Arak Medical University Journal (AMUJ)
2012, 14(6, Suppl 3): 31-39

Original Article

Diagnosis of human brucellosis by PCR using l7/l12 and 16srRNA genes compared with common serological tests

Pakzad I(Ph.D)[*1], Bahmani S(G.P)[2], Ghafouryan S(M.Sc)[1], Hosainzadegan H(Ph.D)[3]

1- Department of Microbiology and Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
2- Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
3- Department of Microbiology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received:24 Oct 2011 , Accepted: 4 Jan 2012

Abstract

Background: Brucellosis is one of the most common zoonotic diseases in the world which imposes a great financial burden on the endemic regions. Diagnosis of the human brucellosis is mainly based on blood culture and serological tests. PCR, however, is recommended for diagnosis at greater specificities and sensitivities. This study aims to compare the diagnosis of human brucellosis by PCR method using l7/l12 and 16srRNA genes and serological tests.

Materials and Methods: In a cross-sectional study, a total of 700 blood samples were collected from patients suspected to brucellosis who had referred to the hospitals and laboratories of Ilam, Iran. The samples were selected through Rose Bengal test. Then 50 positive samples diagnosed by Rose Bengal test were assayed by Wright, Coombs Wright, and PCR using l7/l12 and 16srRNA genes and 50 negative samples diagnosed by PCR using these two genes were tested.

Results: Of the total 700 samples assayed by Rose Bengal test, 125 were positive and the rest 575 were negative. The 50 positive Rose Bengal samples in PCR were shown to be positive by both genes and 50 negative Rose Bengal samples were shown negative by both samples. 47 samples in Wright test and 49 samples in Coombs test had titration levels above 1:60.

Conclusion: PCR method has a higher sensitivity and specificity in diagnosis of human brucellosis in comparison with serological tests. Sensitivity of PCR by l7/l12 gene is similar to16srRNA and can be used for diagnosis of human brucellosis.

Keywords: Brucellosis, L7/L12, PCR, Wright test

*Corresponding author:
Address: Department of Microbiology and Clinical Microbiology Research Center, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
Email: pakzad_i2006@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۴، شماره۶ ویژه نامه۳، زمستان ۱۳۹۰، ۳۹-۳۱

مقایسه تشخیص بروسلوزیس در انسان به روش *PCR* با استفاده از ژن‌های *L۷/L۱۲،۱۶srRNA* و روش های سرولوژیک

ایرج پاکزاد[1*]، سویا بهمنی[2]، سبحان غفوریان[3]، حسن حسین زادگان[4]

۱- استادیار، دکترای میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

۲- دانشجو پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

۳- کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

۴- استادیار، دکترای میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت ۹۰/۸/۲ ، تاریخ پذیرش ۹۰/۱۰/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام در دنیا و عامل زیان‌های اقتصادی بسیاری به ویژه در نواحی اندمیک بیماری است. تشخیص بیماری به صورت سنتی به وسیله کشت خون و روش‌های سرولوژیک انجام می‌گیرد که جهت تشخیص با حساسیت و اختصاصیت بالاتر روش *PCR* توصیه می‌گردد. در این مطالعه تشخیص بروسلوز در انسان به روش *PCR* با استفاده از ژن‌های *۱۶srRNA*و L۷/*L*۱۲ و روش‌های سرولوژیک مرسوم مدنظر است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ۷۰۰ نمونه خون از بیماران تب دار مشکوک به بروسلوزیس که به بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های شهر ایلام جهت انجام آزمایشات سرولوژیک مراجعه نموده بودند جمع‌آوری گردید و به وسیله آزمایش رزبنگال غربال‌گری شد، سپس ۵۰ نمونه مثبت رزبنگال تحت آزمایشات رایت، کومبس رایت و *PCR* با استفاده از دو ژن *۱۶srRNA* و L۷/*L*۱۲ قرار گرفت و ۵۰ نمونه منفی رزبنگال نیز به وسیله *PCR* با استفاده از دو ژن فوق الذکر آزمایش گردید.

