دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی پزشکی

عنوان:

کارایی بروسلا کپت در تشخیص بروسلوز انسان

نگارش:

سحر صبور

اساتید راهنما:

دکتر هادی پیری دوگاهه

دکتر محسن ارزنلو

اساتید مشاور:

دکترفرهاد جدی

دکتر عباس نقی زاده باقی

شهریور ۹۹

شماره پایان نامه: ۰۸۲

بسم الله الرحمن الرحیم
Nagsh.ir

دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی پزشکی

عنوان:

کارایی بروسلا کپت در تشخیص بروسلوز انسان

نگارش:

سحر صبور

اساتید راهنما:

دکتر هادی پیری دوگاهه

دکتر محسن ارزنلو

اساتید مشاور:

دکترفرهاد جدی

دکتر عباس نقی زاده باقی

شهریور ۹۹

شماره پایان نامه: ۰۸۲

بسمه تعالی

گواهی اصالت پایان نامه

اینجانب حسن صفوی ..... دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد رشته حسابرسی

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تایید می‌نمایم که :

- این پایان نامه بر اساس نتایج بررسیها/ تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب تحت راهنمای خانم/آقای دکتر هادی بهری ..... بوده و بوسیله خودم انشا گردیده است و در صورت استفاده از نتایج پژوهش ها و یا آثار دیگران بلافاصله به مرجع مورد استفاده استناد شده است و در قسمت منابع و مآخذ مشخصات مرجع به طور کامل ذکر گردیده است.
- مسئولیت صحت مطالب مندرج در این پایان‌نامه به طور کامل با اینجانب است.
- این پایان نامه قبلا برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح ، پایین تر یا بالاتر) درسایر دانشگاه ها وموسسات آموزش عالی ارائه نشده است.
- کلیه حقوق مادی و معنوی این پایان‌نامه و هر گونه محصول مستخرج از آن اعم از مقالات، چاپ کتاب و ثبت اختراع به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تعلق دارد و هرگونه استفاده از اطلاعات و یا نتایج، واگذاری اطلاعات به افراد دیگر، چاپ، تکثیر، نسخه‌برداری، ترجمه و اقتباس از این پایان‌نامه بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه علوم پزشکی ... ممنوع است.
- کلیه مقالات مستخرج از این پایان‌نامه تحت نام دانشگاه علوم پزشکی اردبیل (Ardabil University of Medical sciences) به عنوان وابستگی نویسنده اول یا مسئول و با اطلاع و اجازه تمامی اساتید راهنما و مشاور به چاپ رسیده یا خواهد رسید.
- چنانچه در هر مقطع زمانی، خلاف مواردفوق ثابت شود، عواقب ناشی ازآن را می پذیرم و دانشگاه مجاز است با اینجانب مطابق با ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت برخورد قانونی، هیچ گونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی دانشجو حسن صفوی

امضا و تاریخ

۹۹/۵/۱۲

- بدینوسیله اصالت و صحت نتایج این پایان نامه مورد تأیید اینجانب، لطفا حاجی بهری حسن کارشناسی استاد/اساتید راهنما می باشد.

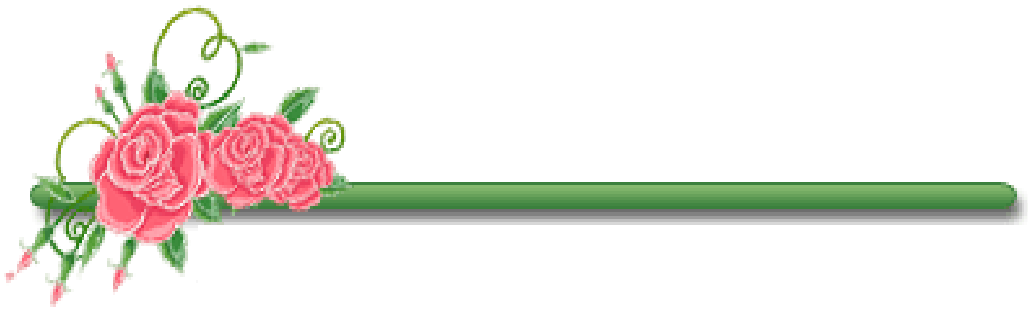
نام و نام خانوادگی استاد/ اساتید راهنما

امضا و تاریخ

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگان به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است.

