جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال هشتم ● شماره ۲ ● صفحات ۸۵ تا ۹۱ ● تابستان ۱۳۸۹

تشخیص سریع باکتری‌های مولد بیماری تب مالت با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

*دکتر کیوان مجیدزاده اردبیلی[۱]، سیده زهره حسینی[۲]، دکتر محمد سلیمانی[۳]، دکتر آرش قلیان‌چی لنگرودی[۴]

تاریخ اعلام وصول: ۸۹/۴/۶ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۹/۵/۱۰

چکیده

سابقه و هدف: تب مالت یک بیماری مشترک بین انسان و حیوانات مختلف است که توسط گونه‌های بروسلا ایجاد می‌شود. اگرچه این بیماری به‌ندرت کشنده می‌باشد، اما در صورت عدم تشخیص سریع و مناسب، در همه گیری‌ها و استفاده عمدی در جنگ‌های بیولوژیک، صدمات شدیدی به تسهیلات مراقبت پزشکی وارد می‌کند. با توجه به محدودیت‌هایی مثل زمان طولانی، دقت پایین، حساسیت کم و نتایج مثبت و منفی کاذب در روش‌های تشخیص سنتی بروسلاها، هدف از این مطالعه طراحی روش مولکولی PCR برای تشخیص سریع این ارگانیسم‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ژن bcsp که اختصاصی جنس بروسلا می‌باشد انتخاب و پرایمرهای اختصاصی آن به کمک نرم‌افزار Primer express v۳/۰ طراحی شد. برای تعیین ویژگی روش، ژنوم انواعی از باکتری‌های کنترل منفی استفاده گردید. به منظور تعیین حساسیت و محاسبه حد تشخیص از کلونینگ محصولات PCR در پلاسمید pTZ۵۷R/T استفاده شد.

یافته‌ها: الکتروفورز محصول PCR ژن bcsp برای باکتری‌های استاندارد B.abortus و B.melitensis باندی به اندازه ۱۵۰ جفت‌باز نشان داد. آزمایشات PCR با استفاده از ژنوم باکتری‌های کنترل منفی، هیچ باندی در ژل آگاروز ایجاد نکرد. کلونینگ محصولات PCR در وکتور pTZ۵۷R/T به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و توالی‌یابی تایید شد.

بحث و نتیجه‌گیری: پرایمر طراحی شده برای ژن اختصاصی جنس بروسلا در این روش می‌تواند با حساسیت تشخیص ۱۵۰۰ کپی از ژنوم برای شناسایی این ارگانیسم به کار رود و به این ترتیب هزینه و زمان مورد نیاز برای تشخیص را کاهش دهد.

کلمات کلیدی: بروسلا، تب مالت، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

جنس بروسلا یک باکتری داخل سلولی اختیاری و گرم منفی است که می‌تواند در گونه‌های زیادی از حیوانات و در انسان بیماری‌زا باشد (۱).

تا کنون ۶ گونهٔ اصلی از بروسلا (B.melitensis، B.abortus، B.suis، B.canis، B.ovis و B.neotomae) و ۲ گونهٔ فرعی (B.cetaceae و B.pinnipediae) متمایل به گونه‌های جدا شده از پستانداران، در بروسلا شناسایی شده است (۲).

در انسان، بروسلوزیس می‌تواند به صورت طیف وسیعی از آلودگی‌های غیرقابل تشخیص بدون علامت تا اندوکاردیت‌های کشنده بروز پیدا کند. اگرچه علایم بروسلوزیس انسانی صرف‌نظر از سویهٔ باکتریایی درگیر مشابه هستند، شدت این علایم می‌تواند بسیار متغیر باشد، اغلب سویه‌های B.melitensis علایم شدیدی تولید می‌کنند و بعد از آن شدت علایم به ترتیب مربوط به سویه‌های B.suis، B.abortus و B.canis است. اغلب بیماری به صورت یک ناتوانی مزمن همراه با تب متناوب، احساس سرما، درد عضلانی،

۱ـ استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی (*نویسنده مسئول)
تلفن: ۰۲۱-۸۵۹۵۵۲۴۰ آدرس الکترونیک: k-majidzadeh@armyums.ac.ir
۲ـ پژوهشگر، ایران، قم، دانشگاه آزاد اسلامی
۳ـ استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دکتری میکروبیولوژی
۴ـ پژوهشگر، ایران، تهران، مرکز تحقیقات زیست‌فن‌آوری تسنیم

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کسل بودن و بی‌قراری ظاهر می‌شود (۳).