یافته‌ها: از ۷۰۰ نمونه‌ای که به وسیله رزبنگال آزمایش شدند ۱۲۵ نمونه مثبت و ۵۷۵ نمونه منفی بود. ۵۰ نمونه مثبت رزبنگال در *PCR* به وسیله هر دو ژن مثبت و ۵۰ نمونه منفی رزبنگال در *PCR* به وسیله هر دو ژن منفی بودند. ۴۷ نمونه در آزمایش رایت و ۴۹ نمونه در آزمایش کومبس رایت تیتر بالای ۶۰: ۱ داشتند.

نتیجه گیری: روش *PCR* در مقایسه با روش‌های سرولوژیک در تشخیص بروسلوز انسانی دارای حساسیت و اختصاصیت بالاتری است. *PCR* با استفاده از ژنL۷/*L*۱۲ دارای حساسیت مشابه ژن *۱۶srRNA* می‌باشد و می‌توان از آن در تشخیص بروسلوز انسانی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: بروسلوز، L۷/*L*۱۲، تست رایت، واکنش زنجیره ای پلیمراز

***نویسنده مسئول:** ایلام، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی

Email: pakzad_i2006@yahoo.com

مقدمه

بروسلوز یکی از پنج بیماری مشترک بین انسان و دام است که در اثر آلودگی با باکتری‌های جنس بروسلا به وجود می‌آید(۱). بروسلوز در تمام مناطق دنیا وجود دارد و از مشکلات بهداشتی در بسیاری از کشورها محسوب می‌گردد. به طور تقریبی بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس مسئول تمامی موارد بروسلوز در انسان و دام کشور ما هستند. بروسلوز یک بیماری اندمیک در تمام قسمت‌های کشور می‌باشد(۲). علائم بالینی بروسلوز بسیار غیر اختصاصی است. تشخیص بر مبنای آزمایشات میکروبیولوژیکی (کشت میکروب) یا سرولوژیکی (حضور آنتی بادی) صورت می‌گیرد. خون معمولی‌ترین نمونه بالینی برای تشخیص باکتری بروسلا می‌باشد. در حالت‌های حاد بروسلوز ایجاد شده توسط بروسلا ملی تنسیس تعداد موارد مثبت کشت خون حدود ۸۰-۷۰ درصد نمونه‌ها می‌باشد. در حالی که در سایر موارد، مانند منتژیت بروسلایی، اندوکاردیت و اورکیت اپیدیدمیت شانس جدا سازی باکتری شدیداً کاهش می‌یابد. در حالتی که بیماری توسط گونه‌های بروسلا آبورتوس و سویس ایجاد شده باشد، موارد مثبت کشت خون به ۵۰-۳۰ درصد می‌رسد. هر چند کشت خون نمونه مناسبی جهت جدا سازی باکتری است اما دارای معایبی نیز می‌باشد، از جمله زمان نمونه‌گیری، امکانات کشت، طولانی بودن زمان انکوباسیون کشت، نیازمندی بروسلا آبورتوس و اویس به CO_2 جهت رشد و سخت رشد بودن بروسلا را می‌توان نام برد. آزمایشات سرولوژیکی متعددی برای تشخیص نمونه‌های بالینی بروسلوز استفاده می‌شود که حساسیت این تست‌ها از ۱۰۰-۶۵ درصد (رزبنگال: ۱۰۰ درصد، *sat*: ۹۳-۹۲ درصد) متغیر می‌باشد(۳). حساسیت این آزمایشات در مناطقی که بروسلوز اندمیک بوده به دلیل میزان بالای آنتی بادی در جمعیت سالم پایین می‌باشد. علاوه بر این وجود تقاطع آنتی ژنیک با سایر باکتری‌ها (یرسینیا *انتروکولیتیکا*O۹ ، *اشریشیا* کلای *O*۱۵۷:*H*۷، سالمونلا انتریکا) در آزمایشات سرولوژیک موجب اختلال در تشخیص صحیح می‌شود(۴). با توجه به توضیحات ذکر شده، در مورد تشخیص بروسلوز با استفاده از کشت خون و آزمایشات سرولوژیک، استفاده از یک تکنیک جایگزین ضروری می‌باشد(۵).

