





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه

جهت دریافت درجه دکترای حرفه ای (پزشکی)

موضوع:

**تعیین حساسیت و اختصاصیت روش PCR در تشخیص**

**بروسلوز انسانی**

استاد راهنما:

**دکتر هادی پیری دوگانه**

استاد مشاور:

**دکتر محسن ارزنلو**

نگارش:

**ندا حبیبی قرانی**

پائیز ۸۹

شماره پایان نامه:

۰۳۵۲

خداوندا

سپاست می گویم که مرا یاری نمودی تا این مسیر دشوار را بپیمایم، زین پس بیش از پیش به لطف و یاری ات نیازمندم، تا التیام بخش گوشه ای از آلام عزیزانی باشم که به بهای رنج هایشان طبابت را آموختم...

تقدیم به ساحت مقدس حضرت امام حسین علیه السلام

و امام عصر، حضرت امام مهدی عجل... تعالی فرجه الشریف

تقدیم به دو الهه ی پاکی که کتاب هستی را برایم گشودند

مادر مهربان و پدر عزیزم

که با فداکاریهایشان، چگونه زیستن را به من آموختند

تقدیم به یگانه برادر فرزانه ام

رامین

که همدم و همراز روزهای تلخ و شیرین زندگی ام بوده است

تقدیم به دوستان عزیزم

سرکار خانم دکتر زهرا محمدزاده

همدل و همراه روزهای سخت و سهل دوران تحصیلم

سرکار خانم دکتر زهرا ولی نژاد

که شیرینی و آرامش روزهای سخت پایان تحصیلم را مدیون همراهی و حضور بی دریغ اویم

و سرکار خانم ها: دکتر هانیه نیک پو، دکتر لیلا احگری، دکتر نسیم مسعودی، دکتر آنیا مدرس

و سرکار خانمها: ویدا آقازاده و آسیه فتحی

که گل واژه های سپاس و تقدیر با تمام زیبایی تقدیمشان باد

سپاس و تقدیم بی پایان از زحمات استاد بزرگوار و اسجمندم

**جناب آقای دکتر هادی پیری دوگانه**

که همواره با راهنماییهای دلسوزانه و وجود پرمهرشان یاریگرم بودند

و تشکر و تقدیر ویژه از استاد بزرگوار و وارسته ام

**جناب آقای دکتر سید سعید حسینی اصل**

که با همراهی و لطف بی دریغ خود، راهگشا و حامی من در تحمل سختی های این مسیر بودند

و با تشکر و تقدیر از استاد ارجمندم

**جناب آقای دکتر محسن ارزنلو**

و

تقدیم به تمام عزیزانی که طبابت را بر بالین آنان آموختم

و تمام آنانی که چشم امید به آموخته هایم دارند...

عنوان: تعیین حساسیت و اختصاصیت روش PCR در تشخیص بروسلوز انسانی

## چکیده

**سابقه و هدف:** بروسلوز یکی از شایعترین بیماریهای مشترک بین انسان و دام در ایران می باشد. بروسلوز انسانی در تمام قسمت های کشور اندمیک می باشد. 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 می باشد بلکه همچنین روش های تشخیصی در اغلب موارد موفق به جداسازی ارگانیزم نمی گردند. هدف این مطالعه تعیین حساسیت و ویژگی روش PCR در تشخیص بروسلوز انسانی بود.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه از ۳۰ نمونه ی سرم افراد دارای علائم بالینی و تست رایت مثبت و ۳۰ نمونه ی سرم افراد سالم و تست رایت منفی استفاده شد. این نمونه ها با روش PCR آزمایش شدند.

**یافته ها:** از بیماران ، ۱۵ مورد از نمونه های رایت مثبت با روش PCR مثبت شناخته شدند و از افراد سالم، ۴ مورد با روش PCR مثبت شدند. حساسیت روش PCR ، ۶۷/۶۶٪ و ویژگی آن ۲۳/۸۸٪ تعیین شد.