همچنین اغلب عفونت‌های درمان نشده می‌توانند منجر به ورم‌های چرکی موضعی در اعضای سیستم رتیکولواندوتلیال و عفونت مفاصل شوند. به‌ندرت اندوکاردیت (التهاب غشای درونی قلب)، انسفالیت (التهاب مغز) و مننژیت هم اتفاق می‌افتد و در موارد بسیار کمی (۲ درصد یا کمتر) مرگ رخ می‌دهد که اغلب در اثر اندوکاردیت است (۳).

شیوع بروسلوز در ایران همیشه بالا بوده، ولی از سال ۱۳۸۲ به بعد اپیدمی‌های جدیدی بروز کرده است. آمار سالیانه بروسلوز در ایران با تغییراتی جزئی تا سال ۱۳۶۸ سیر صعودی و پس از آن تا سال ۱۳۸۳سیر نزولی طی نموده است. این روند از سال ۱۳۸۳دوباره رو به افزایش گذاشته است.

افزایش موارد تب مالت به ۲۵هزار مورد طی سال‌های اخیر در کشور گزارش شده که درنیمه نخست سال ۱۳۸۶، ماهیانه ۳ هزار مورد تب مالت به ثبت رسیده است. طبق آمار موجود در وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی میزان بروز تب مالت در سال ۱۳۸۷ به ۱۸ هزار وقوع در سال رسیده است. در سال ۸۷ بیشترین بروز این بیماری در استان‌های لرستان و آذربایجان حدود ۸۸ تا ۱۱۰ در صدهزار مورد و بعد در استان‌های مرکزی، همدان و خراسان رضوی ۶۶ تا ۱۰۰ در صدهزار و کرمان، ایلام، کردستان، فارس، کرمانشاه، آذربایجان غربی و زنجان ۲۲ تا ۴۳ در صد هزار مورد دیده شده است (۴).

از آنجایی‌که بروسلا در منابع غذایی وجود دارد و موجب تب مالت (یک بیماری ناتوانی عمومی دراز مدت) در انسان می‌شود، گونه‌های بروسلا در گروه B عوامل بیوتروریسمی مرکز پیشگیری و کنترل بیماری قرار می‌گیرند (۲). بنابراین اگرچه بروسلوز انسانی به ندرت کشنده است و انتقال بیماری به صورت فرد به فرد نیست، گونه‌های بروسلا به عنوان باکتری با قابلیت استفاده در بیوتروریسم شناخته شده‌اند (۳).

بروسلا چند ویژگی پاتوژنیک و بیولوژیک دارد که آن را به عامل مفیدی برای جنگ میکروبی تبدیل می‌کند. اول، بروسلاها از طریق مسیر تنفسی (آئروسل) بسیار مسری هستند، با یک دوز عفونتی در حدود ۱۰۰-۱۰ ارگانیسم (۵). دوم، بروسلوزیس انسانی به طور قابل توجهی بیماری ناتوان‌کننده است (۶)، در نتیجه تدارک و آماده‌سازی مراقبت برای شمار وسیعی از بیماران دارای تب مالت می‌تواند خیلی زیان بار و طاقت فرسا شود. سوم، درمان موفق بروسلوزیس انسانی نیازمند درمان آنتی‌بیوتیکی طولانی مدت (یعنی دوکسی‌ساکلین doxycycline و ریفامپین rifampin برای ۶ هفته) است (۶) و احتمال ۱۰-۵ درصدی عود مجدد بعد از درمان وجود دارد (۷). در نهایت هیچ واکسن موثر و ایمنی برای استفاده در انسان در دسترس نیست (۸).

به دلیل شناخت علایم بالینی ضعیف، ناکافی و ناهمگون، تشخیص بروسلوزیس همواره نیازمند یک روش تشخیص حساس، اختصاصی، سریع تکمیل شونده، ارزان و ساده در طراحی و اجرا هستند. این روش‌ها می‌توانند بسیاری از محدودیت‌های روش‌های سنتی را برطرف سازند (۹). از اینرو هدف از این تحقیق طراحی روش مولکولی بر پایهٔ PCR برای تشخیص گونه‌های بروسلا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج ژنوم باکتری: در این مطالعه از ژنوم باکتری Brucella abortus و Brucella melitensis به عنوان کنترل مثبت و از ژنوم چندین باکتری منسوب و غیرمنسوب به عنوان کنترل منفی استفاده گردید (جدول ۱). ژنوم باکتری‌های مورد نظر با استفاده از کیت استخراج DNA (CinnaGen DNA Purification kit) استخراج شد.

