



مقایسه حساسیت ایمونوسنسور مبتنی بر نانوذرات سیلیکای رنگی با روش کشت و

واکنش زنجیره ای پلی مرز در تشخیص بروسلا آبورتوس

آرش شمس^۱، بهاره رحیمیان ظریف^۲، مجتبی صلوتی^{۳*}، رضا شاپوری^۴، ساکو میرزایی^۵

^۱ دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی. ^۲ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی. ^۳ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی. ^۴ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، دانشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات بیولوژی. ^۵ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی. ^۶ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی.

چکیده

سابقه و هدف: بروسلوز، همواره به عنوان تهدیدی بر سلامت و اقتصاد جامعه مطرح بوده است. وجود محدودیت در روش های تشخیص بیماری در انسان و حیوان لزوم استفاده از روش های نوین شناسایی را توجیه می کند. این مطالعه با هدف مقایسه بین میزان حساسیت روش کشت و PCR با ایمونوسنسور با استفاده از راهبرد رنگ سنجی به منظور تشخیص بروسلا آبورتوس انجام شد.

مواد و روش‌ها: نانوذرات سیلیکای رنگی و نانوذرات پارامغناطیس پس از سنتز، با آنتی بادی پلی کلونال ضد بروسلا آبورتوس فعال شده با کمپلکس EDC/NHS کونژوگ گردیدند تا به ترتیب پروب های شناساگر و تسخیری تشکیل گردند. این پروب ها پس از اضافه شدن به رقت های سریالی از بروسلا آبورتوس و تکمیل واکنش، جمع آوری شده و در ادامه، با رها سازی رنگ آلی از ساختار سیلیکا شدت جذب در ۶۷۰ نانومتر قرائت گردید. از سوی دیگر، هم زمان با کشت هر رقت، DNA کروموزومی مربوط به آن توسط کیت استخراج و آزمون PCR انجام گرفت. نتایج هر سه آزمون در نهایت با یکدیگر مقایسه شد.

یافته‌ها: بر اساس مشاهدات، دامنه تشخیص در ایمونوسنسور و کشت یکسان و برابر $1/5 \times 10^4 \text{ CFU.ml}^{-1} - 1/5 \times 10^3$ گزارش گردید. حداقل میزان تشخیص در ایمونوسنسور $1/5 \times 10^4 \text{ CFU.ml}^{-1}$ و در کشت 400 CFU.ml^{-1} تعیین شد. دامنه تشخیص PCR نیز $1/5 \times 10^4 \text{ CFU.ml}^{-1} - 1/5 \times 10^4$ با حداقل میزان تشخیص 5000 CFU.ml^{-1} به دست آمد.

نتیجه گیری: مقایسه نتایج این تحقیق نشان داد که ایمونوسنسور پیشنهادی قابلیت جایگزینی روش های مرسوم شناسایی بروسلا آبورتوس را دارد و می تواند به عنوان یک ابزار تشخیص در محل با داشتن حساسیت بالا مطرح گردد.

واژگان کلیدی: بروسلا آبورتوس، ایمونوسنسور، سیلیکای رنگی، کشت، PCR.

دریافت مقاله: اردیبهشت ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۸

مقدمه

ایجاد می شود. به دلیل داشتن گستره جغرافیایی وسیع، میزان اندک دوز عفونی ۱۰-۱۰۰ ارگانیسم، انتقال از طریق تنفس، درمان چند آنتی بیوتیکی طولانی مدت و نبود واکسن موثر در انسان دارای اهمیت تشخیصی بالایی می باشد. بروسلوز انسانی

بروسلوز یکی از پنج بیماری شایع باکتریایی مشترک بین انسان و دام در جهان است که توسط جنس بروسلا (*Brucella*)

* آدرس برای مکاتبه: زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، مرکز تحقیقات بیولوژی

پست الکترونیک: saloutim@yahoo.com

تلفن: ۰۲۴۳۳۴۲۱۰۰۱

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (<http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/>) در

فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.



