مجلـــه علمـــی پژوهشـــی دانشگـــاه عـلـــوم پزشکـــی اردبیـل

دوره نهم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۳۵۳ الی ۳۵۹

ارزیابی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) سرم بیماران در تشخیص سریع لپتوسپیروز

حمیدرضا هنرمند[۱]، محمد رضا خرمی زاده[۲]، سعید اشراقی[۳]

[۱]نویسنده مسئول: استادیار مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی، گیلان، گیلان، ایران

E-mail: honarmand_36@yahoo.com

[۲] دانشیار گروه ایمنولوژی [۳] دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف: لپتوسپیروز یک بیماری، مشترک انسان ـ حیوان با شیوع قابل توجه در جهان است. چون درمان فقط در روزهای اول بیماری موثر است، تشخیص درست و سریع لپتوسپیروز بسیار با اهمیت است. رشد میکروب بسیار کند است و به دلیل نبود آنتی بادیهای اختصاصی در هفته اول بیماری، سرولوژی نیز ناکارآمد است. بنابراین واکنش زنجیره ای پلیمریزاسیون (PCR) تنها راه تشخیص زودرس است. در این مطالعه حساسیت و دقت روش PCR متعارف در تشخیص سریع لپتوسپیروز در نمونه سرم مربوط به هفته اول بیماری ارزیابی شده است.

روش کار: در این مطالعه تعداد ۷۰ نمونه سرم واجد شرایط و اخذ شده در هفته اول بیماری از افرادی که علائم بالینی مشکوک به لپتوسپیروز داشتند و آزمون مرجع (میکروآگلوتیناسیون) نمونه سرم بار اول آنها منفی و نمونه بار دوم آنها مثبت بود (تبدیل سرمی که دال بر تشخیص قطعی بیماری است)، مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته ها: در این مطالعه نتیجه PCR در ۲٤ مورد مثبت بود. حساسیت این روش ۷٤/۵٪ و دقت آن ۱۰۰ باکتری در هر میلی لیتر سرم بود.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان می دهد PCR تنها روش سریع برای تشخیص لپتوسپیروز در هفته اول بیماری است ولی حساسیت آن خیلی بالا نیست، در حالی که روشهای دیگر کاربرد ندارند.

کلمات کلیدی: لپتوسپیروز، میکروآگلوتیناسیون، واکنش زنجیره ای پلیمراز

دریافت: ۸۷/۲/۱۵ **پذیرش:** ۸۸/۱۰/۲۲

مقدمه

لپتوسپیروز بدلیل فراوان بودن مخازن آن، یکی از شایع ترین بیماریهای مشترک انسان ـ حیوان در جهان است و در مناطق گرم و مرطوب شیوع زیادتری دارد [۳-۱].

منطقه جلگه‌ای استان گیلان بدلایل متعدد از جمله فراوانی حیوانات وحشی، اهلی و جوندگان، وفور آبهای سطحی، رواج کشت برنج، و بالاخره آب و هوای معتدل و مرطوب، شرایط مناسبی را برای اشاعه این بیماری دارد و هر ساله موارد زیادی از آن بویژه در شالیکاران در ماههای گرم سال بروز می‌کند [۵،٤]. ورود باکتری به بدن انسان بطور عمده توسط آب آلوده به ادرار حیوانات بیمار یا ناقل و از راه خراش های جلدی است [۳،۲]. لپتوسپیروز علایم بالینی شاخص ندارد و بیشترین موارد تظاهر بالینی آن به صورت بیماری حاد تب‌دار است و به اغلب بیماری‌های باکتریایی و ویروسی حاد شباهت نزدیک دارد [۳].

