Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2012, 14(6, Suppl 3): 40-48

Evaluation of three DNA extraction methods for detection of brucella DNA in human serum samples

Peeri Dogaheh H(Ph.D)[1], Valinejad Z(G.P)[2], Pourfarzi F(Ph.D)[3*]

1- Department of Microbiology, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
2- Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
3- Department of Social Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Received: 2 Nov 2011 , Accepted: 4 Jan 2012

Abstract

Background: Human brucellosis is a significant public health concern in many countries, including Iran. Therefore, the development of new diagnostic techniques, with high sensitivity and minimum risk of laboratory infection are of great importance. PCR is one of the procedures which has these advantages. However, PCR efficiency is largely dependent on DNA extraction methods. In this study, we studied the efficiency of three different extraction methods of brucella DNA in serum samples.

Materials and Methods: In this experimental study, microbial suspensions were initially prepared in saline that its turbidity was equivalent to 0.5 McFarland. Human serum samples were spiked with certain concentrations of *Brucella melitensis* in vitro. DNA was extracted by three methods and tested by a genus-specific PCR method.

Results: Our results showed that the cinneagen kit protocol detected brucella DNA in lower serum concentrations compared with the other protocols. Cinnagen kit could detect brucella DNA in ten-fold dilution in comparison with the other two methods.

Conclusion: According to the findings of this study, cinnagen kit was the preferred assay method that yields a better sensitivity for isolation of brucella DNA in serum samples.

Keywords: Brucellosis, DNA extraction, PCR

*Corresponding author:
Address: Department of Social Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
Email: f.pourfarzi@arums.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۴، شماره۶ ویژه نامه۳، زمستان ۱۳۹۰، ۴۸-۴۰

بررسی کارائی سه روش مختلف استخراج DNA بروسلا در نمونه های سرم انسان

هادی پیری دوگاهه[۱]، زهرا ولی نژاد[۲]، فرهاد پورفرضی[۳*]

۱- استادیار، دکترای میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲- پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۳- دانشیار، دکترای پزشکی اجتماعی، گروه پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت ۹۰/۸/۱۱، تاریخ پذیرش ۹۰/۱۰/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز انسانی در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران، یک مشکل اساسی بهداشت جامعه می‌باشد. ابداع روش‌های جدید تشخیصی که دارای حساسیت بالایی بوده و خطر عفونت در پرسنل آزمایشگاه را به حداقل برساند، از اهمیت زیادی برخوردارمی‌باشد. از جمله روش‌هایی که این مزایا را دارد، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) است. با وجود این کارایی PCR تا حد زیادی به روش‌های استخراج DNA وابسته می‌باشد. ما در این مطالعه، کارایی سه روش مختلف استخراج DNA باکتری بروسلا در سرم را مورد بررسی قرار داده ایم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا از باکتری بروسلا، سوسپانسیون میکروبی در سرم فیزیولوژی تهیه گردید که معادل کدورت نیم مک فارلند بود. نمونه‌های سرم انسان به طور مصنوعی با غلظت‌های مشخصی از باکتری بروسلا تلقیح شدند. با سه روش متفاوت، DNA استخراج شد و با PCR اختصاصی جنس بروسلا مورد آزمایش قرار گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های ما نشان داد که پروتکل کیت سیناژن در مقایسه با دو روش دیگر در رقت‌های پایین‌تری از DNA بروسلا قادر به ردیابی DNA این باکتری در سرم می‌باشد. کیت سیناژن توانست DNA باکتری را در رقت ده برابر کمتر در مقایسه با دو روش دیگر ردیابی نماید.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه کیت سیناژن روش ارجح در استخراج بوده و دارای حساسیت بهتر برای جداسازی DNA بروسلا از نمونه‌های سرم می‌باشد.

