دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه پژوهشی برای دریافت درجه

دکترای حرفه ای در رشته پزشکی

عنوان:

ارزیابی کارائی پرایمر های B4/B5 وF4/R2 در ردیابی DNA گونه های بروسلا در سرم با روش PCR

استاد راهنما:

دکتر هادی پیری دوگاهه

استاد مشاور:

دکتر محسن ارزنلو

نگارش:

رضا رضائی گیل کلایه

شماره پایان نامه: ۰۲۸٤ سال تحصیلی: ۸٦-۱۳۸۵

بسم الله الرحمن الرحيم

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده

فصل اول : کلیات

۱-۱ انگیزه بررسی ۱

۱-۲ اهداف و فرضیات ٤

۱-۲-۱ هدف کلی طرح ٤

۱-۲-۲ اهداف اختصاصی ٤

۱-۲-۳ هدف کاربردی..... ٥

۱-۲-٤ سؤال پژوهش..... ٥

۱-۲-٥ فرضیات ٥

فصل دوم: بررسی متون و مقالات

۲-۱ جنبه های متدولوژی..... ٦

۲-۱-۱ آماده سازی نمونه ٦

۲-۱-۲ انتخاب توالی هدف ۷

۲-۱-۳ ردیابی محصولات PCR..... ۸

۲-۱-٤ شناسایی بروسلا در سطح گونه ۸

۲-۱-٥ شناسایی بروسلا توسط PCR با استفاده از نمونه های بالینی..... ۱۱

۲-۲ تاریخچه ۱۲

۲-۳ جنس بروسلا..... ۱٤

عنوان	صفحه

۲-٤ ژنتیک مولکولی ۱٦

۲-۵ اپیدمیولوژی ۱۷

۲-٦ روشهای تشخیص ۲۰

۲-٦-۱ نقش کشت خون در تشخیص بروسلوز انسانی ۲۰

۲-٦-۲ روشهای کشت مایع ۲۲

۲-٦-۳ روشهای کشت خون بی فازیک ۲۳

۲-٦-٤ روش لیزسانتریفیوگیشن ۲٤

۲-٦-۵ ردیابی رادیومتریک بروسلا..... ۲۵

۲-٦-٦ استفاده از اشعهٔ مادون قرمز ۲۵

۲-٦-۷ استفاده از خاصیت فلورسانس ۲۷

۲-٦-۸ تشخیص سرولوژی ۲۸

۲-٦-۸-۱ آزمایش روزبنگال ۳۰

۲-٦-۸-۲ الگوتیناسیون استاندارد لوله ای ۳۱

۲-٦-۸-۳ آزمایش ۲- مرکاپتواتانول ۳۲

۲-٦-۸-٤ آزمایش کومبس رایت ۳۲

۲-٦-۸-۵ آزمایش الیزا..... ۳۲

۲-٦-۹ تشخیص بروسلوز به روش PCR..... ۳۳

۲-۷ سایر عفونتهای بروسلایی ۳٤

۲-۷-۱ عفونت دستگاه گوارشی ۳٤

عنوان	صفحه

۲-۷-۲ عفونت کبد و صفرا ۳۵

۲-۷-۳ عفونت استخوان ۳۵

۲-۷-٤ عفونت دستگاه عصبی ۳٦

۲-۷-۵ عفونتهای قلبی –عروقی ۳٦

۲-۷-٦ عفونت دستگاه تنفس ۳۷

۱-۷-۷ عفونت دستگاه ادراری –تناسلی ۳۷

۲-۷-۸ حاملگی ۳۷

۲-۷-۹ عوارض هماتولوژیک ۳۸

۲-۷-۱۰ ضایعات پوستی ۳۸

۲-۷-۱۱ ضایعات چشمی ۳۹

۲-۸ پاتوژنز ۳۹

۲-۸-۱ ایمنی میزبان ٤۰

۲-۹ درمان ٤۱

فصل سوم : مواد و روشها

۳-۱ مراحل انجام کار ٤٤

۳-۲ آماده سازی پرایمرها..... ٤۸

۳-۳ آماده سازی واکنش های PCR..... ٤۹

۳-٤ الکتروفورز محصولات PCR..... ۵۱

عنوان **صفحه**

فصل چهارم : نتایج

٤-١ نتایج ٥٢

فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری

٥-١ بحث و نتیجه گیری ٥٧