پروتئین‌های ریبوزومی L۷/*L*۱۲ دو پروتئینی هستند که به وسیله یک ژن مشابه کد می‌شوند *(rplL)*. طی عفونت‌های داخل سلولی باکتریایی مثل بروسلا و مایکوباکتریا، بعضی از ترکیبات ساختاری باکتریال مثل پروتئین ریبوزومی L۷/*L*۱۲ به وسیله پاسخ ایمنی میزبان درگیر می‌شوند. این خانواده که جزیی از زیر واحد بزرگ پروتئین ریبوزومی هستند(۵۰*S*) خانواده L۷/*L*۱۲ نامیده می‌شوند. L۷/*L*۱۲ در هر زیر واحد ۵۰*S* در ۴ کپی که به عنوان ۲ دایمر سازمان یافته است وجود دارد(۸). ژن ۱۶*srRNA* بخشی از *RNA* ریبوزومی است(بخشی از زیر واحد کوچک ریبوزوم پروکاریوتی ۳۰*S*) که در مطالعات فیلوژنتیک به کار گرفته می‌شود(۶، ۷).

در تحقیقات متعدد در تشخیص بروسلوز با استفاده از روش *PCR* مشخص گردیده که *PCR* در تشخیص مراحل حاد بیماری، پی‌گیری درمان، عود و موارد مزمن مفید می‌باشد(۸). استفاده از ژن‌های مختلف این باکتری در مواردی که تیتر سرمی بالای ۱/۱۶۰ است نتایج متفاوتی داشته است مثلا در مطالعه نارو و همکاران در سال ۲۰۰۴ ژن ۱۶*srRNA* در قیاس با ژن *BCSP31* قدرت تشخیص بیشتری داشت(۱۵-۹). با توجه به اندمیک بودن بروسلوز در ایران به ویژه استان ایلام در این تحقیق تشخیص بروسلوز در انسان با روش *PCR* با استفاده از ژن ۱۶*srRNA* و L۷/*L*۱۲ و مقایسه آن با روش‌های سرولوژیک مرسوم مدنظر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت مقطعی انجام گرفت. ۱۰ میلی لیتر نمونه خون از ۷۰۰ بیمار تب‌دار مشکوک به بروسلوزیس که توسط پزشکان به آزمایشگاهای بیمارستان‌ها وآزمایشگاه‌های سطح شهر ایلام جهت انجام آزمایشات سرولوژیک ارجاع داده شده بودند، گرفته شد. تمام نمونه‌ها به وسیله تست رزبنگال غربال‌گری شدند که ۱۲۵ نمونه مثبت و مابقی منفی بودند از میان نمونه‌های مثبت ۵۰ نمونه و از نمونه‌های منفی ۵۰ نمونه به صورت تصادفی انتخاب گردید. از ۵۰ نمونه مثبت رزبنگال جهت جداسازی

سرم و انجام تست سرولوژیک رایت و انجام تست کومبس رایت مطابق تکنیک‌های استاندارد و با استفاده از آنتی ژن‌های تجاری در دسترس استفاده گردید و سپس استخراج *DNA*کروموزومی و انجام تکثیر ژنوم باکتری به روش *PCR*با استفاده از ژن‌های *srRNA*۱۶، L۷/*L*۱۲ انجام شد. از ۵۰ نمونه منفی رزبنگال نیز جهت انجام *PCR* با استفاده از دو ژن فوق الذکر استفاده گردید سپس نتایج هر روش را یادداشت و در نهایت با یکدیگر جهت تعیین حساسیت روش *PCR* در تشخیص بروسلوز مقایسه شدند.

جداسازی سرم، با استفاده از سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه در مدت ۵ دقیقه انجام شد وسرم (مایع رویی) جهت انجام تست‌های سرولوژیک به ویال‌های ۱/۵ منتقل گردید و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام تست‌های سرولوژیک نگهداری شدند. سپس تست‌های سرولوژیک مرسوم شامل رزبنگال، رایت (سریع/ لوله‌ای) و کومبس رایت طبق روش‌های استاندارد انجام شد.

جهت جداسازی *DNA* از سرم، از روش *جوشاندن* استفاده گردید. نمونه‌ها در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند، سوپرناتانت حذف گردیده و باقیمانده در آب مقطر تزریقی حل شد و دوباره در ۱۵ هزار دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سوپرناتانت (مایع رویی) دور ریخته شد و مواد ته نشین شده در ۴۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. سپس در آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و پس از آن داخل ظرف یخ سرد گردید و به مدت ۱۰ ثانیه در ۱۵ هزار دور سانتریفوژ گردید و در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری گردید. ۴ میکرولیتر از *DNA* استخراج شده برای *PCR* استفاده گردید(۸، ۱۶، ۱۷).