تشخیص سریع این بیماری بسیار مهم است زیرا فقط درمان زودرس آن موثر است و تأخیر در درمان به

www.SID.ir

بروز عوارض متعدد و جدی بویژه در کلیه منجر شده و می تواند به مرگ بیمار منتهی شود [۳،۲]. لپتوسپیراهای بیماریزا بسیار مشکل پسند و کند رشد هستند و جداسازی آنها از نمونه های بالینی بسیار مشکل و وقت گیر است. مشاهده مستقیم باکتری در نمونه‌های بالینی با میکرسکوپ زمینه تاریک یک روش غیر حساس است و موارد منفی کاذب زیادی دارد . سرولوژی نیز در هفته اول بیماری که هنوز آنتی بادیهای اختصاصی وجود نداشته و یا حضور اندک دارند کمک کننده نیستند بنابراین روشهای کشت، سرولوژی و مشاهده مستقیم در تشخیص زودرس و سریع لپتوسپیروز جای ندارند [۷،۶] و توسل به روشهای تشخیص ملکولی از جمله PCR که متداول‌ترین آنها است اجتناب ناپذیر بنظر می رسد [۱]. ضمناً بدلیل آنکه روش کشت در تشخیص بیماری فوق موارد منفی کاذب بالایی دارد، انجمن جهانی لپتوسپیروز وابسته به سازمان بهداشت جهانی (WHO)، روش آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT)[1] را بعنوان استاندارد طلائی برای تشخیص بیماری لپتوسپیروز اعلام نموده است [۸،۳].

در آزمون مزبور، افزایش تیتر لا اقل دو برابر در نمونه سرم دوم که به فاصله ۷-۱۰ روز از نمونه اول اخذ شده باشد (تبدیل سرمی تلقی شده و همواره ملاک تشخیص قطعی بیماری در نظر گرفته می شود [۱۰،۹،۳].

در این مطالعه حساسیت روش PCR متعارف در تشخیص سریع لپتوسپیروز در نمونه سرم های مربوط به هفته اول بیماری که هنوز در آزمون MAT تیتر بسیار پایین و یا منفی داشته ولی نمونه بعدی و پس از گذشت حد اقل ۱۰ روز، تیتر بارز و بالا داشتند مورد ارزیابی قرار گرفته شده است .

روش کار

در این مطالعه تو صیفی- مقطعی، نمونه گیری به صورت تصادفی ساده، در بهار و تابستان (فصول شیوع بیماری) سال ۱۳۸٤ صورت گرفت. از تمام بیماران بستری شده در بخش های عفونی و داخلی بیمارستان رازی رشت که تشخیص بالینی لپتوسپیروز داشتند، یک نمونه خون در روز اول و نمونه دوم در هفته بعد اخذ گردید. سرمها تا زمان آزمایش در دمای 20^0C- نگه‌داری شدند.

تمام سرم‌ها با آزمون آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) توسط ۶ سروار[2] استاندارد ایکتروهموراژیا، گریپوتیفوزا، هارجو، بالوم، پومونا و کانیکولا مورد آزمایش قرار گرفتند. تعداد ۷۰ نمونه سرم واجد شرایط برای این مطالعه بودند که آزمون MAT آنها در هفته اول منفی و در هفته دوم مثبت بود (تبدیل سرمی داشتند). این نمونه ها مثبت واقعی تلقی شده و با روش PCR بررسی گردیدند. استخراج DNA توسط کیت تجاری QIAMP DNA min Kit ساخت شرکت QIAGEN انجام گردید. غلظت هر محلول DNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و توسط فرمول: ضریب رقت× جذب نوری× عدد ثابت ۳۳ تعیین شد و ماسترمیکس با فرمول زیر تهیه گردید:

PCR Buffer 10x	6 µl	Per reaction
MgCl2 (25mM)	4 µl	Per reaction
DNTP (25 mM)	0.5 µl	Per reaction
Primer (forward) 100µm	1 µl	Per reaction
Primer (Reverse) 100 µm	1 µl	Per reaction
DNA Pol[3] (5u/µl)	0.2 µl	Per reaction
H_2O	6.5 µl	Per reaction
DNA Template	30 µl	Per reaction
Total	50 µl	

در این مطالعه از یک جفت پرایمرکه بطور اختصاصی قطعه‌ای از ژن 16srDNA لپتوسپیراهای بیماریزا را

[1] Microscopic Agglutination Test

[2] Serovar

[3] Eurogenetec , Ref : ME-0073-05

Archive of SID

www.SID.ir

تکثیر می‌کند و قطعاتی بطول ۶۵۰ نوکلئوتید بوجود مـی‌آورد، اسـتفاده گردیـد. ایـن پرایمـر توسـط Hartskeel و همکاران طراحی شده است [۱۰].