به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

این مجموعه را به پدر و مادر عزیزم تقدیم می کنم.



برخود لازم می‌دانم از تمامی کسانی که در مراحل مختلف این تحقیق با راهنمایی های مشفقانه و نظرات عالمانه خود روشنگر راهم بوده اند صمیمانه تشکر کنم؛ و من امروز در مقابل هزاران سطر نانوشته و هزاران حرف ناگفته، داستان دوستان در یاد و نبض قلم یاد در دست اینک به پاس هر قدمی که برای ساختن اندیشه های من برداشت شده، در ازای هر اشاره ای که مرا در رسیدن به پاسخ پرسش بودن یاری نموده است، تنها می توانم یاد کنم از نامشان تا خود بدانم که آموخته هایم در گرو حضور ایشان در زندگی ام بوده است.

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق» بسی شایسته است از استاد راهنمای فرهیخته و فرزانه، جناب آقای دکتر هادی پیری دوگاهه که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی های کار ساز و سازنده بارور ساختند; تقدیر و تشکر نمایم.

از استاد با کمالات و شایسته؛ جناب آقای دکتر محسن ارزنلو که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از استاد مشاور عزیز و گرامی، جناب آقای دکتر فرهاد جدی بسیار سپاسگذارم؛ چرا که بدون مشاوره و راهنماییهای ایشان تامین این پایان نامه بسیار مشکل مینمود. سپاس از استادگرانقدرم، دکتر عباس نقی زاده باقی که از همکاری و راهنمایی‌های علمی شان بهره جسته‌ام.

از اساتید فرزانه و دلسوز جناب آقای دکتر بهنام محمدی و جناب آقای دکتر جعفر محمدشاهی و سرکار خانم دکتر رقیه تیمور پور که زحمت داوری این رساله رامتقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم؛ باشد که این خردترین بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

و با تشکر از:

اساتید محترم گروه میکروب شناسی

پرسنل محترم و زحمتکش گروه میکروب شناسی

پرسنل محترم و زحمتکش آزمایشگاه سلولی و مولکولی

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده ۱

فصل اول:مقدمه

۱-۱. اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق ٤

۱-۲. اهداف ۹

۱-۲-۱. هدف کلی‌طرح ۹

۱-۲-۲. اهداف اختصاصی‌طرح ۹

۱-۲-۳. اهداف کاربردی‌طرح ۱۰

۱-۲-۴. فرضیات ۱۰

۱-۳. تعریف واژه‌ها ۱۰

۱-۳-۱. بروسلوز انسانی ۱۰

۱-۳-۲. بروسلا کپت ۱۰

۱-۳-۳. روش Real Time PCR ۱۰

فصل دوم:بررسی متون

۲-۱. مبانی نظری ۱۱

۲-۲. اتیولوژی ۱٤

۲-۲-۱. موقعیت تاکسونومیک ۱٤

۲-۲-۲. مشخصات ارگانیسم ۱٤

۲-۲-۳. نوع و شرایط محیط کشت ۱٦

۲-۲-۴. خصوصیات آنتی‌ژنیک بروسلا ۱۷

۲-۳. گونه‌های بروسلا و مخازن آن‌ها ۱۸

۲-۳-۱. بروسلا ملی تنسیس (*Brucella melitensis* دارای ۳ سروتایپ) ۱۸

۲-۳-۲. بروسلا آبورتوس (*Brucella abortus* دارای ۷ بیوتایپ) ۱۹

۲-۳-۳. بروسلا سوئیس (*Brucella suis* دارای ۵ بیوتایپ) ۱۹

۲-۴. ژنتیک مولکولی ۲۰

۲-۵. اپیدمیولوژی ۲۳
۲-۶. روند زمانی شیوع بروسلوز ۲٤
۲-۷. مقاومت بروسلاها در شرایط مختلف ۲٥
۲-۸. راه‌های انتقال بیماری ۲٥
۲-۹. بیماری‌زایی ۲۷
۱ -۹ -۲. ساختمان آنتی‌ژن و فاکتورهای ویرولانس ۳۰
۲ -۹ -۲. نشانه‌های بالینی ۳۰
۲-۱۰. روش تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز ۳۲
۱ -۲-۱۰. رنگ‌آمیزی ۳۲
۲ -۱۰ -۲. کشت ۳۳
۲-۱۰-۲-۱. نقش کشت خون در تشخیص بروسلوز ۳۳
۲-۱۰-۲-۲. نمونه‌برداری برای کشت بروسلا ۳۳
۲-۱۰-۲-۳. روش کشت ۳٤
۴ -۲- ۱۰- ۲. روش‌های کشت مایع ۳٥
۵ -۱۰-۲ -۲. روش کشت خون دی فازیک ۳٦
۶ -۱۰-۲ -۲. ردیابی رادیو متریک بروسلا ۳٦
۲-۱۰-۲-۶-۱. طرز کار دستگاه BACTEC Fluorescent ۳۷
۲-۱۰-۳. سرولوژی ٤۰
۲-۱۰-۳-۱. آزمایش رزبنگال ٤۲
۲-۱۰-۳-۱-۱. روش انجام آزمایش رزبنگال ٤۲
۲-۱۰-۳-۲. آگلوتیناسیون استاندارد لوله‌ای ٤۳
۲-۱۰-۳-۳. روش آزمایش رایت ٤٤
۲-۱۰-۳-۴. آزمایش ۲- مرکاپتواتانول (2 – Mercaptoethanol) ٤٥
۲-۱۰-۳-۵. آزمایش کومبس رایت ٤۷
۲-۱۰-۳-۶. آزمایش الیزا ٤۹
۴ -۱۰ -۲. روش‌های مولکولی ٤۹

۲-۱۰-۴-۱. تشخیص بروسلوز به روش PCR ٤٩
۲-۱۰-۴-۲. روش Real-time PCR ٥١
۲-۱۱. پاتوژنز ٥١
۲-۱۲. علائم بالینی و نحوه وقوع بروسلوز ٥٣
۱ – ۱۲- ۲. بروسلوز خفیف ٥٣
۲ – ۱۲ – ۲. بروسلوز باکتریمیک ٥٣
۳ – ۱۲ -۲. بروسلوز سرولوژیک ٥٤
۴ – ۱۲ – ۲. بروسلوز موضعی ٥٤
۵ – ۱۲ – ۲. بروسلوز مزمن ٥٤
۲-۱۳. عوارض ناشی از عفونت بروسلایی ٥٥
۱ – ۱۳ – ۲. عفونت دستگاه گوارشی ٥٥
۲ – ۱۳ – ۲. عفونت کبد وصفرا ٥٥
۳ – ۱۳ – ۲. عفونت استخوان ٥٦
۴ – ۱۳ – ۲. عفونت دستگاه عصبی ٥٦
۵ – ۱۳ – ۲. عفونت‌های قلبی – عروقی ٥٧
۶ – ۱۳ – ۲. عفونت دستگاه تنفسی ٥٧
۷ -۱۳ – ۲. عفونت دستگاه ادراری – تناسلی ٥٨
۸ – ۱۳ – ۲. سقط‌جنین ٥٨
۹ – ۱۳ – ۲. عوارض هماتولوژیک ٥٨
۱۰ – ۱۳ – ۲. ضایعات پوستی ٥٩
۱۱ – ۱۳ –۲. ضایعات چشمی ٥٩
۱۴ – ۲. ایمنی میزبان ٥٩
۲-۱۵. درمان ٦٠
۲-۱۶. واکسن ٦٣
۲-۱۷. پیشگیری و کنترل ٦٣
۲-۱۸. مروری بر مطالعات گذشته ٦٥