دو جفت پرایمر برای تکثیر ژن‌های *srRNA*۱۶ و L۷/*L*۱۲ بروسلا مورد استفاده قرار گرفتند(جدول ۱). واکنش تکثیر ژن‌ها با استفاده از دستگاه ترمو سایکلر (اپندورف)انجام گرفت(۱۸).

جدول۱. پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده برای تشخیص *DNA* بروسلا بوسیله *PCR*

نام	توالی پرایمر	ژن هدف	سایز(*bp*)
۴F	*TCG AGCGCCCGCAAGGGG*	*۱۶srRNA*	*۹۰۵bp*
۲R	*AACCATAGTGTCTCCACTAA*		
FL	*CCGTCTAGAAAATGGCTGCTGATCTCGCAAAG*	L۷/*L*۱۲	*۳۷۵bp*
RL	*CCGTCTAGATTACTTGAGTTCAACCTTGGG*		

یافته ها

از بین ۷۰۰ نمونه خون بیماران مشکوک به بروسلوزیس تعداد موارد مثبت شده تست رزبنگال ۱۲۵ نمونه و موارد منفی ۵۷۵ مورد می‌باشد. در جدول ۲ نتایج تست رایت و کومبس رایت که بر روی ۵۰ نمونه مثبت شده در آزمایش رزبنگال صورت گرفته بود، آورده شده است. با توجه به جدول ۲ حساسیت تست رایت دررقت ۱:۱۶۰در مقایسه با رزبنگال ۹۴ درصد است و حساسیت تست کومبس رایت دررقت ۱:۱۶۰ در مقاسیه با رزبنگال ۹۸ درصد می‌باشد.

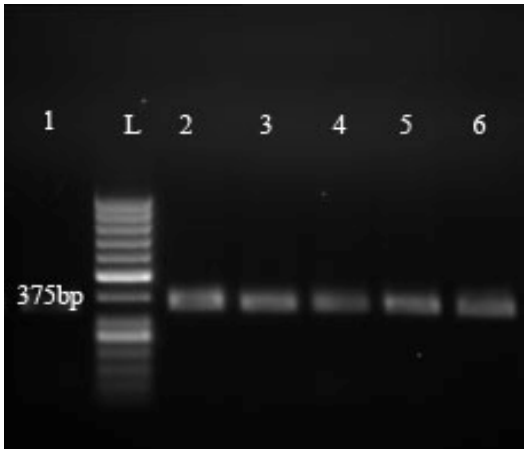
جدول ۲. نتایج تست رایت و کومبس رایت در بین ۵۰ نمونه رزبنگال مثبت

تست	فراوانی تعداد(درصد)		۱:۴۰	۱:۸۰	۱:۱۶۰
رایت	۴۷	۹۴	+	+	+
کومبس رایت	۴۹	۹۸	+	+	+

PCR بر روی ۱۰۰ نمونه سرمی (شامل ۵۰ نمونه رزبنگال مثبت و ۵۰ نمونه رزبنگال منفی) و بر روی ۲ ژن متفاوت صورت گرفت(شکل ۱). نتایج حاصل از *PCR* با استفاده از ژن *srRNA*۱۶برای ۱۰۰ نمونه سرمی نشان داد که حساسیت تست *PCR* با استفاده از ژن *srRNA*۱۶ در قیاس با تست رزبنگال ۱۰۰ درصد می باشد(جدول ۳). همان طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود حساسیت تست *PCR*

با استفاده از ژن L۷/*L*۱۲ در قیاس با تست رزبنگال ۱۰۰ درصد بوده و در جدول ۵ نیز مشاهده می‌شود که نتایج حاصل از *PCR* ژن L۷/*L*۱۲ با ژن*srRNA* ۱۶ در تشخیص بروسلوزیس دارای حساسیت یکسان می باشند.