٥-٢ پیشنهادات ٦٠

چکیده انگلیسی

منابع و مأخذ

فهرست جداول و شکلها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱: شرایط **Set up** واکنشهای **PCR** در دستگاه ترموسایکلر برای پرایمرهای B_4/B_5..... .....٤٥

جدول ۳-۲: شرایط **Set up** واکنشهای **PCR** در دستگاه ترموسایکلر برای پرایمرهای F_4/R_2.....٤٥

جدول ۳-۳ :غلظت مناسب ترکیبات مورد استفاده در واکنش **PCR** ٥٠

شکل ٤-۱: **Setup** پرایمرهای B_4/B_5 برای بروسلا ابوروتوس و بروسلاملی تنیس در دماهای مختلف ٥٣

شکل ٤-۲: **Setup** پرایمرهای F_4/R_2برای بروسلا ابوروتوس و بروسلاملی تنیس دردماهای مختلف ٥٤

شکل ٤-۳: نتایج حاصل از **PCR** با غلظت های مختلف **DNA** محلول در سرم با استفاده از پرایمرF_4/R_2 ..٥٥

شکل ٤-٤: نتایج حاصل از **PCR** با غلظت های مختلف **DNA** محلول در سرم با استفاده از پرایمرB_4/B_5 ..٥٦

تقدیم به بهانه های زندگی ام

پدر و مادرم:

به پاس بزرگواریها، فداکاریها و محبتهایشان

مادربزرگم:

به پاس زحماتش

خواهرم لیلا ، دکتر حیدری، پارسای عزیز

و برادرم امیر:

به پاس حضور دلگرم کننده شان

تقدیم به:

جناب دکتر پیری به پاس زحمات زیادی که کشیده اند.

جناب دکتر ارزنلو به پاس راهنمائیهایشان

و تمام اساتید بزرگوارم

با تشکر از: دوست عزیزم جناب آقای دکتر رضا یعقوب پور

و

جناب دکتر سجادی
جناب دکتر مدنی
جناب دکتر مهرگانی
جناب دکتر مهربان
جناب دکتر شکیبا
جناب دکتر هماپور
جناب دکتر چگینی
جناب دکتر بالاخانی
جناب دکتر محمدنیا
جناب دکتر گسیلی
جناب دکتر امینی
جناب دکتر عباسی
جناب دکتر شیرین زاده

جناب آقای عطایی
جناب آقای بلوکیان
جناب آقای مجاوری
خانم دکتر سیفی
خانم دکتر روستا
خانم دکتر مشیری
خانم دکتر محمدی
خانم دکتر موسوی نسب
خانم دکتر ایلایی
خانم دکتر شاطری
خانم دکتر فغانی
خانم دکتر حاجی میرزایی
سرکار خانم نفت چی

چکیده:

مقدمه و هدف :بروسلوز انسانی دربسیاری از کشورهای از جمله ایران یک مشکل اساسی بهداشت جامعه 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 ارگانیسم نمی گردند . ابداع تکنیک های جدید تشخیصی که از یک طرف منجر به ردیابی و شناسائی سریع بروسلامیشود و از طرف دیگر خطر عفونت با این باکتری را در آزمایشگاه به حداقل می رسانداز اهمیت بالائی برخوردار است،PCR ازجمله روش هائی است که این مزایا را دارد. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی دو متد متفاوت PCR برای رد یابیDNA گونه های بروسلا در نمونه های سرم انسان بود.