عنوان یک روش تشخیصی سریع و ساده مطرح است (۹-۷). نانوذرات سیلیکا دارای سطحی آب دوست است که در آن امکان عامل دار کردن سطح با گروه های سیلان وجود دارد، سهولت ساخت، زیست سازگاری بالا و هزینه پایین تولید آن را به عنوان یکی از نانوذرات مهم در تحقیقات بیولوژیک تبدیل شده است. از آنجایی که اساس ایمونو رنگ سنجی بر پایه بروز تغییرات رنگی استوار است و نانوذرات سیلیکا فاقد رنگ می باشند بکار بردن رنگ های آلی به منظور رسیدن به این هدف گزینه ای مناسب است. رنگ های آلی به لحاظ شیمیایی توانایی برقراری پیوندهای کووالانی با گروه های عاملی بر سطح نانوذرات سیلیکا را دارند و بنابراین به منظور رنگ آمیزی این نانو ذرات مناسب می باشند. همچنین از نظر فیزیکی نیز پایدارند و در شرایط نامساعد مانند نور، گرما، اسید و قلیا محو نمی شوند (۱۲-۱۰).

مگنتیت در ابعاد نانو دارای خصوصیاتی چون پارامغناطیس، زیست سازگاری و نسبت بالای سطح به حجم است، تهیه آن مقرون به صرفه و کار با آن ساده می باشد (۱۳ و ۱۴). هدف از انجام این مطالعه، مقایسه حساسیت روش های تشخیصی مبتنی بر کشت و PCR با ایمونوسنسور طراحی شده بر پایه سیلیکای رنگی و نانوذرات پارامغناطیس در شناسایی بروسلای آبورتوس (*Brucella abortus*) است که از نانوذرات سیلیکای رنگی به عنوان پروب تشخیصی، نانوذرات پارامغناطیس به عنوان پروب تسخیری و رنگ آلی به عنوان اندیکاتور رنگ سنجی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین حضور باکتری، هم به صورت کیفی با بروز تغییرات رنگی قابل مشاهده در نمونه های مورد بررسی و هم بصورت کمی با اندازه گیری میزان شدت جذب رنگ آلی آزاد شده از ساختارهای ساندویچ گونه توسط اسپکتروفتومتر قابل بررسی می باشد.

مواد و روش ها

الف) سنتز نانوذرات سیلیکای آبی رنگ و آمین دار شده: روش مورد استفاده به منظور سنتز نانوذرات سیلیکای رنگی روش میکرومولسیون معکوس تعیین گردید که در دمای اتاق صورت

به ندرت کشنده بوده و انتقال از فرد به فرد صورت نمی گیرد. در حیوانات منجر به کاهش شیردهی، سقط جنین و ناباروری می گردد (۳-۱). روش های مختلفی برای شناسایی باکتری وجود دارد. کشت به عنوان استاندارد طلایی تشخیص در بروسلای مطرح است. سخت رشد بودن ارگانیزم، طولانی شدن زمان رشد و خطر انتقال باکتری در آزمایشگاه از جمله مواردی هستند که کاربرد این روش را محدود می کنند (۴). روش های سرولوژیک مختلفی برای تشخیص نمونه های بالینی بروسلوز وجود دارد که حساسیت آنها بین ۶۵-۱۰۰ درصد (رزبنگال، ۱۰۰ درصد و sat، ۹۲-۹۳ درصد) متغیر است. حساسیت در مناطق آندمیک نیز به دلیل عیار بالای آنتی بادی در جمعیت سالم پائین است. از طرف دیگر واکنش های متقاطع با سایر باکتری ها مانند *یرسینیا/انتروکولیتیکا O9*، *اشریشیا کلی O157* و *سالمونلا/اتریکا* نیز اختصاصیت آن را نیز کاهش می دهد (۵). روش های مولکولی حساسیت و اختصاصیت بالایی دارند، اما گران بودن و نیاز به تجهیزات و پرسنل آموزش دیده موجب شده که این روش ها نتوانند به عنوان یک روش رایج آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرند (۶).