الف



ب

شکل-۱: الف) نتایج الکتروفورز محصول *PCR* با استفاده از پرایمرهای ژن*srRNA* ۱۶ برای ۱۰۰ نمونه سرمی شامل ۵۰ نمونه رزبنگال مثبت و ۵۰ نمونه رزبنگال منفی.ستون ۱-۷، باند ۹۰۵pb مربوط به ژن*srRNA* ۱۶ می باشد ستون۹-۱۰ مربوط به الکتروفورز محصول PCR *ژنوم بروسلا آبورتوس* S۹۹ ،شماره ۸ مربوط به نمونه سرمی رزبنگال منفی است. *L*: مارکر *bp*۱۰۰، ب) نتایج الکتروفورز محصول *PCR* با استفاده از پرایمرهای ژن L۷/*L*۱۲ برای ۱۰۰ نمونه سرمی شامل ۵۰ نمونه رزبنگال مثبت و ۵۰ نمونه رزبنگال منفی،ستون ۶-۲ مربوط به ژنL۷/*L*۱۲ با *bp*۳۷۵ و ستون ۱ نمونه سرمی رزبنگال منفی است.

جدول ۳. حساسیت تست *PCR* با استفاده از ژن *۱۶srRNA* در قیاس با رزبنگال

PCR با استفاده از ۱۶*srRNA* / رزبنگال	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۵۰	۰	۵۰
منفی	۰	۵۰	۵۰
جمع	۵۰	۵۰	۱۰۰

جدول ۴. حساسیت تست *PCR* با استفاده از ژن *L۷/L۱۲* در قیاس با رزبنگال

PCR با استفاده از L۷/*L*۱۲ / رزبنگال	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۵۰	۰	۵۰
منفی	۰	۵۰	۵۰
جمع	۵۰	۵۰	۱۰۰

جدول ۵ . مقایسه نتایج حاصل از *PCR* ژن L۷/*L*۱۲ با ژن *۱۶srRNA* در تشخیص بروسلوزیس

ژن / نتیجه	L۷/*L*۱۲	۱۶*srRNA*
مثبت	۵۰	۵۰
منفی	۵۰	۵۰
جمع	۱۰۰	۱۰۰

بحث

تشخیص بروسلوز در حال حاضر بر اساس جداسازی بروسلا یا کشف پاسخ ایمنی به وسیله روش‌های سرولوژیک کلاسیک یا حضور یافته‌های بالینی شاخص قرار دارد. در حالی‌که این شاخصه‌ها به دلایلی که اشاره خواهد شد رضایت بخش نیستند روش‌های جدید و بهینه شده تشخیص مورد نیاز می‌باشند. روش *PCR* در عفونت گونه‌های بروسلا به ندرت مورد استفاده قرار می‌گیرد و هیچ استانداردی راجع به چگونگی آماده سازی نمونه، توالی هدف، *PCR* و روش‌های ردیابی تاکنون منتشر نگردیده است. ارزیابی‌های موازی در آزمایشگاه‌های مختلف نیازمند استاندارد سازی تکنیک‌ها در تشخیص و پی‌گیری بیماران است. کشت خون، استاندارد طلایی تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز است. کشت‌های مثبت بروسلا ملی تنسیس در عرض۷ روز از انکوباسیون تا ۹۵ درصد گزارش گردیده