واژگان کلیدی: ، بروسلوز، استخراج DNA، PCR

* **نویسنده مسئول:** اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه پزشکی اجتماعی

Email: f.pourfarzi@arums.ac.ir

مقدمه

بروسلوز انسانی در بسیاری از کشورها از جمله ایران یک مشکل اساسی بهداشت جامعه می‌باشد. در اغلب موارد تشخیص بروسلوز دشوار است و دلیل این دشواری نه فقط به خاطر شباهت بالینی این بیماری با بسیاری از بیماری‌های عفونی و غیر عفونی می‌باشد، بلکه هم‌چنین روش‌های تشخیصی در اغلب موارد موفق به جداسازی ارگانیسم نمی‌گردند(۱، ۲).

کشت خون معیار طلائی تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز می‌باشد. با وجود این، تعداد کشت خون مثبت در مواردی که بیماران برای مدت طولانی دچار بیماری و یا دچار عوارض موضعی بیماری از قبیل (منتژیت، اندوکاردیت و اسپوندیلیت) می‌باشند و یا عامل ایجاد کننده بیماری بروسلا آبورتوس یا بروسلا کانیس باشد، به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد و بندرت بیش از ۳۰ تا ۵۰ درصد موارد را شامل می‌گردد(۳، ۴).

علاوه بر این به دلیل زمان تقسیم طولانی این باکتری، گونه‌های بروسلا معمولاً به آهستگی در محیط‌های کشت اولیه و کشت متوالی (Subculture) رشد می‌نمایند. مشکل اصلی در خصوص کشت بروسلا وقت گیر بودن آن می باشد که با استفاده از روش‌های مرسوم گاه تا بیش از ۳۰ روز زمان نیاز دارد(۵).

از تست‌های سرولوژیک مختلفی مثل رایت، کومبس رایت و الیزا می‌توان برای تشخیص بروسلوز استفاده کرد. حساسیت تست‌های سرولوژیک بین ۶۵ تا ۹۵ درصد می‌باشد اما ویژگی این تست‌ها به ویژه در مناطق اندمیک، به دلیل شیوع بالای آنتی‌بادی در جمعیت سالم، کم می‌باشد(۵). علاوه بر این، بیشتر تست‌های سرولوژیک دارای واکنش متقاطع با سایر باکتری‌ها می‌باشند.

در طی دهه گذشته، پیشرفت‌های شگرفی در تمامی جنبه‌های تشخیص مولکولی بروسلوز انسانی صورت گرفته است. به نظر می‌رسد که آزمایشات مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction- PCR) سریع‌تر و بسیار حساس‌تر از روش‌های روتین باشند. با وجود این، حساسیت و ویژگی PCR بروسلا در بین آزمایشگاه‌ها متفاوت است و در حال حاضر استانداردی برای آماده سازی نمونه یا انتخاب ژن‌های هدف و یا روش‌های ردیابی محصولات PCR وجود ندارد.

به دلیل این که اعضای جنس بروسلا پاتوژن‌های داخل سلولی اختیاری هستند و به طور طبیعی مقدار باکتری که در بیماران یافت می‌شود، بسیار کم است(۶) به همین دلیل در اکثر مطالعاتی که در زمینه تشخیص بروسلوز با استفاده از روش PCR انجام شده است از نمونه خون استفاده کرده‌اند. استفاده از نمونه خون محیطی این مزیت را دارد که امکان دسترسی به حداکثر باکتری‌های موجود در جریان خون را فراهم می‌آورد. با این وجود، به دلیل حضور مهار کننده‌های بالقوه PCR در خون از قبیل هموگلوبین، DNA انسانی موجود در گلبول‌های سفید و غیره انجام PCR بر روی نمونه‌های خون از نظر تکنیکی بسیار دشوار می‌باشد(۷).

اگرچه مقدار DNA در سرم از خون کمتر است با وجود این زروا و همکاران گزارش کردندکه با استفاده از نمونه‌های سرم به روش حساس‌تری برای تشخیص بروسلوز در مقایسه با استفاده از خون محیطی دست یافته‌اند. آنها اعلام کردند که به دلیل کاهش شدید مهار کننده‌های PCR در سرم، این نمونه برای تشخیص بروسلوز ارجح می‌باشد(۸).

