مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۶، صفحات ۴۷-۵۱

تشخیص بهینه و دقیق بروسلا در سرم با استفاده از روش Double PCR

محمد حسین هدایتی*[۱] ، آیدا عدلی مقدم[۲] ، داریوش نوروزیان[۲] ، بهمن تبرائی[۲] ، حجت احمدی[۲] ، سید داور سیادت[۲]

۱) بخش کنترل کیفی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی کرج، انستیتو پاستور ایران

۲) بخش واکسن های باکتریائی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی کرج، انستیتو پاستور ایران

نویسنده رابط: محمدحسین هدایتی، بخش کنترل کیفی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی کرج، انستیتو پاستور ایران، تلفن: ۶۱۰۱۶۴۱-۰۲۶۱

mhheda@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۷/۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۹/۲۲

چکیده :

زمینه و اهداف: بروسلاها باکتری های گرم منفی درون سلولی هستند کـه قادر بـه ایجاد عفونت در بسیاری از گونه های حیوانی و انسان می باشند. علائم کلینیکی بروسلوز در انسان بسیار متنوع بوده و اغلب غیر اختصاصی است، لذا تشخیص این بیماری نیازمند تایید سریع و دقیق می باشد. از آنجا که استفاده از سرم بجای خون از مزایای متعددی در روش های تکثیر اسیدهای نوکلئیک برخوردار است، مطالعه حاضر به طراحی یک واکنش PCR بهینه سازی شده به منظور تشخیص آزمایشگاهی سریع و اختصاصی بروسلوز در نمونه های سرم انسانی می پردازد.

روش بررسی: نمونه DNA از ۱۰۰ میکرولیتر نمونه سرم۳۰ فرد مبتلا به بیماری حاد بروسلوز، با استفاده از روش سریع کیت تهیه گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز با کمک پرایمر های اختصاصی انجام شد. سپس واکنش دوم PCR جهت تکثیر مجدد محصولات واکنش نخست طراحی شد.

یافته ها: یک قطعه ۲۲۳ جفت بازی ثابت، از ژن مسئول سنتز یک پروتئین ایمونوژنیک غشائی(BCSP31) با وزن ملکولی ۳۱ کیلو دالتون از باکتری بروسلا آبورتوس که ویژه جنس بروسلا می باشد و در تمام واریته های بیولوژیک آن موجود ا ست در کلیه نمونه های سرمی با موفقیت تکثیر شد.

نتیجه گیری: تکثیر مجدد محصولات واکنش اول PCR بمنظور تایید و تکثیر بیشتر قطعات بدست آمده، منجر به پیدایش الگوی باندینگ قوی تر و با حساسیت و ویژگی بالاتری می گردد، که از آن می توان بعنوان یک روش مفید در تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز استفاده نمود.

کلید واژه ها: بروسلا، بروسلوز، PCR، BCSP31

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

سویه های بروسلا عامل ایجاد بروسلوز (تب مالت)، یک بیماری عفونی بسیار شایع می باشند که بسیاری از گونه های حیوانی و انسان را مبتلا می نمایند (۱). جنس بروسلا بر اساس اختلافات موجود در بیماریزایی و نوع میزبان اختصاصی از شش گونه تشکیل شده است: *بروسلا ملی تنسیس* (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 نئوتومه* (موش جنگلی) *B.neotome*. کشف باکتری بروسلا در پستانداران منجر به معرفی دو گونه بروسلا ستاسئا (B.cetacea) عامل عفونت در دلفین ها و وال ها و بروسلا پینی پدیا (*B.pinnipediae*) عامل عفونت در خوک های آبی گردید (۲،۳). 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 وخواص متابولیک می باشد(۱،۴).

با این حال از جمله مشکلات موجود در انجام این آزمایشات می توان به طولانی بودن مدت زمان کشت و تیپ بندی باکتری (بیش از یک هفته)، نیاز به تکنسین ماهر و خطر آلودگی پرسنل آزمایشگاهی با سویه های بیماریزا اشاره کرد که جهت رفع چنین مشکلاتی از تکنیک های مختلفی جهت تشخیص پلی مرفیسم DNA و تیپ بندی مولکولی بروسلاها استفاده می شود (۲،۵).