است. صرف نظر از این که این روش همیشه در دسترس نمی‌باشد، دوره طولانی انکوباسیون و واسطه‌های ویژه‌ای که برای رشد ارگانیسم‌ها مورد نیاز می‌باشند از معایب این روش هستند. این تکنولوژی در کشورهای در حال توسعه و مناطق روستایی که بیماری در آنها شایع است موجود نمی‌باشد. به علاوه به علت زمان طولانی تکثیر، گونه‌های بروسلا به کندی رشد نموده که مانع ایزولاسیون سریع آنها می‌شود. موارد موضعی، مزمن و عود کننده بیماری و هم‌چنین مواردی که توسط گونه‌های غیر از بروسلا ملی تنسیس ایجاد می‌شود نتیجه کشت خونشان اندک است که خود سبب مشکلات تشخیصی ویژه‌ای می‌گردد و در نتیجه ردیابی و تشخیص گونه‌های بروسلا در نمونه‌های کلینیکی به وسیله روش کشت مشکل و وقت‌گیر می‌باشد. تست‌های آگلوتیناسیون مختلفی از قبیل رزبنگال، رایت لوله‌ای، رایت اسلایدی و کومبس رایت و ایمونوفلورسانس غیر مستقیم، فیکساسیون کمپلمان و الیزا نیز در حال حاضر برای تشخیص بروسلوز وجود دارد. روش استاندارد در مقایسه با تمام این روش‌ها تست آگلوتیناسیون لوله‌ای رایت است. دامنه گسترده حساسیت تست‌ها، اختصاصیت پایین در مناطق اندمیک، توانایی پایین در تشخیص موارد مزمن و عود کننده بیماری، وجود آنتی بادی‌های با واکنش متقاطع و مناسب نبودن این روش‌ها از مشکلات سرولوژی بروسلوزیس می‌باشند. عوامل زیادی وجود دارند که در آزمایش‌های سرولوژی باعث نتایج مثبت و منفی کاذب می‌گردند که مهم‌ترین آن شباهت آنتی ژنی بروسلا با برخی باکتری‌های گرم منفی است. بعد از درمان بروسلوزیس نیز تا مدت طولانی مقدار *IgM* در سرم بالاست که خود می‌تواند باعث ایجاد واکنش‌های مثبت کاذب شود. واکنش متقاطع آنتی ژن‌های باکتری‌های غیر بروسلا با آنتی بادی ضد بروسلایی از مشکلات دیگر روش‌های سرولوژی می‌باشد. مهم‌ترین باکتری که با بروسلاها واکنش متقاطع دارد یرسینیا آنتروکولیتیکا سویه *O*:۹ است که مهم‌ترین عامل ایجاد واکنش‌های مثبت کاذب است. واکنش متقاطع *E-coli* سویه *O*:۱۵۷ با بروسلا نیز به دفعات گزارش شده است. واکنش متقاطع بروسلا با باکتری‌های ویبریوکلرا، فرانسیسلا و سالمونلا نیز گزارش گردیده است.

استانداردی برای تهیه آنتی ژن متداول حتی برای روش استاندارد آگلوتیناسیون لوله‌ای رایت وجود ندارد. روش مولکولی، هم‌چون پاتوژن‌های سخت رشد دیگر، راه دیگری را برای تشخیص بروسلوزیس پیشنهاد می‌کند. تکنیک‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیکی هم‌چون *PCR* که دارای حساسیت و اختصاصیت بالا و زمان برگشت کوتاه است می‌تواند بر محدودیت‌های روش‌های مرسوم غلبه نماید(۱۹).

اولین آزمایش تشخیصی انجام شده بر پایه *PCR* توسط فکت و همکاران منتشر گردید در این آزمایش یک توالی از ژن کد کننده پروتئین غشای خارجی ۴۳ کیلو دالتونی بروسلا آبورتوس سویه *S*۱۹ تکثیر گردید که برای بروسلا اختصاصی بوده و حساسیت بالایی نیز برای آن گزارش گردید ولی هیچ‌گاه پرایمرها و توالی هدف منتشر نگردید(۲۰). دومین ژن هدف بروسلا که مورد مطالعه قرار گرفت *۱۶srRNA* بود که به منظور تعیین اختصاصیت آن، این ژن در مورد ۱۷ باکتری دیگر نیز به کار برده شد و در هیچ کدام از گونه‌های غیر بروسلا به جز اکراباکتریوم آنتروفی که نزدیک‌ترین گونه شناخته شده به بروسلا است تکثیر نگردید(۲۱). بیلی و همکاران روش *PCR* جدیدی را بر پایه ژن کد کننده پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی بروسلا ابورتوس(*BCSP*۳۱) منتشر نمودند. این ژن در تمام گونه‌ها و بیوتایپ‌های بروسلا به جز بروسلااویس بیان می‌گردد(۲۲). لیل کلوزاس در سال ۱۹۹۵ و همکاران جفت پرایمر جدیدی را که با پروتئین منشاء خارجی (*OMP*-۲) همولوگ بودند و از بروسلا آبورتوس مشتق شدند توصیف نمودند(۲۳).

در این مطالعه، علاوه بر مقایسه روش‌های سرولوژیک مرسوم (رایت، کومبس رایت) با *PCR*، حساسیت *PCR* با استفاده از ژن *۱۶srRNA* با ژن L۷/*L*۱۲ مقایسه گردید. ژن L۷/*L*۱۲ برای اولین بار در این مطالعه برای تشخیص بروسلوز انسانی مورد استفاده قرار گرفت.