طراحی پرایمر: ژن bcsp در این مطالعه هدف گذاری شد. این ژن کروموزومی در سنتز پروتئین غشای خارجی بروسلا نقش دارد. پرایمرهای rtbc F و rtbc R با استفاده از نرم‌افزار Primer express v۳/۰ برای ژن bcsp بروسلا طراحی شدند و به منظور بررسی نهایی پرایمرهای طراحی شده و اطمینان از اختصاصی بودن آنها از سرویس BLAST سایت NCBI (National center for biotechnology information)

جدول ۱- لیست باکتریهای کنترل منفی مورد استفاده در این تحقیق

نام میکروارگانیسم	شماره سویه	محل تهیه
Staphylococcus aureus	ATCC ۲۵۹۲۳	انستیتو پاستور ایران
Bacillus subtilis	ATCC ۶۰۵۱	
Shigella sonnei	ATCC ۹۲۹۰	
Escherichia coli	ATCC ۲۵۹۲۲	
Klebsiella pneumoniae	ATCC ۷۸۸۱	

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

رفرنس	محصول PCR (bp)	توالی (۵´→۳´)	نام پرایمر
این مطالعه	۱۵۰	GCTCGGTTGCCAATATCAATG	rtbc F
		GGGTAAAGCGTCGCCAGAA	rtbc R

استفاده شد. ساخت پرایمرها توسط شرکت سیناژن انجام گرفت (جدول ۲).

واکنش PCR: واکنش PCR پرایمرهای rtbc F و rtbc R برای ۳۵ سیکل با برنامه‌ی دناتوراسیون اولیه ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه، دناتوراسیون ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۶۶/۸°C به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد.

همچنین یک واکنش ۲۵ میکرولیتری با شرایط مشابه و استفاده از آب دیونیزه به جای ژنوم باکتری به عنوان کنترل منفی انجام شد. پس از اتمام واکنش PCR، ۵ مایکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE X ۰/۵ با ولتاژ ۱۰۰ ولت، الکتروفورز گردید. در نهایت به منظور رویت باند مورد نظر، ژل آگاروز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با دستگاه ژل داک مشاهده شد.

تعیین ویژگی: به منظور بررسی ویژگی پرایمرها، واکنش PCR با شرایط فوق بر روی ژنوم استخراج شده باکتری‌های کنترل منفی انجام شد. همچنین به منظور اطمینان از قابلیت DNA استخراج شده مورد استفاده در واکنش PCR و عدم وجود مهار کننده در آن، واکنش PCR بر روی ژن کروموزومی ۱۶S rRNA که در تمام باکتری‌ها وجود دارد، انجام شد (۶).

کلونینگ محصولات PCR و تهیهٔ کنترل مثبت: به منظور دستیابی به یک روش تشخیص مولکولی مناسب و مطمئن، وجود کنترل مثبت جزء مهمی محسوب می‌گردد که برای تهیه آن از روش کلونینگ محصولات PCR در وکتور مناسب استفاده شد. به این منظور پس از تکثیر ژن‌های مورد نظر و خالص سازی با کیت خالص سازی (Bioneer (AccuPrep® PCR Purification Kit، واکنش اتصال آنها به وکتور pTZ۵۷R/T مطابق با کیت (InsTAclone TM PCR Fermentase Cloning Kit) انجام گرفت. پس از آماده سازی باکتری پذیرای E. coli top ۱۰ F´ ترانسفورماسیون انجام شد و در نهایت باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط Luria-Bertani agar (QUELAB) حاوی ۵-برومو ۴-کلرو ۳-ایندولیل بتا دی گالاکتو پیرانوزید یا X-gal (Fermentase) باغلظت ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر، ایزوپروپیل بتا دی تیوگالاکتوپیرانوزید یا IPTG (Fermentase) با غلظت ۳۸/۴ میکروگرم در میلی لیتر، آمپی سیلین باغلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و تتراسیکلین باغلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر کشت داده شدند.

ارزیابی اولیه کلونینگ بر اساس انتخاب کلنی‌های سفید به عنوان موارد مثبت و کلنی‌های آبی به عنوان موارد کنترل منفی انجام گرفت. جهت تایید موارد مثبت و منفی، پس از تهیه ماتریکس از کشت‌های اولیه، واکنش Colony-PCR با شرایط ذکر شده در بالا برای هر یک از ژن‌ها انجام شد. همچنین به منظور تایید نهایی کلون‌های دریافت کننده اینسرت، پس از استخراج پلاسمید با استفاده از کیت ACCU Prep (Plasmid Mini extraction kit) BIONEER، واکنش PCR بر روی پلاسمید استخراج شده انجام شد.

