش می باشد. روش محیط کشت خونی در همه آن ها وجود بروسلا را تشخیص نداد در حالی که روش PCR، چهار باند را در افراد بدون علائم در معرض شغلی شناسایی کرد. (۱۶) در مطالعه حاضر با توجه به ۱۰۰ نمونه بیمار مشکوک به بروسلوزیس ۱۵ نمونه PCR مثبت شدند که نشان دهنده حساسیت ۱۰۰ درصد آن می باشد.

میرنژاد و همکاران در سال ۲۰۱۳، با مقایسه تکنیک کشت و Multiplex PCR جهت تشخیص بروسلا ملی تن سیس و آبورتوس از کشت خون استفاده نمود. در این مطالعه ۱۶۰ نمونه خون مورد بررسی قرار گرفت که ۷۶ (۴۷/۵٪) مورد مثبت گزارش شد. (۱۴) این نتیجه در حالی است که در مطالعه حاضر از ۱۰۰ نمونه خون مشکوک به بروسلوز استفاده گردید که درصد تشخیص آن با روش کشت ۲ درصد است و میزان حساسیت روش PCR مورد استفاده در تشخیص بیماران مشکوک به بروسلوزیس ۱۰۰ درصد است که بیانگر حساسیت روش PCR می باشد.

نتیجه گیری

بنابراین روش کشت در مقایسه با تکنیک PCR محدودیت هایی دارد، روش کشت قادر نیست مقادیر کم باکتری را شناسایی نماید در صورتی که تکنیک PCR می تواند حتی در حد ۱۰ نانوگرم از DNA را تشخیص دهد، بنابراین نتیجه منفی کشت دلیل بر عدم وجود ارگانیزم نمی باشد. گاهی اوقات شرایطی مانند خشکی، تأخیر در انتقال نمونه و یا آلوده شدن نمونه به عنوان عامل بازدارنده ی باکتری عمل نموده، لذا نتایج کشت به طور کاذب منفی خواهد شد و هیچ رشدی در محیط کشت مشاهده نمی گردد. میزان حساسیت روش PCR در مقایسه با روش کشت به مراتب بالاتر (۱۰۰ درصد) به دست آمده است و لذا توانایی این روش در تشخیص صحیح و سریع افراد بیمار بسیار بیش تر از روش کشت می باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه با کمک و حمایت بخش میکروب شناسی و مولکولی آزمایشگاه مسعود تهران انجام شده که نویسندگان این مقاله بدین وسیله تشکر و قدردانی خود را از این آزمایشگاه ابراز می دارند.

1. Adrian, M., Whatmore Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infection Genetics and Evaluation, 2009. 1168-1184.
2. Al Dahouk, S., et al., Laboratory-based diagnosis of brucellosis-a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. Clin Lab, 2003. 49: 577-89.
3. Ariza, J., et al., Specific C antibody profile in human brucellosis. Clin Infect Dis, 1992. 14: 131-40.
4. Bricker, BJ., et al., Cloning expression and occurrence of the Brucella Cu-Zn dismutase. Infect Immun, 1990. 58:2933-9.
5. Corbel, MJ., et al., Brucellosis: an Overview. Emerg Infect Dis, 1997. 3(2):213-21.
6. Craig, CF., et al., Malta fever, its occurrence in the United States Army, with a review of the literature. Amur J Med Sci, 1903. 125:105-115.
7. Cutle, SJ., et al., Brucellosis new aspects of an old disease. J. Applied Microbiology, 2005. 98: 1270-1281.
8. Dalrymple, CH., et al., Brucellosis infection and undulant fever in man. Oxford university press, London, 1978.1-30.
9. Khosravi, AD., et al., Isolation of Brucella Melitensis and Brucella Abortus from brucellosis patients by conventional culture method and polymerase chain reaction technique. Pak J Med Sci, 2006. 22: 396-400.
10. Leal-Klevezas, DS., et al., Single-step PCR for detection of Brucella spp from blood and milk of infected animals. J Clin Microbiol, 1995.33:3087-90.
11. Mantecon, MA., et al., Utility of an immunocapture-agglutination test and an enzyme-linked immunosorbent assay test against cytosolic proteins from Brucella melitensis B115 in the diagnosis and follow-up of human acute brucellosis. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006.55: 27-35.
12. Mantur, BG., et al., Review of clinical and laboratory features of human Brucellosis. Indian J Med Microbiol, 2007. 25: 188-202.
13. Maria, P., et al., Human brucellosis. Lancet Infect Dis, 2007.7: 775-86.
14. Mirnejad, R., et al., Comparison of Culture and Multiplex PCR Technique for Detection of Brucella abortus and Brucella melitensis from Human Blood Samples. ZJRMS, 2013. 15(12): 5-8.
15. Mitka, S., et al., Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. J Clin Microbiol, 2007. 45(4):1211-1218.
16. Rabab, A., et al., Annals of Saudi Medicine, 2000. Vol 20, Nos 3- 4.
17. Richtzenhain, LJ., et al., A multiplex PCR for the detection of Brucella spp. and Leptospira spp DNA from aborted bovine fetuses. Vet Microbiol, 2002. 87: 139-47.
18. Shen, MW., Diagnostic and therapeutic challenges of childhood brucellosis in a nonendemic Country. Pediatrics, 2008. 121: 1178-83.
19. Williams, E., et al., Brucellosis in Textbook of Medicine. 4th edition. Oxford: Oxford University Press, 2003. 1228p, 351-362.
20. Xavier, MN., et al., Pathogenesis of Brucella spp. The Open Veterinary Science J., 2010. 4:109-118.