حساسیت *PCR* با استفاده از ژن *16srRNA* و *L12/L7* ۱۰۰ درصد بود که در قیاس با روش‌های سرولوژیک حساسیت بالاتری دارند. دلیل حساسیت بالای این تست در تشخیص بروسلوز شاید به این دلیل است که بیماران بررسی شده در این مطالعه در فاز حاد بیماری بوده‌اند و دارای تعداد باکتری‌های در هر میلی‌لیتر بیش از CFU ۷۱۵ می‌باشد که به طور عمده دارای تیتری بیش از ۱:۸۰ می‌باشند که مشابه با تحقیقات جموچی و همکاران در سال ۲۰۱۱ می‌باشد(۲۴). نمیری و همکاران در سال ۲۰۰۳ در تشخیص بروسلوز با *PCR* نشان دادند این تکنیک دارای حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰ درصد می‌باشد در حالی که روش‌های سرولوژی حساسیتی حدود ۹۸ درصد داشتند که مشابه تحقیق حاضر می‌باشد(۱۰). در مطالعه‌ای که متار و همکاران در سال ۱۹۹۶ برای مقایسه روش‌های سرولوژیک و *PCR* انجام دادند نمونه خون ۲۰ بیمار مبتلا به بروسلوز تیترهای آگلوتیناسیون ۱۶۰ :۱ تا ۵۱۲۰ :۱ داشته و همگی آنها *PCR* مثبت شدند که نشان دهنده حساسیت ۱۰۰ درصد *PCR* بود(۱۱). شاید از دلایل دیگر حساسیت بالای *PCR* در این تحقیق استخراج درست *DNA* از نمونه سرمی می‌باشد که علی رغم تیتر پائین در روش سرولوژی رایت و کومبس رایت منجر به تشخیص ۱۰۰ درصد موارد شده است.

در مطالعه کوئیپواورتنو و همکاران که بر روی ۵۰ نمونه خون محیطی از بیماران مبتلا به بروسلوز انجام گرفت تمام ۵۰ نمونه *PCR* مثبت بوده که حساسیت و اختصاصیت آن به ترتیب ۱۰۰ و ۹۸ درصد بود. ۱۵ بیمار کشت خون منفی (۳۰ درصد) و ۸ بیمار نتایج سرولوژیک منفی داشتند (۱۶ درصد)(۱۲). یعنی در مواردی که روش‌های سرولوژی و کشت قادر به تشخیص نیستند روش *PCR* توانایی شناسایی بیماری را دارا می‌باشد. در مطالعه ناوارو و همکاران به منظور مقایسه ۳ جفت پرایمر *F4/R2*، *B4/B5*، *JPF/JPR*، حساس‌ترین پرایمرها *F4/R2* (*16srRNA*) بودند(۹) که به نظر می رسد دلیل این حساسیت بالا انتخاب مناسب ژن هدف در این تکنیک می‌باشد و از طرف دیگر با توجه به تعداد کپی‌های زیاد ژن *L12/L7* در ژنوم باکتری بروسلا، این حساسیت احتمالاً با این دلیل قابل توجیه می‌باشد. در مطالعه کاظمی و همکاران در مورد حساسیت و اختصاصیت تست رایت در مقایسه با *PCR* در تشخیص بروسلوز با استفاده از *16srRNA* ، نشان دادند که حساسیت آن ۱۰۰ درصد و ۶۴/۵ درصد بود(۲۵). این حساسیت بالا با مطالعه حاضر قابل مقایسه است.

نتیجه گیری

با توجه به این که *L12/L7* برای اولین بار در این مطالعه برای تشخیص بروسلوزیس مورد استفاده قرار می‌گیرد و دارای حساسیت مشابه ژن *16srRNA* در تشخیص بروسلوز انسانی می‌باشد می‌توان پیشنهاد داد که این ژن برای تشخیص بروسلوزیس در روش *PCR* مورد استفاده قرار گیرد. *PCR* با استفاده از ژن *L12/L7* در قیاس با تست کومبس رایت و رایت دارای حساسیت ۱۰۰ درصد می‌باشد که با توجه به سرعت عمل و حساسیت بالای این روش بر تست رایت و کومبس رایت ارجحیت دارد.

تشکر و قدردانی

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ایلام به دلیل حمایت‌های مالی از طرح مذکور تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. The Lancet infectious diseases. 2007; 7(12):775-86.