تعیین حساسیت و حد تشخیص (Limit of Detection (LOD: پس از انجام کلونینگ قطعهٔ مورد نظر از ژن bcsp ابتدا غلظت پلاسمید حاوی اینسرت با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer) مشخص شد، سپس جهت تعیین حساسیت واکنش، حداقل تعداد کپی از قطعه مورد نظر که بتواند در واکنش PCR باند واضحی ایجاد کند، مطابق روش ارائه شده توسط chiang محاسبه گردید (۶).

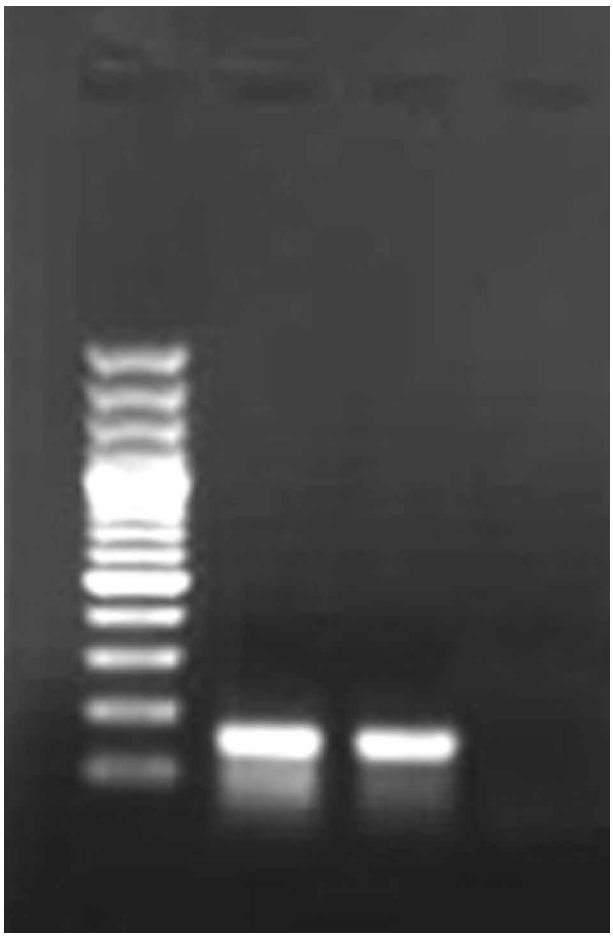
به این ترتیب برای محاسبهٔ حد تشخیص رقت‌های متوالی 10^{-1}–10^{-10} از پلاسمید حاوی اینسرت با غلظت مشخص تهیه شد و پس از انجام واکنش PCR روی رقت‌های متوالی پلاسمید، کمترین رقتی که باند مشخص و واضحی را نشان داد، به عنوان حد تشخیص تعیین شد.

توالی یابی: پس از انجام PCR، به منظور تایید نهایی از sequencing برای به‌دست آوردن توالی محصول کلون شده استفاده شد.

یافته‌ها

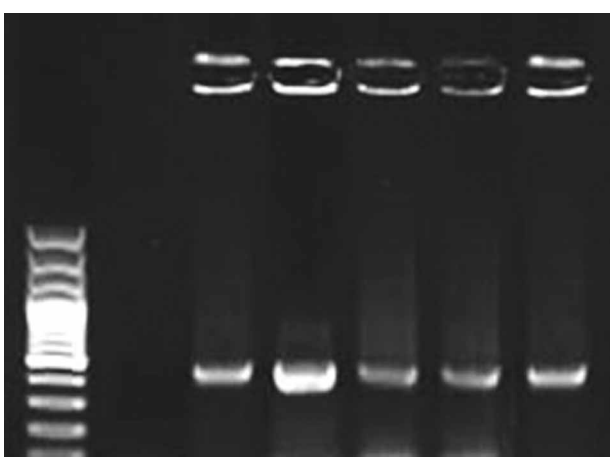
نتایج PCR: الکتروفورز محصول PCR پرایمرهای طراحی شده برای ژن bcsp باند ۱۵۰ جفت‌بازی را نشان داد. (تصویر ۱)

نتایج تعیین ویژگی: واکنش PCR مربوط به ژن bcsp، در هیچ یک از باکتری‌های کنترل منفی باندی را ایجاد نکرد، که این امر نشان دهنده ویژگی واکنش PCR در این مطالعه می‌باشد. همچنین مثبت