Forward primer: 5'- GAA TCT CTC TTT TGA TCT TCG- 3'
Reverse primer: 5'- GAG TTA GAG CTC AAA TCT AAG- 3'

برای تکثیر DNA از برنامه اجرایی زیر استفاده شد .

یک سیکل	۷ قیقه	Initial denaturation
۳۵ سیکل	۶۰ثانیه	Denaturatinn phase
	۶۰ثانیه	Anealing phase
	۹۰ثانیه	Extension phase
یک سیکل	۱۰ دقیقه	Final extension

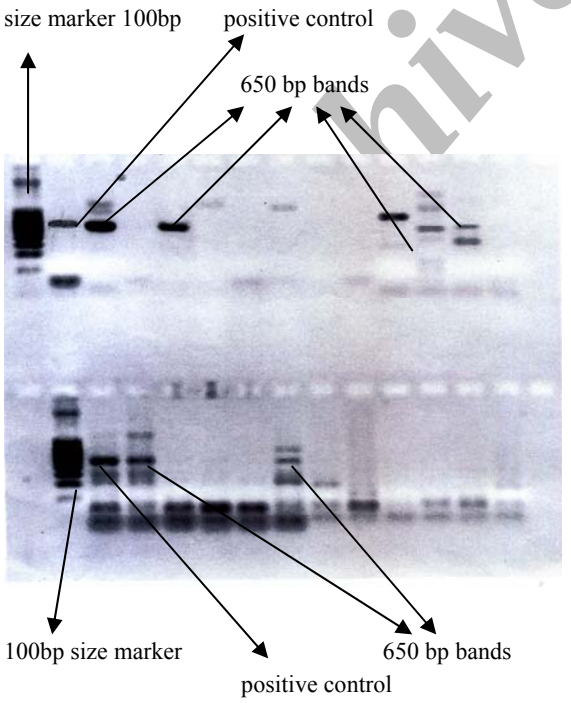
محـصول PCR روی ژل آگـارز یـک درصـد حـاوی اتیدیوم بروماید بمدت ٤٥ دقیقـه بـا شـدت جریـان ۱۰۰ mA الکتروفورز شده و سپس عکسبرداری شـد (تصویر۱). در این مطالعه از ژنوم خـالص سـویه لای[1] بعنوان کنترل مثبـت، از آب بعنـوان کنتـرل منفـی، از نشانگر مولکولی ۱۰۰bp ساخت شـرکت Fermentas به عنـوان سـایز مـارکر و بـالاخره از دسـتگاه ترمـو سـایکلر Techneh سـاخت کـشور انگلـستان بـرای آمپلی فیکاسیون استفاده شد.

برای تعیین حساسیت ایـن روش، از یـک کـشت تـازه سویه اسـتاندارد لای اسـتفاده شـد. از ایـن سـویه در (pH ۷/۲) بافر فسفات، یک سوسپانسیون میکروبی بـا کدورت برابر نیم مک فارلند تهیه شـد. بـا افـزودن فرمالین با رقت نهایی نیم درصد به مدت نیم ساعت، تمام لپتوسپیرا ها بی حرکت شدند تا بـرای شـمارش در زیر میکروسکوپ حرکت نکنند. سپس با کمـک لام نئوبار اصلاح شده جمعیت باکتری در هـر میلـی لیتـر محاسبه شد.

۱۲ میکرو تیوب که هر کـدام دارای نـیم میلـی لیتـر سرم انسانی منفـی اسـتاندارد تهیـه شـده از انـستیتو پاستور ایران بودند، آماده شدند و به هر یک از آنها حجم معینی از آن سوسپانسیون میکروبی اضافه شـد طـوری کـه میکروتیـوب شـماره ۱۲ دارای ۱۰ عـدد باکتری و شماره ۱۱ دارای ۲۰ عدد و بالاخره شماره ۱ دارای ۱۲۰ بـاکتری بـود. از تمـام آنهـا اسـتخراج DNA به عمـل آمـد و PCR انجـام شـد. کمتـرین تعداد که باند واضح تـشکیل داد دقـت تـام PCR در نظر گرفته شد. در این مطالعـه حـساسیت روش مـا ۱۰۰ باکتری در هر میلی لیتر سرم (معادل حدود ۱۰ نانوگرم DNA) بدست آمد. نوع مطالعه به گونه‌ای بود که متغیر های متعدد نداشت و به آزمون آماری نیـاز نبـود. بـرای تعیـین حـساسیت PCR از فرمـول مربوطه استفاده شد: حساسیت = تعـداد مثبـت هـای حقیقی تقسیم بر مجموع تعداد مثبت حقیقـی و منفـی کاذب