ردیابی اسیدنوکلئیک میکروبی جهت تشخیص عفونت و بیماری به استخراج موفق اسیدنوکلئیک از نمونه‌های بالینی بستگی دارد. استخراج اسیدنوکلئیک الگو از نمونه‌های بالینی دارای اهمیت حیاتی در میکروب شناسی تشخیصی می‌باشد، زیرا مقدار DNA باکتری‌های پاتوژن در نمونه‌های بالینی معمولاً بسیار کم می‌باشد(۹).

جهت دستیابی به DNA بیشتر، در آزمایشگاه‌های تشخیصی از کیت‌های تجاری جهت نمونه‌های بالینی استفاده می‌شود. امروزه در اکثر مطالعات که از نمونه‌های سرم برای تشخیص بروسلوز انسانی استفاده می‌شود کیت‌های تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به اهمیتی که روش‌های استخراج DNA در نتایج PCR

دارند، مطالعه حاضر طراحی گردید تا کارائی سه روش مختلف استخراج DNA بروسلا از سرم مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی- آزمایشگاهی می‌باشد که از سه روش مختلف جهت استخراج DMA بروسلا از سرم استفاده شد.

استخراج DNA بروسلا به روش ساده (Crude Nucleic Acid Extraction)

در این روش یک لوپ باکتری را در محلول TE به صورت سوسپانسیون در آورده و این سوسپانسیون را به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و در مرحله بعد بقایای سلولی توسط عمل سانتریفوژ رسوب داده شد. مایع رویی حاوی DNA به ویال دیگری منتقل گردید. غلظت و میزان خلوص DNA توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در مواردی که به‌DNA کامل و بزرگ احتیاج نمی‌باشد، برای مثال در خصوص PCR موارد تشخیصی این طریقه استخراج DNA روشی مناسب برای بروسلا می‌باشد زیرا عمل جوشاندن (Boiling) باعث مرگ باکتری‌های پاتوژن شده و خطر آلودگی برای پرسنل آزمایشگاه ندارد(۱۰). از DNA حاصل از این مرحله جهت آماده سازی دستگاه PCR و نمونه کنترل مثبت استفاده شد. توالی پرایرها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR

پرایمر	
جفت پرایمر اول (B4/B5)	B_4 (5'-TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA -3') B_5 (5'-CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG -3')
جفت پرایمر دوم (F4/R2)	F_4 (5'-TCG AGC GCC CGC AAG GGG-3') R_2 (5'-AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA-3')

پرایمر B4/B5 به طور اختصاصی موجب تکثیر یک قطعه ۲۲۳ جفت باز(۲۲۳bp) از یک ژن محافظت شده می‌نماید. این ژن یک پروتئین غشائی ۳۱ کیلو دالتونی بروسلا آبورتوس را رمزدهی می‌کند و اختصاصی جنس بروسلا بوده و در تمام سویه‌ها و زیرگروه‌های بروسلا وجود دارد. پرایمر F_4/R_2 به طور اختصاصی موجب تکثیر یک قطعه ۹۰۵ جفت باز(۹۰۵bp) از ژن RNA ریبوزومی می‌شود که به تعداد چند کپی در ژنوم باکتری وجود دارد(۱۱).

مراحل واکنش PCR برای پرایمرهای F_4/R_2 و B_4/B_5 در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول۲. شرایط آماده سازی واکنش های PCR در دستگاه ترموسایکلر برای پرایمر های F_4/R_2

مراحل PCR	زمان(دقیقه)	دما(سانتی گراد)
واسرشت اولیه	۵	۹۵
واسرشت	۰/۷۵	۹۴
اتصال پرایمرها	۱	۶۰
بارآرایی	۰/۷۵	۷۲
بار آرایی نهایی	۱۰	۷۲

استخراج DNA ژنومی از کشت باکتریائی وتهیه رقت‌های مختلف باکتری در سرم با استفاده از روش سریال دایلوشن:

ابتدا از باکتری بروسلای کشت داده شده بر روی محیط بلادآگار، سوسپانسیون میکروبی در سرم فیزیولوژی تهیه گردید که معادل کدورت نیم مک فارلند بود. از این سوسپانسیون ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و در ۹۰۰ میکرو لیتر از سرم افرادی که از نظر تست رایت منفی بودند تلقیح شد. نمونه‌ها به روش سریال دایلوشن در ده لوله رقیق سازی شدند، به صورتی که هر لوله نسبت به لوله ما قبل خود ده برابر رقیق‌تر بود. از این لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به لوله‌هایی با شماره یکسان که حاوی ۰/۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی بود تلقیح گردید و بعد از حرارت دادن و لیز باکتری‌های بروسلا، ۱۰۰ میکرولیتر از آن جهت استخراج DNA با سه روش مختلف به کار برده شد.