۲-۱۸-۱. مطالعات داخلی ۶۵
۲-۱۸-۲. مطالعات خارجی ۶۹

فصل سوم:مواد و روش کار

۳-۱. نوع مطالعه ۷۱
۳-۲. مکان و زمان انجام مطالعه ۷۲
۳-۳. ملاحظات اخلاقی ۷۲
۳-۴. گروه‌های موردمطالعه ۷۲
۳-۵. نحوه اخذ نمونه خون و آماده کردن نمونه‌ها ۷۲
۳-۶. محاسبات آماری ۷۳
۳-۷. فهرست تجهیزات آزمایشگاهی مورداستفاده ۷۳
۳-۸. فهرست وسایل و ظروف آزمایشگاهی مورداستفاده ۷۴
۳-۹. فهرست مواد و ترکیبات شیمیایی مورداستفاده در تحقیق ۷۵
۳-۱۰. محلول‌های کاری مورداستفاده ۷۶
۳-۱۰-۱. محلول کاری پرایمرها ۷۶
۳-۱۰-۲. محلول ۱٪ SDS ۷۶
۳-۱۱. روش کار ۷۶
۳-۱۱-۱. گرفتن نمونه خون ۷۶
۳-۱۱-۲. جدا کردن سرم نمونه‌های خون ۷۷
۳-۱۱-۳. آزمایش رزبنگال ۷۷
۳-۱۱-۴. آزمایش رایت لوله‌ای ۷۷
۳-۱۱-۵. آزمایش 2-ME ۷۸
۳-۱۱-۶. بررسی بروسلوز با استفاده از کیت بروسلا کپت شرکت Vircell ۸۰
۳-۱۱-۶-۱. مراحل انجام تست ۸۱
۳-۱۲. استخراج DNA ازسرم انسانی ۸۵
۳-۱۲-۱. استخراج با فنل کلروفرم ایزو آمیل الکل ۸۵
۳-۱۲-۲. ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده ۸۷

۳-۱۳. انجام Realtime PCR بر روی نمونه‌های استخراج‌شده ۸۸
۳-۱۳-۱. پرایمر و پروب مورداستفاده ۸۸
۳-۱۳-۲. تکثیر ژن موردمطالعه ۸۹
فصل چهارم:نتایج
۴-۱. مشخصات بیماران واردشده به مطالعه ۹۱
۴-۲. نتایج تست های سرولوژی ۹۳
۴-۲-۱. تست 2-ME ۹۳
۴-۲-۲. تست رایت ۹۳
۴-۲-۳. تست بروسلا کپت ۹۳
۴-۳. تست TaqMan real-time PCR ۹۹
۴-۴. مقایسه تست‌های سرولوژی و مولکولی در تشخیص بیماری بروسلوز ۱۰۵
فصل پنجم:بحث و نتیجه‌گیری
۵-۱. بحث ۱۱۰
۵-۲. محدودیت‌های مطالعه ۱۲۰
۵-۳. نتیجه‌گیری ۱۲۱
۵-۴. پیشنهادات ۱۲۲
منابع ۱۲۳
ضمایم ۱۳۷

فهرست اشکال و جداول

عنوان صفحه

شکل ۱-۲. اشکال میکروکوکوس بروسلا ۱۵
شکل ۲-۲. اشکال کلنی بروسلا در محیط کشت ۱۶
جدول ۱-۲. شرایط محیط کشت انواع گونه‌های بروسلا ۱۷