نشانه های مختلف و معدود بودن علایم فیزیکی مشخص، شیوع عفونت های ساب کلینیکال وغیر تیپیک در مراحل حاد و مزمن بیماری، تشخیص کلینیکی بروسلوز انسانی را دشوار می نماید. بنابراین تکیه اصلی پزشک بر تائیدات آزمایشگاهی حتی در مواردیکه علائم کلینیکی دلالت بر وجود بیماری بروسلوز دارد، قابل توجه می باشد (۶).

تکنیک های کشت وقت گیر بوده و فاقد حساسیت لازم در بیماران مبتلا به عفونت مزمن می باشد. از طرفی سرو کار داشتن با این ارگانیسم در آزمایشگاه مخاطره آمیز است. روش های سرولوژیک مرسوم در بیماران با عفونت های مزمن از حساسیت کافی برخوردار نیست. واکنش متقاطع با دیگر باکتری ها ی گرم منفی نیز منجر به نتایج مثبت کاذب می گردد (۲،۶).

روش های متعددی بر پایه واکنش PCR جهت تشخیص جنس و گونه های مختلف بروسلا در نمونه های کلینیکی مثل خون و مدفوع بیماران مبتلا به انواع حاد، تحت حاد و مزمن بروسلوز طراحی و ابداع گردیده است. در حالیکه استفاده از نمونه های سرم بیماران علیرغم برتری های متعددی چون حذف اثر مواد ضد انعقاد و هموگلوبین بعنوان ممانعت کننده های عمده در واکنش PCR ، بعلت مشکلات مربوط به جداسازی DNA باکتریائی کمتر مورد توجه قرار گرفته است و تاکنون مطالعه جامعی نیز در این زمینه در داخل کشور صورت نپذیرفته است. هدف این تحقیق طراحی و ارائه یک روش بهینه سازی شده، سریع و با قابلیت شناسائی دقیق به منظور تشخیص قطعی گونه های بیماریزا بروسلا در انسان شامل *بروسلا آبورتوس*، *بروسلا ملی تنسیس و بروسلا سوئیس* با استفاده از نمونه های سرم بیماران مبتلا به تب مالت می باشد. توالی هدف یک ناحیه ۲۲۳ جفت بازی از ژن کد کننده آنتی ژن ۳۱ کیلو دالتونی بروسلا آبورتوس (BCSP31) می باشد که مختص جنس بوده و درتمام گونه های فوق حفاظت شده و ثابت می باشد.(۴،۷،۸).

مواد و روش ها:

۱. سویه های باکتری و شرایط کشت:

سویه استاندارد بروسلا مورد استفاده در این مطالعه، *بروسلا ملی تنسیس* (ATCC 23456) 16M تهیه شده از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران می باشد که در محیط کشت بروسلا آگار (Hi-media) در ^{o}C ۳۷ به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد و با استفاده از روش های استاندارد، تیپ بندی و مورد تایید قرار گرفت. DNA استخراج شده از این سویه بعنوان کنترل مثبت در واکنش PCR طراحی شده بکار گرفته شد.

۲. جمع آوری نمونه:

تعداد ۳۰ نمونه سرم از افراد مبتلا به بیماری بروسلوز در شرایط آسپتیک و با همکاری بخش میکروب شناسی بیمارستان امام خمینی تهران تهیه وپس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان انجام آزمون در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. نتایج آزمون های رایت و کشت ابتلا به بیماری بروسلوز را مورد تایید قرار داد.