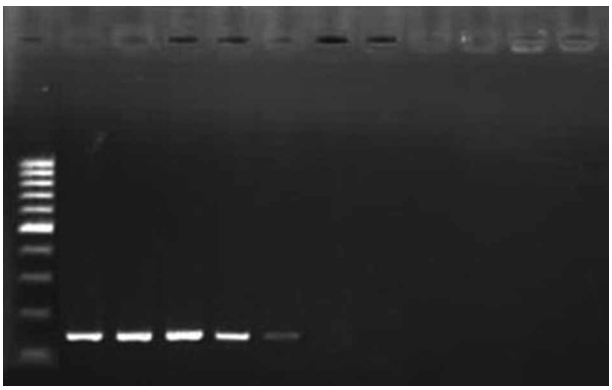


تصویر ۱- نتایج واکنش PCR مربوط به ژن bcsp، شماره ۱ Ladder ۱۰۰ bp (Fermentase)، شماره ۲ و ۳ محصول PCR ژن bcsp، شماره ۴ کنترل منفی

شدن واکنش PCR مربوط به ژن S rRNA ۱۶ با طول bp۴۷۵، حضور ژنوم استخراج شده قابل PCR را تایید نمود. (تصویر ۲)



تصویر ۲- نتایج واکنش PCR ژنوم باکتری‌های کنترل منفی با پرایمرهای rRNA ۱۶s، شماره ۱ Ladder ۱۰۰ bp(Fermentase)، شماره ۲ کنترل منفی، شماره ۷-۳ به ترتیب نتایج PCR ژنوم باکتری‌های Staphylococcus aureus، Bacillus subtilis، Shigella sonnei، Escherichia coli و Klebsiella pneumoniae.



تصویر ۳- نتایج واکنش PCR با رقت‌های متوالی پلاسمید دارای اینسرت، شماره ۱ Ladder ۱۰۰ bp (Fermentase)، شماره ۱۱-۲ رقت‌های ۱-۱۰ تا ۱۰-۱۰، شماره ۱۲ کنترل منفی. رقت ۵-۱۰ کمترین رقتی از پلاسمید دارای اینسرت با غلظت اولیه ۵۲۲ ng/µl می‌باشد، که در واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR قابل تشخیص است.

نتایج تهیه کنترل مثبت: واکنش PCR بر روی پلاسمید دریافت کننده اینسرت (کنترل مثبت) در مورد bcsp مطابق انتظار یک باند با طول ۱۵۰ جفت‌باز در ژل آگارز ایجاد نمود.

نتایج تعیین حد تشخیص: آخرین رقتی از پلاسمید دریافت کننده‌ی اینسرت با غلظت اولیه ۵۲۲ng/µl که باند قابل تشخیصی ایجاد نمود، 10^{-5} به دست آمد (تصویر ۳). با توجه به نتایج حاصل و با استفاده از روش ارائه شده توسط chiang کمترین تعداد کپی قابل تشخیص برای ژن bcsp در یک واکنش ۲۵ مایکرولیتری PCR برابر ۱۵۰۰ کپی تعیین شد (۶).

نتایج توالی یابی: با استفاده از مقایسه ترادف هدف به‌دست آمده از sequencing با database موجود، تطابق ۱۰۰٪ با ترادف ژن هدف مشاهده شد.

بحث

گونه‌های بروسلا باکتری‌های گرم منفی هستند که به صورت معمول باعث بیماری دامی می‌شوند (۱۰، ۱۱، ۱۲). ضربهٔ اقتصادی بروسلوزیس در غذای دام‌ها به دلیل محدودیت‌های تجاری، هم برای مالکان دام و هم برای کشورهایی که دام‌ها در آن قرار گرفته‌اند، اهمیت زیادی دارد (۱۳).

خون محیطی نمونهٔ بالینی اغلب روش‌های رایج برای جداسازی و ردیابی گونه‌های بروسلا است. در موارد حاد که توسط B.melitensis ایجاد می‌شوند، بازده کشت خون اغلب بالا است، با کارایی که به ۷۰-

۸۰ درصد می‌رسد (۱۴). اما این رقم بطور قابل ملاحظه‌ای در موارد مزمن بیماری کاهش می‌یابد، در بیمارانی که دچار عوارض جانبی مثل مننژیت، اندوکاردیت، التهاب مهره‌ها هستند و در عفونت‌های ایجاد شده توسط B.abortus و B.suis، میزان نتایج مثبت کشت در نهایت ۳۰–۵۰ درصد است (۱۵).

کمبودهای دیگر این روش‌ها این است که کشت‌های خون یک فرآیند زمان‌بر و نیازمند تمدید انکوباسیون هستند (۱۶) و جابجایی و کارکردن با آنها یک خطر قابل توجه برای کارمندان آزمایشگاهی می‌باشد (۱۷).

از طرفی حساسیت تست‌های سرولوژیک از ۶۵ درصد تا ۹۵ درصد است، اما اختصاصی بودن آنها در نواحی اندمیک به دلیل نفوذ بالای آنتی‌بادی‌ها در جمعیت‌های سالم کم است.