استخراج DNA از لوله‌های حاوی رقت‌های مختلف باکتری توسط سه روش متفاوت انجام شد.

الف- استخراج DNA از سرم با استفاده از کیت شرکت سیناژن: از این کیت بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در آن ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه سرم را با ۴۰۰ میکرو لیتر از محلول لیز کننده مخلوط کرده و برای ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس شد. در این مرحله نمونه به طور کامل به صورت محلول یک دست در آمد. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرو لیتر از محلول رسوب دهنده را به مخلوط اضافه کرده و به وسیله حرکت دورانی به مدت ۳ تا ۵ ثانیه مخلوط شد و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس در دور ۱۲۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و به آرامی با وارونه کردن لوله و قرار دادن آن بر روی کاغذ برای ۲ الی ۳ ثانیه آن را خالی کرده و یک میلی لیتر بافر شستشو به رسوب حاصل اضافه و برای ۵-۳ ثانیه با چرخاندن مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰سانتریفیوژ شد، سپس بافر شستشو را به طور کامل خالی کرده و برای ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود. ماده ته نشین در۳۰ میکرولیتر از بافر حل کننده به وسیله تکان دادن آرام و قرار دادن در ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه به طور کامل حل شد. مواد غیر محلول با سانتریفیوژ به مدت ۳۰ ثانیه در دور۱۲۰۰۰ ته نشین شد. ماده شناور رویی حاوی DNA خالص است. غلظت DNA با اسپکتروفتومتری یا بعد از الکتروفورز در ژل آگاروز تازه ۱ درصد به صورت دیداری اندازه‌گیری شد.

ب- تهیه DNA با روش لیزکردن وجوشاندن: ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در دور۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و بخش رویی دور ریخته شد. ماده باقیمانده در آب مقطر قرار داده شده و در دور۱۵۰۰۰ برای ده دقیقه دیگر سانتریفیوژ شد. دوباره مایع رویی دور ریخته شد و ماده باقیمانده در ۴۰ میکرولیتر از آب مقطر قرار داده شده در بن ماری در صد درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شده و روی یخ سرد شد و سپس در دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید(۱۲).

ج- تهیه DNA با استفاده از کیت شرکت پرومگا:

برای هر نمونه یک میکروستون را داخل یک لوله جمع‌آوری کننده (Collection Tube) قرار دادیم. از هر نمونه ۱۰۰ میکرولیتر داخل میکروستون ریخته و به مدت یک دقیقه در دمای اتاق گرما داده شد. میکروستون را داخل میکرو سانتریفیوژ در دور ۱۶۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کرده و میکروستون را به همراه میکروتیوب از ستون چرخان برداشته، مایع داخل لوله جمع‌آوری کننده را دور ریخته و سپس میکروستون، داخل لوله جمع‌آوری کننده قرار گرفت.

ستون را با اضافه کردن ۷۰۰ میکرولیتر از محلول شستشو دهنده غشایی (Membrane Wash Solution) به داخل میکروستون شستشو داده و مجموع میکروستون و لوله جمع‌آوری کننده را یک دقیقه در دور ۱۶۰۰۰سانتریفیوژ کرده، لوله جمع‌آوری کننده را خالی نموده و سپس میکروستون داخل آن برگردانده شد. شستشو را با ۵۰۰ میکرولیتر از Membrane Wash Solution تکرار کرده و مجموع میکروستون و لوله جمع‌آوری کننده، ۵ دقیقه در دور ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مجموع میکروستون و لوله جمع‌آوری کننده را از سانتریفیوژ برداشته و در مرحله بعد لوله جمع‌آوری کننده را خالی کرده و مجموع ستون را برای یک دقیقه با میکروسانتریفیوژ در باز یا در بسته دوباره سانتریفیوژ کرده تا اتانول باقیمانده تبخیر شود. محتوای میکروستون را به یک تیوب میکروسانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتری تمیز منتقل نموده و ۵۰ میکرولیتر از Nuclease-Free Water را به صورت مستقیم بدون تماس با دیواره با نوک پیپت به مرکز ستون وارد شد. سپس یک دقیقه در دمای اتاق گرم کرده و یک دقیقه در دور ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. میکروستون را دور انداخته و تیوب میکروسانتریفیوژ حاویDNA خالص در ۴ یا ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