یافته ها

تعداد ۲٤ نمونـه در آزمـون ملکـولی بـا PCR بانـد اختصاصی تشکیل دادند (تصویر۱) و سایر نمونـه هـا (در ۲/۳ موارد) باند اختصاصی تشکیل ندادند که جـزو موارد منفی کاذب برای آزمون PCR تلقی شدند.



تصویر ۱. نمونه ژل الکتروفورز آزمون PCR

[1] Lai

www.SID.ir

بحث

بنظر می رسد که موارد منفی در آزمون PCR مربوط به بیمارانی بود که خود سرانه و یا با درمان اولیه و تجربی توسط پزشک معالج، چند دوز پیاپی آنتی‌بیوتیک مصرف نموده بودند. اصولاً رفتار طبیعی لپتوسپیرا ها در برابر آنتی بیوتیک اینگونه است که به سرعت از خون فرار کرده و به بافت های پارانشیمی و پر آب بدن به ویژه کلیه، ریه، کبد و مغز مهاجرت کرده و استقرار می یابند. بدین ترتیب لپتوسپیرومی فروکش می‌کند و تعداد باکتری در خون بسیار کم می شود [۷،۵] و چون باکتریمی ناشی از لپتوسپیرا در انسان ۷-۱۰ روز بیشتر دوام ندارد و با ظهور آنتی بادی و نیز با انجام درمان (مصرف آنتی بیوتیک) باکتری ها از خون می گریزند بنابراین وجود باکتری مرده منتفی بوده و مشکل مثبت کاذب در PCR به موارد دیگر و بطور عمده به آلودگی با لپتوسپیراهای ساپروفیت که در محیط فراوان هستند ارتباط داده می شود [۱۱،۳،۱].

اصولاً دقت PCR به عوامل متعدد از جمله به مقدار DNA موجود در نمونه بالینی و یا به تعداد ارگانیزمهای زنده و یا مرده موجود در آن بستگی دارد. در این مطالعه دقت روش ما ۱۰۰ باکتری در هر میلی لیتر سرم (معادل حدود ۱۰ نانوگرم DNA) بدست آمد. در مطالعه Romero و همکاران (۱۹۹۸) دقت PCR را در تشخیص لیتوسپیرا در مایع مغزی نخاعی (CSF) تعداد ۵ باکتری در هر میلی لیتر نمونه بر آورد شده است [۱۲].

مرین[1] و همکاران در مطالعه خود دقت PCR را در تشخیص سروارهای لیتوسپیرا که در آزمایشگاه به نمونه سرم های منفی تلقیح نموده بودند، حدود یک نانوگرم DNA و معادل ۱۰ باکتری در هر میلی لیتر سرم اعلام نمودند [۱۳].

هینمن[2] و همکاران دقت PCR در ردیابی لپتوسپیراها از نمونه‌های آب و مایع منی گاو که به آنها سروارهای استاندارد تلقیح نموده بودند را مورد ارزیابی قرار دارند و دقت آنرا در مورد آب، ۱۰ باکتری در هرمیلی لیتر و برای مایع منی، ۱۰۰ عدد باکتری در هر میلی‌لیتر گزارش کردند [۱٤].

سان هوکی[3] و همکاران دقت PCR را در تشخیص DNA لپتوسپیرا در محیط کشت باکتری حدود ۱۰۰ فمتو گرم در هر میلی لیتر بیان داشتند [۱۵].

در مطالعه دیگری دقت PCR را در تشخیص لپتوسپیرا از محیط کشت معادل ۳۲ عدد باکتری گزارش نمودند [۱۶].