علاوه بر این اغلب تست‌های سرولوژیکی به واکنش متقابل با دیگر باکتری‌ها حساس هستند، و محدودیت‌های مهمی در فاز ابتدایی بیماری دارند.

همچنین تفسیر و تعبیر آنها در افرادی که از طریق شغل در معرض بروسلا قرار گرفته‌اند، در بیمارانی با سابقهٔ اخیر بروسلوزیس و در بیماری با عود مجدد بیماری سخت است.

در مورد بروسلا شناسایی ارگانیسم‌های کشت داده شده مبتنی بر ۲۵ ویژگی فنوتیپی، شامل سرولوژیکال تایپینگ آنتی‌ژن A و M، فاژ تایپینگ، نیازمندی به اتمسفر دارای CO_2 بالا، و فرآیندهای متابولیکی است. اما هنوز مشکلاتی مرتبط با این آزمون‌ها وجود دارد، شامل:

۱ـ زمان: زمانی حدود ۱۴–۱۰روز برای کشت باکتری و تکمیل تست‌ها نیاز است.

۲ـ سلامت زیستی: برای این آزمون‌ها، ارگانیسم‌های زنده مورد نیاز هستند، همچنین قرار گرفتن کارمندان آزمایشگاه در معرض عوامل احتمال آلودگی را افزایش می‌دهد.

۳ـ تعلیم و تمرین: تست‌های افتراقی مورد استفاده پیچیده هستند و به کارشناس‌های ماهر نیاز دارند.

۴ـ نتایج مبهم: شناسایی به تعیین و مشخصات ویژگی‌های بی‌شماری وابسته است. که بسیاری از آنها مثل نرخ فعالیت اوره‌آز در شرایط نسبی تعریف شده‌اند (۱۸).

۵ـ تشخیص‌های سرولوژیکی فاقد اختصاصی‌بودن لازم در نواحی است که بیماری در آن نواحی به صورت اندمیک است.

۶ـ علاوه بر این موارد، واکنش متقابل با دیگر باکتری‌ها نیز می‌تواند رخ دهد.

به منظور غلبه بر برخی از محدودیت‌های تکنیک‌های معمول، سنجش براساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به عنوان یک ابزار بسیار قدرتمند برای تشخیص بروسلوزیس انسانی پیشنهاد شده‌اند. سنجش برپایهٔ PCR حساس، اختصاصی، سریع تکمیل شونده، ارزان هنگام اجرا، ساده در طراحی و اجرا هستند و اغلب می‌توانند برای اصلاح کردن نیروی کار کمتر و بازده بیشتر به صورت خودکار درآیند. از زمانی‌که این فن‌آوری برای اولین بار گزارش شد، تست‌های PCR زیادی برای بروسلا گسترش یافته است. این روش‌ها می‌توانند بسیاری از محدودیت‌های روش‌های سنتی را برطرف سازند (۱۰).

در سال ۱۹۹۲ Baily و همکاران برای شناسایی اختصاصی جنس، براساس ژن رمزکنندهٔ پروتئین ۳۱ کیلودالونی ایمونوژن در B.abortus، پرایمرهای B۴ و B۵ را طراحی کردند. این روش تنها برای بروسلوزیس حیوانی پیشنهاد شده بود، همچنین در این مطالعه علی‌رغم حساسیت بالا، تنها توانایی ردیابی دوگونه‌ی B. abortus و B. melitensis بررسی شده بود، پیشنهادی برای کنترل مثبت در این مطالعه ارائه نشده بود (۱۹).

در سال ۱۹۹۵ Romero و همکاران پرایمرهای F۴ و R۲ را برای ژن ۱۶ srRNA در B. abortus برای ردیابی اختصاصی جنس بروسلا طراحی کردند. این روش قادر به توانایی تفکیک Ochrobactrum anthropi از گونه‌های بروسلا نبود، همچنین کنترل مثبتی برای آن ارائه نشده بود (۱۰).

در سال ۱۹۹۵ Leal-Klevezas و همکاران با استفاده از ژن پروتئین غشای خارجی (omp۲) پرایمرهای JPF و JPR را برای شناسایی اختصاصی جنس بروسلا طراحی کردند، باند ۱۹۳ bp بدست آمده در این روش نشان دهندهٔ وجود بروسلا در نمونه بود. حد تشخیص در این مطالعه برابر $۲/۵\times ۱۰^{-۱۰}$ µg در هر واکنش PCR تعیین شد و ویژگی پرایمرهای طراحی شده با انجام PCR بر روی ژنوم باکتری‌های Escherichia coli، Vibrio cholerae O۱، Yersinia enterocolitica O:۳، Rhizobiurn loti، Agrobacterium tumefaciens، Ochrobactrum anthropi تایید شد، در این مطالعه هیچ‌گونه کنترل

مثبتی برای تایید نمونه‌ها ارائه نشده است (۲۰).