انجام عمل PCR بر روی نمونه‌ها

برای تهیه هر میلی‌لیتر Mastemix با غلظت ۱/۵

میلی مولار، ۸۲۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه دوبار تقطیر، ۱۲۰ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰X، ۲۴ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی مولار و ۳۶ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار با یکدیگر ترکیب شدند. موارد مورد نیاز جهت انجام هر نمونه PCR در جدول ۳ آمده است.

جدول۳. مواد مورد نیاز جهت هر نمونه PCR

ماده	هر نمونه
۱/۵ میکرومول	۲۰ میکرولیتر
پرایمرF_4/R_2 یا B_4/B_5	۰/۵ میکرولیتر
Taq DNA پلیمراز	۰/۲ میکرولیتر
DNA الگو	۵ میکرولیتر

از هر کدام از روش‌های استخراج DNA به میزان ۵ میکرولیتر به واکنش PCR اضافه شد. حجم واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر بود. در واکنش PCR از DNA استخراج شده از باکتری بروسلا در قسمت اول به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. هم‌چنین جهت تائید واکنش PCR که قطعه ایجاد شده همان قطعه مورد انتظار است از مارکر DNA استفاده شد.

پس از انجام عمل PCR بر روی DNA های استخراج شده از سرم، قطعات DNA تکثیر یافته توسط PCR روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شدند.

یافته ها

ابتدا پرایمر B_4/B_5 جهت انجام آزمایش انتخاب گردید و برای تعیین بهترین شرایط لازم PCR، در دماها و سیکل‌های متفاوتی انجام شد.۳۰ نمونه حاصل از ۳ روش استخراج تحت PCR قرارگرفت. الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد و رنگ آمیزی ژل صورت گرفت.

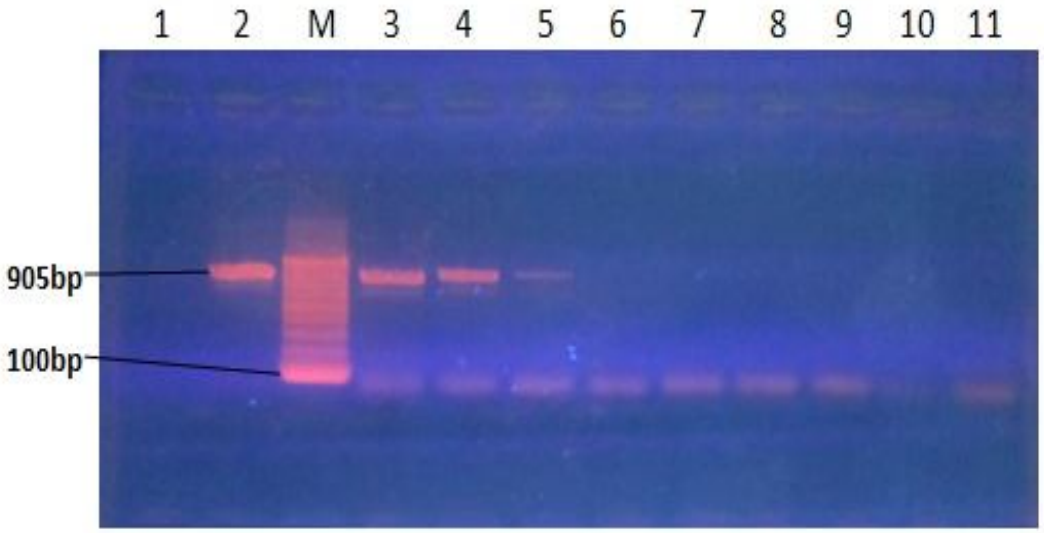
مقادیر مختلف DNA که توسط پرایمر B_4/B_5 ردیابی شده است مشاهده گردید. طبق جدول ۴ رقت‌های اول تا سوم در روش جوشاندن و کیت پرومگا و رقت اول تا چهارم در روش کیت سیناژن PCR مثبت و سایر رقت‌های PCR منفی شدند.