مواد وروش ها:

DNA با استفاده از دستورالعمل استاندارد و توسط حلالهای آلی استخراج گردید، و با اسفاده از اتانول ۹۵٪ رسوب داده شد.

غلظت و خلوص DNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر تعیین شد. رقت های مختلفی از DNA خالص آماده شد.

دو جفت پرایمر مورد استفاده ،نواحی متفاوتی از ژن های بروسلارا تکثیر می کردند. پرایمرB4/B5 یک قطعه ۲۲۳ جفت بازی را تکثیر می کند که برروی ژنی که یک پروتئین ۳۱

کیلو دالتونی را رمزدهی می کند ،قرار داردو پرایمر F4/R2 یک قطعه ۹۰۵جفت بازی را تکثیر می کند که از توالیs ۱۶ RNA ریبوزومی مشتق شده است.

تمام واکنش های PCR در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر که حاوی غلظت های متفاوتی از DNA بروسلا و همچنین کنترل مثبت و منفی بودند.انجام شد. کنترل منفی حاوی آب مقطر به جای DNA الگو بود و به عنوان کنترل مثبت از DNA باکتری بروسلا استفاده شد.

نتایج:

دو متد PCR حساسیت بسیار خوبی برای ردیابیDNA گونه های بروسلا در نمونه های سرم داشتند. دو جفت پرایمر مورد استفاده تفاوتی در حساسیت برای ردیابی DNA خالص بروسلا نشان ندادند. آنها توانستند DNA خالص بروسلا را در محدوده ای بین ٤/۲۵ نانو گرم تا ٤/۲۵ فمتو گرم ردیابی نماید.

بحث و نتیجه گیری:

تفاوتی در حساسیت ردیابی DNA باکتری بروسلا در سرم توسط دو جفت پرایمر مورد بررسی مشاهده نگردید.با این وجود، در مقایسه بین دو جفت پرایمر، از آنجائیکه پرایمرB4/B5 موجب تکثیرقطعه کوتاه تری می شود و ردیابی و کارکردن با قطع کوتاه تر راحت تر است ، ما فکر می کنیم این پرایمر می تواند به ابزار مفیدی برای تشخیص بروسلوز انسانی مبدل گردد.

کلمات کلیدی: بروسلا ، PCR ، پرایمر ، بروسلوز

فصل اول : کلیات

۱-۱ انگیزه بررسی

بروسلوز یکی از شایعترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی است و بروسلا ملی‌تنسیس شایع‌ترین عامل ایجاد بیماری می‌باشد. تنها ۱۷ کشور در دنیا به عنوان کشورهای عاری از بروسلوز شناخته شده‌اند در حالی که طی سال‌های اخیر شیوع بیماری در سراسر جهان رو به افزایش می‌باشد(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 می‌باشد(۱۳۲/٤ در هر ۱۰۰ هزار نفر) که این میزان یکی از بالاترین مقادیر شیوع در جهان است(۲).

سازمان بهداشت جهانی (WHO) تعداد موارد جدید بیماری بروسلوز را در هر سال ۵۰۰ هزار مورد گزارش نموده است که البته این مقدار بسیار کمتر از میزان واقعی محاسبه شده بروز بروسلوز انسانی می‌باشد(۳).

علایم بالینی این بیماری فوق‌العاده غیراختصاصی است و تظاهرات بسیار متغیر را شامل می‌شود. تظاهرات بیماری به صورت یک سندرم تب‌دار همراه با علایم سیستمیک شامل لرز، تعریق، سردرد، کمردرد، بی‌اشتهایی و کاهش وزن بوده و یا به صورت گرفتاریهایی مثل آرتریت، اسپوندیلیت، آندوکاردیت، مننژیت، اپیدیدیموارکیت و .... بروز می‌کند.

از آنجایی که تظاهرات بالینی بروسلوز انسانی بسیار متغیر می‌باشد، تشخیص بیماری عمدتاً با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی انجام می‌شود(٤).