2. Pakzad I, Rezaee A, Emaneini M, Hosseini AZ, Tabbaraee B, Taherikalani M. Expression of Human Serum Albumin- L 7/L 12(Brucella abortus Ribosomal Protein) Fusion Protein in Saccharomyces cerevisiae. Polish Journal of Microbiology. 2009;58(2):99-104.

3. Pakzad I, Rezaee A, Rasaee MJ, Tabbaraee B, Delpisheh A. Immunogencity of HSA-L7/L12 (Brucella abortus ribosomal protein) in an animal model. Iranian journal of immunology: IJI. 2009;6(1):12-21.[Persian]

4. Mantur BG, Bidari LH, Akki AS, Mulimani MS, Tikare NV. Diagnostic yield of blood clot culture in the accurate diagnosis of enteric fever and human brucellosis. Clinical laboratory. 2007; 53(1-2):57-61.
5. Mantur B, Amarnath S, Shinde R. Review of clinical and laboratory features of human Brucellosis. Indian journal of medical microbiology. 2007;25(3):188-202.
6. Pakzad I, Rezaee A, Rasaee MJ, Hossieni AZ, Tabbaraee B, Kazemnejad A. Protection of BALB/C mice against Brucella abortus 544 challenge by vaccination with combination of recombinant human serum albumin-l7/l12 (Brucella abortus ribosomal protein) and lipopolysaccharide. Roum Arch Microbiol Immunol. 2010;69:5-12.
7. Shen MW. Diagnostic and therapeutic challenges of childhood brucellosis in a nonendemic country. Pediatrics. 2008;121(5): e1178-83.
8. Elfaki MG, Uz-Zaman T, Al-Hokail AA, Nakeeb SM. Detection of< i> Brucella</i> DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2005; 53(1): 1-7.
9. Navarro E, Escribano J, Fernandez J, Solera J. Comparison of three different PCR methods for detection of Brucella spp. in human blood samples. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2002;34(2):147-51.
10. Nimri L. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. BMC infectious diseases. 2003; 3(1):5-7.
11. Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton Brucella antigen DNA. Journal of clinical microbiology. 1996; 34(2): 477-8.
12. Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. Journal of clinical microbiology. 1997; 35(11): 2927-30.
13. Al-Attas RA, Al-Khalifa M, Al-Qurashi AR, Badawy M, Al-Gualy N. Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. Annals of Saudi Medicine. 2000; 20(3/4):224-8.
14. 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(4):1211-8.
15. Elfaki MG, Al-Hokail A, Nakeeb SM, Al-Rabiah FA. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of brucellosis in humans. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research. 2005; 11(11): MT69-74.
16. El Kholy A, Gomaa H, El Anany M, El Rasheed EA. Diagnosis of human brucellosis in Egypt by polymerase chain reaction. Eastern Mediterranean Health Journal. 2009;15(5): 1069-74.
17. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis N. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. Journal of clinical microbiology. 2001;39(4):1661-4.
18. Baddour MMBMM, Alkhalifa DHADH. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of Brucella DNA in peripheral human blood. Canadian journal of microbiology. 2008;54(5):352-7.
19. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I. Specific detection of Brucella DNA by PCR. Journal of clinical microbiology. 1995; 33(3): 615-7.
20. Fekete A, Bantle J, Halling SM, Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for Brucella using polymerase chain reaction. Journal of Applied Microbiology. 1990; 69(2):216-27.
21. Herman L, De Ridder H. Identification of Brucella spp. by using the polymerase chain reaction. Applied and environmental microbiology. 1992;58(6):2099-101.
22. Baily G, Krahn J, Drasar B, Stoker N. Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification. The Journal of tropical medicine and hygiene. 1992; 95(4):271-5.
23. Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP. Single-

step PCR for detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals. Journal of clinical microbiology. 1995;33(12):3087-90.
24. Gemechu M, Gill J, Arora A, Ghatak S, Singh D. Polymerase chain reaction (PCR) assay for rapid diagnosis and its role in prevention of human brucellosis in punjab, India. International journal of preventive medicine. 2011; 2(3):170-7.
25.Kazemi B, Namin SAY, Bandepour M, Kafilzadeh F, Gachkar L, Mahmoudinejad F, et al. Detection of Brucella by peripheral blood PCR and comparison with culture and serological methods in suspected cases. Iranian Journal of Public Health. 2008;37(4): 96-102.[Persian]