جدول ۴. نتایج آزمایشPCR با غلظت‌های مختلف باکتری در سرم که به وسیله رقیق سازی سریال آماده شده اند

تعداد باکتری در هر میلی لیتر	نتایج PCR با هر کدام از روش‌های استخراجDNA		
	کیت سیناژن	روش جوشاندن	کیت پرومگا
$۱/۵\times۱۰^{۴}$	+	+	+
$۱/۵\times۱۰^{۳}$	+	+	+
$۱/۵\times۱۰^{۲}$	+	+	+
$۱/۵\times۱۰^{۱}$	+	–	-
۱/۵× ۱۰	–	–	-
$۱/۵\times۱۰^{-۱}$	–	–	-

با توجه به حساس‌تر بودن پرایمر F_4/R_2 در مقایسه با B_4/B_5،آزمایش با پرایمر F_4/R_2 تکرار شد. بعد از بررسی و انجام PCR، شرایط تنظیم شده برای پرایمر B_4/B_5 برای F_4/R_2 نیز مورد قبول واقع گردید.

سپس PCR مجدد بر روی رقت‌های مختلف استخراج شده انجام گردید. باندهای حاصل از DNA الگو که توسط پرایمر F_4/R_2 ردیابی شده است به خوبی مشاهده گردید ولی در نتایج نهایی تفاوتی مشاهده نگردید و میزان پاسخ‌دهی مثبت یا منفی شدن در هر دو پرایمر مشابه بود(شکل ۱).



شکل ۱. نتایج حاصل از PCR روی ۱۰ نمونه ی استخراج شده با روش جوشاندن (Boiling) با پرایمر F4/R2، شماره ۱ کنترل منفی، ۲ کنترل مثبت، M: نشانگر وزن مولکولی و ۳ تا ۱۱ نمونه های رقیق شده می باشند.

بحث

به طور معمول از روی علائم بالینی بروسلوز به تنهائی نمی‌توان این بیماری را تشخیص داد، زیرا علائم این بیماری غیر اختصاصی و اغلب آتیپیک می‌باشند. بنابراین جهت تشخیص آن همیشه به تست‌های آزمایشگاهی نیازمند می‌باشیم. اگر چه آزمایشات سرولوژیک و تکنیک‌های جدید کشت خون برای تشخیص بروسلوز گسترش پیدا کرده‌اند، هنوز مشکلات جدی در تشخیص وجود دارد. زمان متوسط مورد نیاز برای کشت بروسلا به طور متوسط ۷ روز گزارش شده است، بنابراین کشت خون روشی وقت‌گیر محسوب می‌شود. علاوه بر آن کار کردن با ارگانیسم خطر جدی انتقال عفونت به پرسنل آزمایشگاه را در پی دارد. بروسلوز یکی از شایع‌ترین عوامل شناخته شده‌ای است که از طریق کار در آزمایشگاه منتقل می‌گردد و دو درصد از کل موارد بروسلوز ناشی از کار کردن با این ارگانیسم در آزمایشگاه می‌باشد.

روش‌های سرولوژیک ویژگی کمی دارند و تیتر آنتی بادی برای مدت زمان طولانی بعد از درمان حتی در موارد بهبودی کامل مثبت باقی می‌ماند. در ایران، بروسلوز انسانی در تمام مناطق کشور اندمیک می‌باشد. به دلیل شیوع بالای بروسلوز و غیر اختصاصی بودن علائم بالینی آن، اهمیت روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی آشکار می‌شود.