۳. تخلیص DNA:

DNA ژنومیک باکتری با استفاده از کشت خالص تهیه شده و به کمک کیت استخراج DNA شرکت سیناژن (DNA ^{TM} Kit) جدا گردید. همچنین از µl ۱۰۰ نمونه سرم افراد مشکوک به بروسلوز با استفاده از کیت فوق استخراج DNA بعمل آمد. نمونه های DNA استخراج شده درون بافر مناسب تا زمان انجام آزمون PCR در شرایط ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۴. تکثیر DNA :

در این مطالعه یک قطعه ۲۲۳ جفت بازی از یک ناحیه حفاظت

Archive of SID

www.SID.ir

شده ژن کد کننده یک پروتئین غشایی ایمونوژیک (BCSP31) با وزن مولکولی ۳۱kD بروسلا ابورتوس، که اختصاص به جنس بروسلا داشته و در تمام بیووارهای بروسلا یافت می شود به کمک یک جفت پرایمر ۲۱ نوکلئوتیدی شامل:
B4 (5′ TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA 3′)
و B5 (5′CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG 3′)
که توسط Baily و همکاران شرح داده شده است، مورد تکثیر قرار گرفت (۱،۳،۴،۸).

PCR در حجم نهائی ۵۰ µl شامل: ۱۰۰ ng DNA الگو، بافر PCR (10mM Tris-HCl ,pH8.4, (50 mM KCl,1.5 $mM\ MgCl_2$ ، ۲۰۰nmol از هر یک از پرایمرها، ۲۰۰ µM از هر یک از $dNTP_s$ و۲/۵ واحدآنزیم Taq پلیمراز صورت پذیرفت. واکنش در یک دستگاه ترمال سایکلر بدون روغن معدنی (Techne –TC- 312) انجام شد. واکنش PCR شامل یک مرحله حرارت اولیه در $^{\circ}C$۹۳ به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل متشکل از $^{\circ}C$۹۰ به مدت ۱ دقیقه، $^{\circ}C$۶۰ به مدت ۳۰ ثانیه و $^{\circ}C$۷۲ به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله انکوباسیون نهائی در $^{\circ}C$۷۲ بمدت ۷ دقیقه می باشد. نمونه های کنترل مثبت ومنفی در تمام مراحل آزمون لحاظ گردید (۱،۶،۸،۱۱،۱۲،۱۳).

۵. واکنش دوم PCR:

۱/۵ µl از محصول نخست PCR جهت تکثیر بیشتر و افزایش دانسیته باندهای حاصل، بعنوان DNA الگو در واکنش دوم PCR با حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر بکار رفت. بمنظور کاهش سرعت واکنش و به حداقل رساندن مدت زمان تشخیص باکتری، غلظت سایر مواد و نیز پارامترهای مختلف PCR مشابه حالت اول اما با حذف مرحله دناتوراسیون اولیه ($^{\circ}C$۹۳ به مدت ۵ دقیقه) و انکوباسیون نهائی ($^{\circ}C$۷۲ بمدت ۷ دقیقه)، کاهش تعداد سیکل ها به ۲۵ و کاهش ۵۰ درصدی مدت زمان پارامترهای حرارتی لحاظ گردید. جهت تایید قطعی نتایج و اطمینان از تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر، کلیه نمونه های سرم تحت هر دو واکنش PCR قرار گرفتند.

۶. ژل الکتروفورز:

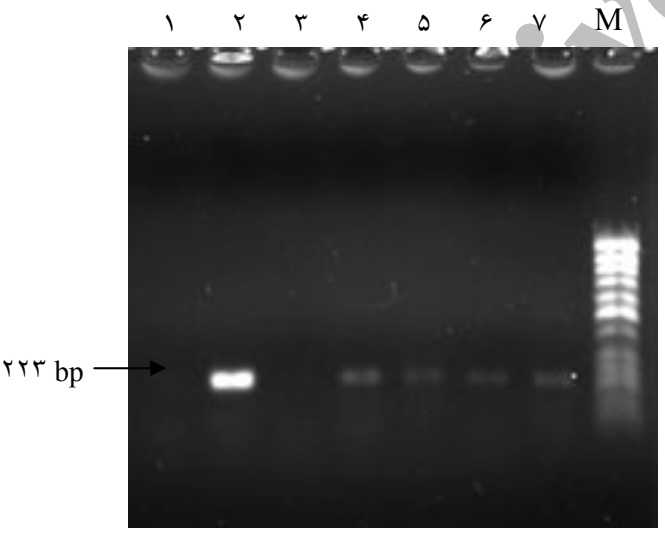
محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید و توسط محلول ۱ mg/ml اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. باندهای مورد نظر در دستگاه ترانسلومیناتور مجهز به دوربین، تحت نور UV ، مشاهده و مورد عکس برداری قرار گرفت (۹،۱۰،۱۴).