مطالعه ما نشان داد که PCR می‌تواند در تشخیص سریع بیماری موثر باشد ولی موارد منفی کاذب قابل توجهی وجود دارد (در مطالعه ما حساسیت PCR برابر با ۷٤/۵٪ بوده است). کم بودن دقت تام آن را به اشتباهات تکنیکی، عدم کارایی مواد شیمیایی مصرفی، کم بودن مقدار DNA (یا کمبود تعداد باکتری) در نمونه و نیز به مصرف قبلی آنتی‌بیوتیک می توان نسبت داد. در تمام این موارد PCR می‌تواند پاسخ منفی کاذب ایجاد کند [۱۸]. شایان ذکر است که روش استخراج DNA و نیز کیت مورد استفاده برای هدف مزبور نیز در دقت PCR تأثیرگذار می باشند [۱۹].

محققان ملکول DNA لپتوسپیراها را در ادرار بیماران با روش PCR متعارف ردیابی نمودند و دقت PCR را با روشهای مختلف استخراج DNA ارزیابی نمودند و براساس روش استخراج DNA، دقت PCR را متفاوت گزارش کردند [۲۰]. در مطالعه حاضر ما از یک کیت استخراج DNA تجاری معتبر استفاده شد. طبق دستور العمل کارخانه سازنده کیت از ٤۰۰ µL ـ ۲۰۰ نمونه بالینی برای استخراج DNA می‌توان استفاده نمود. ما از ٤۰۰ µL

[1] Merien

[2] Heinemann
[3] Sun-Hokee

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه برای استخراج استفاده کردیم تا به حجم بیشتری از DNA دسترسی یابیم. دقت PCR به روش الکتروفورز نیز بستگی دارد. دانشمندان ژل پلی اکریل آمید را برای الکتروفورز محصول PCR حاوی قطعات ۲۸۵ نوکلوئیدی حاصل از تزاید ژن 16sr DNA تعداد ۳۸ سروار استاندارد لپتوسپیرا، موردارزیابی قرار دارند و دقت آنرا در مقایسه با ژل‌های متعارف ۱۰۰ برابر بیشتر گزارش نمودند [۲۱].

در مطالعه حاضر از ژل آگارز یک درصد برای الکتروفورز محصول PCR حاوی قطعات ۶۵۰ نوکلئوتیدی تزاید یافته از همان ژن استفاده شد که با توجه به اندازه قطعه مورد نظر، ژل آگارز مناسب‌تر بوده است.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که روش PCR متعارف برای تشخیص زودرس لپتوسپیروز،آنگاه که روشهای متداول تشخیصی بی فایده بوده و کاربرد ندارند می‌تواند کمک کننده باشد ولی حساسیت بالایی ندارد.

References

1- Levett PN. Leptospirosis. Clin Micro Rev. 2001; 4: 296-326.
2- Plank R, Deborah D. Overiew of Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis of Leptospira spp in Humans. Microbes and Infections 2000; 2: 1265-1267.
3- Fain S. Guidance for the Diagnosis, Surveillance and Control of Human Leptospirosis. WHO offset publication Geneva. World Health Organization 2003; 17-20.
4- Tahbaz A, Sarshad A, Vandyousefi J, Safavi S, Dabaghian K. Preliminary study of Leptospirosis in Guilan. Journal of Infectious and Tropical Diseases of Iran 1995; 113:109-110.
5- Honarmand H, Mansor Ghanaei F, Eshraghi S, khoramizadeh MR. Study on the Prevalence of Leptospirosis in Guilan in 2004. Scientific Journal of Gorgan University of Medical Sciences 2005; 7(2): 270-7.
6- Turner LH. Leptospirosis II: Serology. Trans R Soc Trop Med Hyg 1968; 62: 880-889.
7- Adler B, Fain S. The Antibodies Involved in Human Response to Leptospiral Infection. J Med Microb 1978; 11:387-400
8- Turner LH. Leptospirosis III: Maintenance, Isolation and Demonstration of lepeospires. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1970; 64: 623-646.
9- Morris JA, Hussaini SN. Characterization of the antibodies detected by the MAT for Bovine Leptospirosis. J Hyg 1974; 73:425-432.
10- Hartskeel RA, Smits H, Korver H, Goris M, Terpstra WJ. Instruction booklet of International Course on Laboratory Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. KIT Royal Tropical Institute Publication.2004: 38-42.
11- Brown PD, Gravekamp C, Carringeon B G, Van de Kemp RA, Hartskeel R, Edwards CO, et al. Evaluation of PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. J Med Microbiol 1995; 43: 110-114.
12- Romero EC, Billerbeck AE, Valeria S, Lando VS, Camargo ED, Souza CC, et al. Detection of Leptospira DNA in patients with Aseptic Meningitis by PCR. J Clin Microb. 1992; 36(5), 1453-1455.
13- Merien F, Amouriax P, Peronat P, Buranton G, Giron S. Polymerase chain reactinn for detectinn of leptospira spp in clinical samples. J Clin Microb 1992; 30(9): 2219-2224.
14- Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Gregoria F, Higa ZM, Vasconcellos SA, et al. Detection and differentiation of Leptospira spp serovars in bovine semen by PCR-RFLP. Veterinary Microbiology 2000; 73: 261-267.
15- Kee Sun-Ho, Kim IS, Choi MS, chang WH. Detection of Lepteospiral DNA by PCR. J Clin Mirob 1994; 32(4): 1053-1039.