**نتیجه گیری:** ما به حساسیت و اختصاصیت بالایی با روش PCR برای تشخیص بروسلوز دست نیافتیم. بدین منظور، ما استفاده از ترکیبی از روش ها را برای تشخیص بروسلوز انسانی پیشنهاد می کنیم.

واژه های کلیدی: حساسیت ، اختصاصیت ، PCR ، بروسلوز

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: طرح تحقیق
۱-۱-۱-مقدمه	۲
۱-۲-بیان مسأله	۲
۱-۳-تعریف واژه	۵
۱-۴-هدف اصلی طرح	۶
۱-۴-۱-اهداف طرح	۶
۱-۴-۲-اهداف کاربردی	۶
۱-۴-۳-فرضیات یا سؤالات تحقیق	۶
	فصل دوم: بررسی متون
۲-۱-مبانی نظری	۸
۲-۱-۱-تاریخچه History	۸
۲-۱-۲-جنس بروسلا	۱۰
۲-۱-۳-ایدهمیولوژی	۱۱
۲-۱-۴-پاتوژنز	۱۴
۲-۱-۵-علائم بالینی	۱۵
۲-۱-۵-۱-عفونت دستگاه گوارشی	۱۵
۲-۱-۵-۲-عفونت استخوان	۱۵
۲-۱-۵-۳-عفونت کبد و صفرا	۱۶
۲-۱-۵-۴-عفونت دستگاه عصبی	۱۷

۱۷	۲-۱-۵-۵ عفونت های قلبی - عروقی
۱۸	۲-۱-۵-۶ عفونت دستگاه تنفسی
۱۸	۲-۱-۵-۷ عفونت دستگاه ادراری - تناسلی
۱۸	۲-۱-۵-۸ حاملگی
۱۹	۲-۱-۵-۹ عوارض هماتولوژیک
۱۹	۲-۱-۵-۱۰ ضایعات پوستی
۲۰	۲-۱-۵-۱۱ ضایعات چشمی
۲۰	۲-۱-۶-۶ روش های تشخیص
۲۰	۲-۱-۶-۱ نقش کشت خون در تشخیص بروسلاز انسانی <b>Detection of Brucellae</b>
۲۱	۲-۱-۶-۲ روش های کشت مایع <b>Broth culture methods</b>
۲۲	۲-۱-۶-۳ تشخیص سرولوژی
۲۴	۲-۱-۶-۴ آزمایش روز بنگال
۲۵	۲-۱-۶-۵ آگلوتیناسیون استاندارد لوله ای
۲۵	۲-۱-۶-۶ آزمایش ۲- مرکاپتواتانول
۲۶	۲-۱-۶-۷ آزمایش کومبس رایت
۲۶	۲-۱-۶-۸ آزمایش الیزا
۲۷	۲-۱-۶-۹ تشخیص بروسلاز به روش <b>PCR</b>
۲۷	۲-۱-۷-۲ درمان
۲۹	۲-۲-۲ مطالعات
	<b>فصل سوم: شیوه اجرای پژوهش</b>
۳۵	۳-۱-۳-۱ نوع طرح

۳۵	۳-۲- جمعیت مورد مطالعه
۳۵	۳-۳- جنبه‌های متدولوژی
۳۵	۳-۳-۱- آماده سازی نمونه
۳۶	۳-۳-۲- انتخاب توالی هدف
۳۷	۳-۳-۳- ردیابی محصولات PCR
۳۷	۳-۳-۴- مراحل انجام کار
۴۳	۳-۳-۵- الکتروفورز محصولات PCR

#### فصل چهارم: نتایج

۴۶	۴-۱- نتایج
----	------------

#### فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵۴	۵-۱- بحث و نتیجه گیری
۵۶	۵-۲- محدودیت ها
۵۷	۵-۳- پیشنهادات
۵۸	منابع
۶۸	چکیده انگلیسی