Matar و دیگران در سال ۱۹۹۶ برای اولین بار یک روش PCR با حساسیت بالا برای تشخیص بروسلوزیس انسانی گزارش دادند. اما در مطالعات آنها شمار بیماران کم و در نتیجه اطلاعات بالینی نادر بود و تنها در یکی از بیماران بروسلوزیس از نظر باکتریولوژی تایید شد (۱۰).

با توجه به این ویژگی که تمامی گونه‌های بروسلا که بیماری‌زای انسانی هستند، بیماری تب مالت را در انسان ایجاد می‌کنند و همچنین از آنجایی‌که بروسلاها از نظر ژنتیکی بسیار مرتبط با هم هستند (۱۹، ۲۰)، شناسایی بروسلا در سطح گونه برای درمان اولیه بروسلوزیس انسانی ضروری نیست، در این مطالعه از ژن اختصاصی جنس bcsp برای ردیابی گونه‌های بروسلا استفاده شد.

ژن bcsp اختصاصی جنس می‌باشد، در تمامی گونه‌ها بروسلا وجود داشته و می‌تواند برای ردیابی و تشخیص سریع در نمونه‌های حیوانی و انسانی استفاده شود. همچنین روش ارائه شده بسیار اختصاصی بوده و با ژنوم Ochrobactrum anthropi که از نظر ژنتیکی بسیار مشابه گونه‌های بروسلا می‌باشد، واکنش متقابل نمی‌دهد (۲۱).

اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده، با انجام PCR بر روی ژنوم باکتری‌های منسوب و غیرمنسوب در این مطالعه تایید شد.

میزان حساسیت PCR حاضر که با استفاده از روش Chiang به‌دست آمده، توانایی ردیابی ۱۵۰۰ کپی از ژنوم را در یک واکنش PCR دارد که این مقدار در مقایسه با دیگر روش‌های ارائه شده برای ردیابی بروسلا حساسیت بالای روش را تایید می‌کند (۲۰).

نتیجه‌گیری

باکتری Brucella یک مهم سلامت عمومی در نواحی جغرافیایی است که این بیماری به صورت اندمیک در آنها وجود دارد. همچنین ویژگی‌های زیستی بروسلا و طبیعت بیماری‌زایی آن در انسان آن را به تهدیدی برای استفاده به عنوان عامل بیوتروریسمی تبدیل کرده است (۲، ۳).

به دلیل تظاهرات بالینی ضعیف و مشابه با دیگر بیماری‌ها، محدودیت‌های کشت و حساسیت کم روش‌های تشخیص سرولوژی، وقت گیر، پرخطر و پرهزینه بودن روش‌های معمول تشخیصی و با توجه به ضرورت روش‌های تشخیصی سریع برای بروسلا و ماهیت بالقوه باکتری برای استفاده بیوتروریسمی، بررسی روش‌های تشخیص دقیق و سریع برای کنترل این بیماری به خصوص در همه‌گیری‌ها حیاتی می‌باشد.

ژن bcsp مورد هدف در این مطالعه یک ژن کروموزومی می‌باشد (۱۰). با توجه به ردیابی $1/5 \times 10^{-8}$ µg از ژنوم در هر واکنش PCR و تایید اختصاصی بودن پرایمرها با استفاده از ژنوم دیگر باکترها، روش طراحی شده در مقایسه با مطالعات قبلی حساسیت و ویژگی بالایی داشته و استفاده از آن می‌تواند بر محدودیت‌های روش‌های رایج مورد استفاده در تشخیص بروسلا غلبه کند.

پیشنهادات

با توجه به محدیت‌های روش PCR و زمانبر بودن آن در مقایسه با Real-time PCR و اهمیت تشخیص سریع باکتری در موارد همه‌گیری و جنگ‌های بیولوژیک، طراحی روش تشخیص بروسلا با استفاده از Real-time PCR پیشنهاد می‌شود.

References

1- Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O, Boumedine K. Classification of Brucella strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. Microbes Infect. 2003; 5(7): 593 - 602.

2- Cloeckart A, Verger J M, Grayon M, et al. Classification of Brucella spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus, Microbes Infect.2001; 3:729–738.

3- Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis N Engl J Med. 2005; 352(22): 2325 - 2336.

4- http://www.pezeshk.us/?p=17061

5- Kaufmann AF, Meltzer M and Schmid G P. The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and post-attack intervention programs justifiable? Emerg. Infect Dis.1997; 3:83–94.