یافته ها:

محصولات تکثیر DNA در نمونه های سرم مطالعه شده در شکل (۱) نشان داده شده است. مطابق انتظار جفت پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه منجر به تکثیر اختصاصی یک قطعه ۲۲۳ جفت بازی از نمونه های DNA *بروسلا ملی تنسیس* (کنترل مثبت) وکلیه نمونه های سرم افراد مبتلا به بروسلوز گردید. ضمناً در نمونه سرم افراد سالم و نیز DNA استخراج شده از ***E.coli*** در شرایط یکسان هیچگونه قطعه ای تکثیر نشد، که از آن بعنوان کنترل منفی در واکنش PCR طراحی شده استفاده شد. شکل ۲ نتایج واکنش PCR دوم از ژن مورد مطالعه را نشان می دهد.

در این شکل محصولات واکنش PCR (Lane: 1,2,3) نتایج تکثیر مجدد محصولات واکنش نخست (بترتیب ۷و۶و۵) می باشد. در بررسی بعمل آمده مطابقت کاملی(۱۰۰٪) بین نتایج هر دو واکنش PCR و نیز نتایج گزارش شده از کشت و سرولوژی بیمار وجود داشت.

شکل۱: الکتروفورز بر روی ژل آگارز و رنگ آمیزی بوسیله اتیدیوم بروماید.

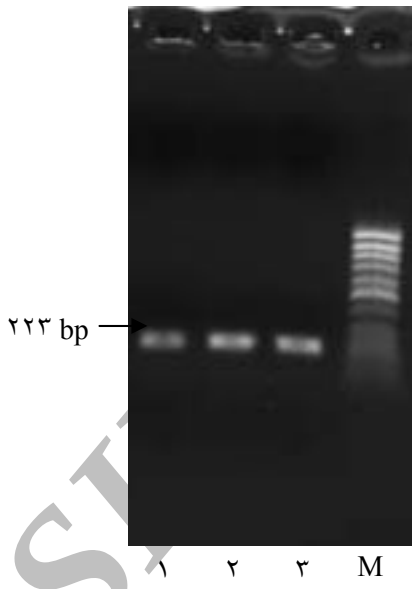


M:شناساگر ملکولی(50 bp DNA)
۱: کنترل منفی (فاقد DNA)
۲: کنترل مثبت (*بروسلا ملی تنسیس* 16M)
۳: DNA/*شریشیاکلی*
۴،۵،۶،۷: نمونه های مثبت

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۲: نتایج PCR دوگانه



M: شناساگر ملکولی(50 bp DNA)
۱،۲،۳: PCR دوگانه محصول واکنش اول

بحث :

این مطالعه نشان داد که آزمون PCR روش مفیدی جهت جستجوی سریع و تشخیص اختصاصی بروسلا در نمونه سرم افراد آلوده به این باکتری می باشد. عدم تکثیر این قطعه در نمونه های DNA مشتق از باکتری های وابسته از لحاظ سرولوژیک مثل *E.coli* و نیز تکثیر مجدد این محصولات طی واکنش دوم PCR، اختصاصی بودن واکنش طراحی شده را بعنوان یک آزمون مختص جنس در تشخیص مولکولی بروسلاها به اثبات می رساند، که با نتایج مطالعات سایر محققین در این زمینه مطابقت دارد(۹،۱۲،۱۳،۱۴). این روش با توجه به اینکه تنها نیاز به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه سرم فرد مشکوک به بروسلوز دارد از حساسیت بالائی برخوردار می باشد و بخصوص در مواردی که مقدار نمونه سرم بسیار اندک است و بعلت مشکلات مربوط به استخراج DNA ، تشخیص دقیق بیماری با مشکل مواجه گردیده است، کاربرد دارد. ضمناً نمونه های سرم کهنه یا آلوده و حتی نمونه های سرم فریز شده به مدت طولانی که غالباً تیتر بسیار پائین و یا نتایج منفی کاذب بهمراه دارند، بوسیله این آزمون براحتی و با دقت بالا با استفاده از پرایمر های اختصاصی قابل تشخیص می باشند.