ابداع تکنیک‌های تشخیصی جدید که ردیابی سریع و شناسائی بروسلا را امکان پذیر نموده و خطر انتقال آزمایشگاهی این باکتری را به حداقل رساند از اهمیت بالایی برخوردار است. PCR از جمله تکنیک‌هایی است که این امکان را فراهم می‌کند و از این تکنیک به طور موفقیت آمیزی در میکروب شناسی بالینی استفاده می‌شود.

در این مطالعه ما به مقایسه کارایی سه روش مختلف استخراج DNA و انجام PCR برای ردیابی DNA بروسلا در سرم پرداختیم. با توجه به این که چندین کپی از ژن srRNA ۱۶ که توسط پرایمر F_4/R_2 تکثیر می‌شود در ژنوم باکتری بروسلا وجود دارد، انتظار می‌رود که این پرایمر حساسیت بیشتری در مقایسه با پرایمر B_4/B_5 داشته باشد زیرا فقط یک کپی از ژن آن در کروموزوم باکتری بروسلا وجود دارد. با این وجود، در عمل بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه تفاوت معنی‌داری بین دو جفت پرایمر دیده نشد.

به دلیل تعداد کم باکتری‌هایی که در خون یا سرم یافت می‌شود جداسازی گونه‌های بروسلا از نمونه‌های بالینی در بسیاری از اوقات پیچیده و دشوار می‌باشد. تعداد زیادی

از روش‌های تجاری به صورت کیت جهت جدا سازی سریع و ساده DNA بروسلا وجود دارد. امروزه در اکثر مطالعات که از نمونه‌های سرم برای تشخیص بروسلوز انسانی استفاده می‌شود،کیت‌های تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۳، ۱۴). با توجه به اهمیت روش‌های استخراج DNA در نتایج PCR، مطالعات بسیاری جهت استخراج حداکثر DNA بروسلا از خون و شیر صورت گرفته است که در بعضی از این مطالعات از نمونه بالینی و در برخی دیگر به صورت مصنوعی DNA بروسلا به نمونه‌ها اضافه شده است. در بسیاری از مطالعات که جهت مقایسه کارایی کیت‌های تجاری برای جداسازی DNA بروسلا از نمونه‌های سرم انجام شده است، DNA بروسلا به صورت خالص تهیه و به صورت مصنوعی به سرم اضافه شده است(۹، ۱۰).

در این مطالعه ما به جای DNA خالص به سرم، باکتری بروسلا را اضافه کردیم. هدف از این عمل دانستن تعداد باکتری‌های موجود در سرم است که می‌تواند توسط روش PCR ردیابی شود. علاوه بر این در این مطالعه یک کیت خارجی (شرکت پرومگا) را با یک کیت ایرانی (شرکت سیناژن) و روش ساده جوشانیدن با هم مقایسه کردیم تا چنانچه تفاوتی در حساسیت این روش‌ها دیده نشد از تکنیک جوشانیدن استفاده شود.

اولین بار زروا برای تشخیص بروسلوز از سرم بیماران استفاده کرد. زروا و همکاران اعلام کردند، با توجه به این که مهار کننده‌های PCR از قبیل هموگلوبین، ماده ضد انعقاد و توده DNA میزبان در سرم وجود ندارد، سرم نمونه بهتری در مقایسه با خون کامل جهت تشخیص بروسلوز می‌باشد(۸).