## فهرست جداول

صفحه	عنوان
۴۱-----	جدول ۱-۳- شرایط Set up واکنش های PCR در دستگاه ترمو سایکلر برای پرایمر F <sub>4</sub> /R <sub>2</sub>
۴۲-----	جدول ۲-۳- مواد MM1.5-----
۴۳-----	جدول ۳-۳- مواد هر نمونه ی PCR-----
۴۶-----	جدول ۱-۴- نتیجه ی آزمایش PCR نمونه ها-----
۵۰-----	جدول ۲-۴- حساسیت و ویژگی PCR-----
۵۱-----	جدول ۳-۴- حساسیت روش PCR در برابر کشت-----
۵۲-----	جدول ۴-۴- مقایسه ی تیتراژ آنتی بادی با روش PCR-----

## فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۴ - نتیجه ی حاصل از PCR نمونه های راییت مثبت	۴۷-----
شکل ۲-۴ - نتیجه ی حاصل از PCR نمونه های راییت منفی	۴۸-----
شکل ۳-۴ - نتیجه ی حاصل از PCR نمونه های راییت منفی	۴۹-----

**bp:** base pair

**CSF:** cerebrospinalfluid

**DNA:** deoxyribonucleic acid

**EDTA:** ethylenediaminetetraacetic acid

**IFN:** interferon

**Ig:** Immunoglobulin

**LPS:** lipopolysaccharide

**M.M:** master mix

**NK cell:** natural killer cell

**PMN:** poly morphonuclear

**PCR:** polymerase chain reaction

**rRNA:** ribosomal ribonucleic acid

**SAT:** standard agglutination test

**TE:** trisethylenediamine tetra acetic acid

**SPA:** serum plate agglutination

**Th:** T-lymphocyte helper

**TNF:** tumour necrosis factor

**2ME:** 2mercaptoethanol

**WHO:** World Healthy Organization

فصل اول:

طرح تحقيق

## ۱-۱-۱- مقدمه

بروسلوز یکی از شایعترین بیماریهای مشترک بین انسان و دام در ایران می باشد. بروسلوز انسانی در تمام قسمت های کشور اندمیک می باشد. 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 می باشد بلکه همچنین روش های تشخیصی در اغلب موارد موفق به جداسازی ارگانیزم نمی گردند. با توجه به محدودیت تست های سرولوژیک و سرعت روش PCR در تشخیص مقادیر کم DNA در سرم یا خون و کاهش خطر آلودگی کارکنان، روش PCR ابزاری مفید برای تشخیص بروسلوز است. (۱-۵)

## ۱-۲- بیان مسأله

بروسلوز یکی از شایعترین بیماریهای مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی است و بروسلا ملی تنسیس شایعترین عامل ایجاد بیماری می باشد تنها ۱۷ کشور در دنیا به عنوان کشورهای عاری از بروسلوز شناخته شده اند در حالی که طی سالهای اخیر شیوع بیماری در سراسر جهان رو به افزایش می باشد. (۱)

بروسلوز در بسیاری از نقاط جهان اندمیک بوده، و در کشورهای در حال توسعه از شیوع بالایی برخوردار است. در ایران، بروسلوز انسانی در تمام نقاط کشور اندمیک است و تعداد بیماران با تشخیص قطعی در سال ۱۹۸۸، هفتاد و یک هزار و پنجاه و یک نفر می باشد (۱۳۲/۴ در هر ۱۰۰ هزار نفر) که این میزان یکی از بالاترین مقادیر شیوع در جهان می باشد. (۲) سازمان بهداشت جهانی (WHO) در هر سال تعداد موارد جدید بیماری بروسلوز را ۵۰۰ هزار مورد گزارش نموده است. و این مقدار بسیار کمتر از میزان واقعی محاسبه شده بروز بروسلوز انسانی می باشد. (۶) علایم بالینی این بیماری فوق العاده غیراختصاصی است و