6- Chiang, YCH, Yang CH, Ho YCH, Lin CH. Tsen H.Y. Identification of Bacillus spp, Escherichia coli, Salmonella spp. Staphylococcus spp. and Vibrio spp. with16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization. International

Journal of Food Microbiology 2006;107, 131-137

7- Boschiroli M L, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, et al. Type IV secretion and Brucella virulence, Vet. Microbiol. 2002;90:341–348.

8- Hall WH.Modern chemotherapy for brucellosis in humans Rev Infect. Dis.1990; 12:1060–1099.

9- Hall WH. History of Brucella as a human pathogen in Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects (EJ Young and M J Corbel, eds) CRC Press, Boca Raton, FL 1989;1–9.

10- López-Goñi I, Moriyón I, Brucella Molecular and Cellular Biology, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain, 2005.

11- Chiang, Y.CH. Yang, CH. Ho, Y.CH. Lin, CH.K. Tsen, H.Y. Identification of Bacillus spp., Escherchia Coli, Salmonella spp. Staphylococcus spp. and Vibrio spp. with 16S Ribosomal DNA-Based Oligonucleotide Array Hybridization. International Journal of Food Microbiology 2006;107: 131–137.

12- United States Department of Health and Human Services a 42 CFR Part 1003 Possession use and transfer of select agents and toxins Fed Reg.2002; 240:76886–76905.

13- Nicoletti P. Relationship between animals and human disease in Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects (Young EJand M J Corbel eds.) CRC Press, Boca Raton, FL.1989;41–51.

14- Ariza J, Correidora J, Pallarés P, Viladrich PF, Rufi G, Pujol M, and Gudiol F. Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in human. Clin Infect Dis.1995; 20:1241–1249.

15- Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, Sanchez-Mora D, Delgado M, Causse M, Martín Farfán A, and Juárez C. Complications associated with Brucella melitensis infection: A study of 530 cases. Medicine (Baltimore). 1996;75:195–211.

16- Yagupsky P. Detection of Brucellae in blood cultures. Jclin Microbiol.1999; 37: 3437–3442.

17- Yagupsky P, Peled N, Riesenberg K, and Bana M. Exposure of hospital personnel to Brucella melitensis and occurrence of laboratory-acquired disease in an endemic area. Infect. Dis;2000: 31–35.

18- Alton G, Jones LMand PietzDE. Laboratory techniques in brucellosis Monograph series. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1975.

19- Rajashekara G, Eskra L, Mathison A, Petersen E, Yu Q, Harms J, Splitter G. Brucella functional genomics and host-pathogen interactions. Anim Health Res Rev. 2006; 7(1-2): 1–11.

20- Diana sara leal-klevezas et al, Single-Step PCR for Detection of Brucella spp. from Blood and Milk of Infected Animals, Journal of clinical microbiology.1995; 3087–3090.

21- Falguni M, Jainendra J, Vipul P, Mrinalini N. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. Journal of Medical Microbiology. 2007;56:1309–1316.

Rapid detection of causative agents of Malta Fever using Polymerase Chain Reaction

Majidzadeh K; MD[1], Hosseini SZ[2], Soleimani M; MD[3], Ghalyanchi A[4]

Received: 27 Jun 2010 Accepted: 1 Aug 2010

Abstract

Background: Malta fever is a zoonosis that it's causative agent is Brucella species. Although the disease is rarely fatal, but in natural epidemics or probable biologic wars, it's rapid and proper indiscrimination will scathe medical supplies drastically. Drawbacks of traditional diagnostic methods are time consuming, less accurate, less sensitive and contain false positive results. So the aim of this study is to design the PCR method for rapid detection of the organism.

Materials and Methods: Genus specific bcsp target gene was selected for primer designing using Primer express v3.0 software. Specificity of the PCR tests was determined using reactions containing various bacterial negative control genomes. For evaluation of sensitivity and limit of detection, the PCR products were cloned in pTZ57R/T plasmid and used from their serial dilutions.

Results: Electrophoresis of bcsp gene PCR product showed a single 150 bp band for B.abortus and B.melitensis. PCR tests using negative control bacterial genomes were not showed detectable bands after gel agarose electrophoresis. The cloning processes were confirmed by PCR and sequencing.

Conclusion: This method can be used for genus detection of the pathogen Brucella. and, it reduces time and cost needed for the organisms detection.

Keywords: Brucella spp., Malta Fever, PCR, bcsp

1- (*Corresponding Author) Assistant Professor, Army University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Tehran, Iran.
Tel: 021-85955240 E-mail: k_majidzadeh@armyums.ac.ir
2- Researcher, Azad University, Ghom, Iran.
3- Assistant Professor, Army University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- Researcher, Tasnim Research Center, Tehran, Iran.