جدول ۲-۲. گونه‌ها و مخازن بروسلا ۲۰
شکل ۳-۲. مشخصات ژنوم باکتری بروسلا (٤٥). ۲۰
شکل ٤-۲. نقشه گستردگی جهانی بیماری بروسلوز (٥١). ۲۳
جدول ۳-۲. مشخصات بالینی بروسلوز (٥٠). ۳۱
شکل ٥-۲. تصویر دستگاه BACTEC ۳۹
شکل ٦-۲. تصویر دستگاه BACTEC ۳۹
شکل ۷-۲. ارتباط انسان با عوامل ایجادکننده بروسلوز در طبیعت. ٦٤
شکل ۱-۳. خلاصه روش انجام آزمایش بررسی بروسلوز با استفاده از کیت بروسلا کپت ٨٤
شکل ۲-۳. تصویر نتایج مثبت و منفی در چاهک‌های کیت بروسلا کپت ٨٥
جدول ۱-۳. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در تحقیق ٨٩
جدول ۲-۳. مواد استفاده‌شده در واکنش Real-time PCR برای تکثیر ژن موردمطالعه ۹۰
جدول ۳-۳. برنامه تکثیر ژن موردمطالعه در واکنش TaqMan Real-time PCR ۹۰
جدول ۱-٤. اطلاعات دموگرافیکی و ریسک فاکتورهای مرتبط با بیماری بروسلوز در بین افراد مثبت از نظر تست های سرولوژی رایت و 2ME ۹۲
شکل ۱-٤. نتیجه ی تست بروسلا کپت بر روی نمونه های سرم جمع آوری شده از افراد مبتلا به بیماری بروسلوز ازنظر تست های سرولوژی رایت و 2ME. ۹٥
شکل ۲-٤. نتیجه ی تست بروسلا کپت بر روی نمونه های سرم جمع آوری شده از گروه کنترل (افراد سالم). ۹٦
جدول شماره ۲-٤. نتایج بدست آمده از تست های سرولوژی انجام یافته بر روی نمونه های سرم جمع آوری شده از افراد مبتلا به بیماری بروسلوز. ۹٦
جدول شماره ۳-٤. نتایج بدست آمده از تست سرولوژی بروسلا کپت و تست مولکولی TaqMan Real time PCR انجام یافته بر روی نمونه های سرم جمع آوری شده از افراد سالم. ۹۸
شکل ۳-٤. منحنی پیشرفت واکنش در حالت نمایی بدست آمده از تست TaqMan real-time PCR انجام یافته بر روی نمونه های گرفته شده از بیماران ۱۰۰
شکل ٤-٤. الکتروفورز محصول PCR انجام یافته بر روی ژن BCSP31. ..... ۱۰۱

شکل ٥-٤. الکتروفورز محصول TaqMan Rea time PCR بر روی ژل آگارز ١/٥ درصد.....١٠٢

جدول ٤-٤. شاخص های یک منحنی استاندارد مناسب.....١٠٣

شکل ٦-٤ و ٧-٤. منحنی استاندارد رسم شده برای ژن BCSP3 .....١٠٤

جدول٥-٤. نتایج تست TaqMan Real time PCRبر روی نمونه‌های مثبت گرفته شده از افراد مبتلا به بیماری بروسلوز ازنظر تست های سرولوژی رایت و 2ME. ١٠٥

جدول شماره ٦-٤. مقایسه موارد مثبت بروسلوز در تست های سرولوژی و مولکولی به همراه تیتر آنتی بادی بدست آمده.....١٠٧

جدول شماره ٧-٤. پراکندگی موارد مثبت بدست آمده با استفاده از تست مولکولی TaqMan Real time PCR در بین موارد مثبت و منفی بدست آمده از تست های سرولوژی..... ١٠٩

جدول ٨-٤. میزان حساسیت و اختصاصیت روش مولکولی TaqMan Real time PCR در مقایسه بار روش سرولوژی بروسلا کپت..... ١١٠

جدول ١-٥. بررسی و مقایسه نتایج تست‌های سرولوژی در تشخیص بیماری بروسلوز گزارش شده در مطالعات مختلف ١١٧

جدول ٢-٥. بررسی نتایج و مقایسه حساسیت و اختصاصیت تست‌های مولکولی استفاده شده در مطالعات مختلف در تشخیص بیماری بروسلوز..... ١٢٠