Archive of SID

www.SID.ir

16- Caballero Olsd, Neto ED, Koury Mck, Romanha AJ, Simpson Ajg. Low Stringency PCR with Diagnostically Useful Primers for Identication of Leptospira serovars. J Clin Microb 1994; 32 (5): 1369-1372.
17- Merien F, Baranton G, Perolat p. Comparison of PCR with MAT and Culture for Diagnosis of leptospirosis. The Journol of Infectious Diseases 1995 ; 172: 281-5.
18- Veloso IF, Lopes MTP, Salas CE, Moriera EC. A Comparison of three DNA extractive procedures with leptospires for PCR analysis. Mem Inst Oswaldo ruz. Extraction. 2000; 95(3): 339-343
19- Bal AE, Gravenkamp C, Hartskeerl RA, Meza-Brewster J de, Korver H, Terpestra J. Detection of Leptospires in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. J Clin Microbiol 1994; 32: 1894-1898.
20- Oliveira MA, Caballero OL, Dias Neto E, Koury MC, Romanha AJ, Carvalho J, et al. Use of Non Denaturing Silver Stained Polyacrylamide Gel Analysis of PCR Products for the Differential Diagnosis of *Loptospira interogans*. Infections Diag Microbiol Infect Dis 1995: 343-348.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of Patients Sera for Early Diagnosis of Leptospirosis by PCR

Honarmand H, ph.D[1]; Khoramizadeh M, ph.D[2]; Eshraghi S, ph.D[3]

1- Corresponding Author: Assistant Professor of Cellular and Molecular Research Center,Faculty of Medicine,Guilan University of Medical Sciences Guilan, Iran. E-mail: honarmand_36@yahoo.com
2- Associate Professor of Immundogy, Div of Immunology,Dep of Pathobiology,Faculty of Public Health,Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3-Associate Professor of pathobiology, Div of Bacteriology, Dept. of Pathobiology,Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background and objectives: Leptospirosis is a very common zoonosis in the world. Early diagnosis of leptospirosis is critical because just early treatment will be effective. It's culture is very slow and serological assays are not applicable because of lack of antibodies in the first week of the disease, therefore PCR is the only option for the early diagnosis. In this study, sensitivity and accuracy of a non-quantitative conventional PCR for diagnosis of leptospirose in first week sera of patients, is evaluated

Methods: Seventy first week sera sample of patients with clinical diagnosis of leptospirosis which were negative in MAT but positive for the second time after one weeks (seroconversion) were selected and studied.

Results: We observed twenty four positive sera in PCR test. Sensitivity of the test was 74.5% and accuracy was 100 bacteria /ml.

Conclusion: Result of our study shows that PCR is the only choice for the early diagnosis of Leptospirosis while other assays are not applicable but its sensitivity is low.

Key words: Leptospirosis, Sera, Diagnosis, PCR

Archive of SID

www.SID.ir