بعلاوه در مواردی که نتیجه واکنش نخست به علل گوناگونی چون نامناسب بودن DNA الگو از لحاظ کمی و کیفی، مشکوک است و تکرار مجدد واکنش نتایج مشابهی را به همراه داشته است، انجام آزمون دوم PCR با رفع موانع فوق، تکثیر اختصاصی قطعه ۲۲۳bp را مورد تایید قرار می دهد. کاهش تقریباً ۵۰ درصدی مدت زمان واکنش دوم راه حل بهینه ای جهت افزایش سرعت واکنش توام با افزایش میزان دقت و کارائی روش خواهد داشت.

نتیجه گیری:

تکثیر بهینه و افزایش میزان محصول در واکنش دوم PCR و نیز کاهش میزان باندهای غیر اختصاصی دلالت برافزایش میزان کارائی و دقت واکنش فوق دارد. از آنجا که قطعه ۲۲۳ جفت بازی در هر سه گونه بروسلا بیماریزا در انسان شامل *B.abortus*، *B.melitensis* و *B.suis* حفاظت شده می باشد، لذا از این تکنیک می توان جهت جستجو سریع و دقیق کلیه گونه های بیماریزای فوق در انسان و تایید نتایج سرولوژی و کشت بعنوان یک روش مکمل در آزمایشگاه های تشخیص طبی استفاده نمود.

فهرست مراجع:

1. Vizcaino N, Verger JM, Grayon M, Zygmunt MS, and Cloeckaert A.DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella spp.*: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers, *Microbiology* 1997; **143**:2913-21.
2. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology* 2002; **90**: 435-46.
3. Ko J, and Splitter GA. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; **16** (1):65-78.
4. Baily GG, Krahn JB, Draser BS, and Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and

Archive of SID

www.SID.ir

Brucella abortus by DNA amplification. *J Trop Med Hygiene* 1992; **95**:271-5.
5. Garcia-Yoldi D, Marin CM, Lopez-Goni I. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of *Brucella spp*. *FEMS Microbiology Letters* 2005; **245**: 79-84.
6. Matar GM, Khneisser IA, and Abdelnoor AM. Rapid Laboratory Confirmation of Human Brucellosis by PCR Analysis of a Target Sequence on the 31-Kilodalton *Brucella* Antigen DNA. *J Clin Microbiol* 1996; **34** (2): 477-8.
7. Casanas MC, Queipo-Ortuno MI, Rodriguez-Torres A , Orduna A , Colmenero JD , and Morata P. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; **20**:127-31.
8. Morata P, Queipo – Ortuno MI, Reguera JM , Garcia-Ordonez MA, Cardenas A , and Colmenera JD. Development and Evaluation of a PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Human Brucellosis. J Clin Microbiol 2003; **41**(1): 144-8.
9. Elfaki MG, Al-Hokail AA, Nakeeb SM, AI-Rabiah FA. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of Brucellosis in humans. *Med Sci Monit* 2005; **11**(11): MT69-74.
10. Morata P, Queipo –Ortuno MI, and Colmenero JD. Strategy for Optimizing DNA Amplification in a Peripheral Blood PCR Assay Used for Diagnosis of Human Brucellosis. *J Clin Microbiol* 1998; **36**(9):2443-6.
11. Zerva L, Bourantas K , Mitka S, Kansouzidou A, and Legakis NJ. Serum is the Preferred Clinical Specimen for Diagnosis of Human Brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(4): 1661-4.
12. Romero C, Gamazo C, Pardo M, and Lopez-Goni I. Specific Detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; **33**(3): 615-7.
13. Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P, Manchado P and Colmenero JD. Rapid Diagnosis of Human Brucellosis by Peripheral –Blood PCR Assay. *J Clin Microbiol* 1997; **35**(11):2927-30.
14. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Miralles F, Lopez-Gonzalez JJ, and Colmenero J D.Diagnostic Yield of a PCR Assay in Focal Complications of Brucellosis. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(10): 3743-6.

Archive of SID

www.SID.ir