فهرست اختصارات

WHO	World Health Organization
PCR	Polymerase chain reaction
TSB	Tryptic soy broth

PMN	Polymorphonuclear leukocytes
CNS	Central nervous system
BHI	Brain Heart Infusion
LPS	Lipopolysaccharides
SAT	Serum (tube) agglutination test
RBT	Rose Bengal test
2-ME	2-mercaptoethanol
PBS	Phosphate-buffered saline
DTT	DL-Dithiothreitol
NK cells	Natural killer cells
TNF-α	Tumor necrosis factor
CSF	Cerebrospinal fluid
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
SDS	Sodium dodecyl sulfate
NCBI	National Center for Biotechnology Informati

چکیده

کارایی بروسلا کپت در تشخیص بروسلوز انسان

زمینه: بیماری بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان بوده و از نگرانی‌های سلامت عمومی در جهان محسوب می‌شود که بیماری تب دار شدیدی را در انسان ایجاد می‌کند.

هدف: هدف از انجام این مطالعه بررسی کارایی روش‌های سرولوژی و TaqMan Real time PCR در تشخیص جنس بروسلا در نمونه‌های بالینی می‌باشد که از بیماران مشکوک در استان اردبیل، ایران، جمع آوری شده است.

مواد و روش کار: دراین مطالعه مقطعی، در مجموع ۱۱۳ بیمار مشکوک به بیماری بروسلوز که به سه بیمارستان در استان اردبیل مراجعه کرده بودند انتخاب شدند. در مرحله اول، شناسایی بیماری بروسلوز با استفاده از تست‌های سرولوژی شامل تست آگلوتیناسیون رزبنگال، تست رایت، تست 2-ME، و تست بروسلاکپت انجام پذیرفت. در مرحله ی بعد، روشTaqMan Real time PCR به همراه پرایمر و پروب که ژن *bcsp31* را هدف قرار داده‌بودند برای شناسایی جنس بروسلا مورد استفاده قرار گرفت. اختصاصیت، حساسیت، و ارزش پیش بینی مثبت و منفی روش TaqMan Real time PCR مورد محاسبه قرار گرفت.

یافته‌ها: در بین ۱۱۳ بیمار مشکوک با علائم بالینی مختلف، تست آگلوتیناسیون رزبنگال، تست رایت، و تست 2-ME در ٦۰ مورد مثبت بودند. با این وجود، تیتر آنتی بادی تست بروسلا کپت در یک بیمار ۱:۱٦۰ بود. ۷ بیمار به طور اولیه دارای بیشترین میزان تیتر آنتی‌بادی در سرم بودند. در بین موارد مثبت، هیچ ارتباطی بین جنسیت، سن، و زندگی (سکونت) در نواحی شهری یا روستایی با مبتلا شدن به بیماری مشاهده نگردید. مقایسه نتایج روش‌های بروسلا کپت و TaqMan Real time PCR نشان داد که ۱۹ مورد از ٥٤ مورد (۳٥/۲٪) و ۲ مورد از ٦ مورد (۳۳/٤٪) مثبت در تست بروسلاکپت که به ترتیب دارای تیتر

آنتی‌بادی بالای ۱:۳۲۰ و کمتر یا مساوی ۱:۳۲۰ داشتند، مثبت بوده‌اند. حساسیت و اختصاصیت روش TaqMan Real time PCR به ترتیب ٪۱۰۰ و ٪۴۹/۱ تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: حساسیت روش TaqMan Real time PCR در تشخیص بیماری بروسلوز پایین بود، در حالی که تست بروسلا کپت به عنوان یک تست بسیار با ارزش، حساس و اختصاصی برای شناسایی بیماری بروسلوز در افراد مشکوک مشخص گردید، بنابراین تست بروسلا کپت می‌تواند نتایج قابل قبول و مطمئن‌تری را در آزمایشگاه‌های پزشکی فراهم کند.

کلمات کلیدی: جنس بروسلا، بیماری بروسلوز، TaqMan Real time PCR، سرولوژی، اردبیل، ایران.