در مطالعه‌ای که توسط اورتنو و همکاران(۱۲) انجام شد به مقایسه هفت کیت تجاری جهت ردیابیDNA بروسلا در سرم پرداخته شد. آنها DNA بروسلا ملی تنسیس را به طور مصنوعی به سرم افزوده بودند و بعد از استخراج DNA با این کیت‌ها جهت ردیابی DNA به انجام real-time-PCR پرداختند که روشی حساس‌تر از PCR می‌باشد. آنها توانستند با این روش توسط یکی از کیت‌ها غلظت۱۰۰ فمتوگرم (۱۰۰fg)DNA را ردیابی نمایند. در سایر روش‌ها غلظت ردیابی شده کمتر بود. یکی از اشکالات مطالعه ما شاید این باشد که جهت یکسان نمودن حجم نمونه سرم از ۱۰۰ میکرولیتر سرم جهت استخراج استفاده کردیم، در حالی که اگر از مقادیر بیشتر سرم استفاده شده بود شاید نتایج بهتری حاصل می‌شد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر با مقایسه نتایج به دست آمده، در عمل نشان داده شد که پروتکل کیت سیناژن در رقت‌های کمتری از DNA بروسلا قادر به ردیابی این باکتری می‌باشد و این در حالی است که دو روش دیگر به رقت‌های بالاتری جهت ردیابی DNA نیازمند می‌باشند. در نتیجه می‌توان این طور بیان کرد که در شرایط یکسان و بدون در نظر گرفتن سایر عوامل، هم‌چون میزان زمان‌بری و هزینه‌های مصرفی، پروتکل کیت سیناژن روش بهتری جهت استخراج DNA و تشخیص بیماری می‌باشد.

از نگاهی دیگر، زمان لازم و هزینه‌های مصرفی انجام هر کدام از پروتکل‌ها با دیگری قابل مقایسه است. زمان لازم برای پروتکل کیت سیناژن حدود ۷۰ دقیقه می‌باشد در حالی که پروتکل "پرومگا" زمانبری حدود ۱۵ دقیقه داشته و این مدت برای پروتکل ساده جوشانیدن سرم ۳۵ الی ۴۰ دقیقه می‌باشد. پروتکل جوشانیدن سرم در عمل صرف هزینه‌های چندانی به دنبال ندارد و مدت زمان انجام آن نیز در مقایسه با دو روش دیگر قابل قبول می‌باشد. با استدلال به این موارد به نظر می‌رسد که در مجموع پروتکل کیت سیناژن دقت بیشتری را در ردیابی غلظت‌های پایین در سرم داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دکتری پزشکی عمومی سرکار خانم دکتر زهرا ولی نژاد که با شماره ۰۳۵۳ در دفتر پایان نامه‌های دانشکده پزشکی اردبیل ثبت شده است، می‌باشد. بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم

پزشکی اردبیل به دلیل حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

منابع

1. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerging infectious diseases. 1997;3(2):213-221.
2. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Veterinary microbiology. 2002; 90(1-4):81-110.
3. Kiel FW, Khan MY. Analysis of 506 consecutive positive serologic tests for brucellosis in Saudi Arabia. Journal of clinical microbiology. 1987;25(8):1384-7.
4. Maleknejad P, Peeri-DoGaheh H, AmirZargar A, Jafari S, Fatollahzadeh B. Diagnosis of brucellosis by use of BACTEC blood culture and confirmation by PCR. J Vet Res. 2007;62(4):83-6.
5. Yagupsky P. Detection of Brucellae in blood cultures. Journal of clinical microbiology. 1999; 37(11): 3437-42.
6. Gamazo C, Vitas A, Lopez-Goni I, Diaz R, Moriyon I. Factors affecting detection of Brucella melitensis by BACTEC NR730, a nonradiometric system for hemocultures. Journal of clinical microbiology. 1993; 31(12): 3200-3.
7. Queipo-Ortuno M, Garcia-Ordonez M, Colmenero J, Morata P. Hydrogen peroxide improves the efficiency of a peripheral blood PCR assay for diagnosis of human brucellosis. Biotechniques. 1999;2 7(2):248-52.
8. 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.
9. Read S. Recovery efficiencies of nucleic acid extraction kits as measured by quantitative LightCyclerTM PCR. Molecular Pathology. 2001; 54(2):86-90.
10. Queipo-Ortuno M, Tena F, Colmenero J, Morata P. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of Brucella DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. European journal of clinical microbiology & infectious diseases. 2008; 27(2):109-14.
11. 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.
12. Queipo-Ortuno MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. Clinical and Vaccine Immunology. 2008; 15(2):293-6.
13. Elfaki MG, Uz-Zaman T, Al-Hokail AA, Nakeeb SM. Detection of Brucella DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2005;53(1):1-7.
14. 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): 69-74.