امروزه ایمونوسنسورهای مبتنی بر نانوذرات با استفاده از راهبرد رنگ سنجی کاربرد فراوانی در شناسایی پاتوژن ها پیدا نموده است. ایمونو رنگ سنجی تکنیکی است که از تغییرات رنگی حاصل از برهم کنش های میان آنتی ژن - آنتی بادی موجب شناسایی یک ماده می گردد. این روش در ارتباط با ایمنی غذایی، تشخیص های کلینیکی و بررسی های محیطی حائز اهمیت است. مواد فلورسانس، آنزیم ها و نانوذرات طلا به عنوان ابزاری قدرتمند در انتقال سیگنال در آزمایش های ایمونو رنگ سنجی مطرح هستند. حضور در واکنش های کاتالیتیک و بازده بالا از آنها بیوانالیزورهایی حساس به وجود آورده است. با این حال عمر کوتاه مدت، قیمت بالا و شرایط عملیاتی بحرانی، کاربرد آنها را محدود می سازد. به طوری که برای تشخیص معمول و رایج باکتری ها در آزمایشگاه، صرفه اقتصادی ندارند. از این رو ترکیب نانو ذرات سیلیکای رنگی با نانو ذرات مغناطیسی در آزمون های مبتنی بر رنگ سنجی به

ج) تثبیت آنتی بادی پلی کلونال بر سطح نانوذرات سیلیکای آبی رنگ آمین دار شده و نانوذرات پارامغناطیس: مقدار ۰/۰۰۰۵ گرم EDC، ۰/۰۰۰۲ گرم NHS (سیگما، آلمان)، ۵ میکرولیتر آنتی بادی پلی کلونال ضد بروسلا آبورتوس orb10564 (بی اریبت، آمریکا) و ۵۰۰ میلی لیتر PBS، به ۳۰ میلی گرم blue-SiNPs و PMNPs به ترتیب اضافه گردید. پس از ۴ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجه سلسیوس مخلوط سه بار با PBS شستشو داده شد. در نهایت IgG-blue-SiNPs و IgG-PMNPs بدست آمده با آلبومین سرم گاوی (BSA) یک درصد به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری گردید. در ادامه، مواد حاصل سه بار با PBS شستشو داده شده و در ۱ میلی لیتر از PBS در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان استفاده ذخیره شد (۱۷).

د) آماده سازی و کشت باکتری ها: در ابتدا بروسلا آبورتوس سویه ۵۴۴ (موسسه واکسن و سرم سازی رازی، حصارک کرج) به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در محیط بروسلا برات گرماگذاری شد. سپس، به محیط بروسلا آگار منتقل شده و به مدت ۴۸ ساعت دیگر در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری گردید. همه کلنی ها توسط آزمون های تشخیصی بیوشیمیایی تأیید و تا روز استفاده در محیط برات حاوی ۱۵ درصد گلیسرول و دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (۱۸).

ه) ایمنو رنگ سنجی: مقدار ۱۰ میلی گرم IgG-blue-SiNPs و ۵ میلی گرم PMNPs با ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی بروسلا آبورتوس مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس همراه با تکان ملایم گرماگذاری شد. پس از تکمیل واکنش، کمپلکس های ایمنی توسط آهن ربا جدا سازی و با اضافه نمودن ۱ میلی لیتر هیدروکسید سدیم رنگ آلی از ساختار نانوذرات سیلیکا آزاد گردید. جذب رنگ در ۶۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر بررسی شد (۸ و ۹).

و) آزمون کشت: رقت های پشت سرهم (سریالی) از باکتری بروسلا آبورتوس ($10^1 \times 10^0 \times 10^{-1} \times 10^{-2} \times 10^{-3}$) تهیه گردید. هر یک از این رقت ها بطور جداگانه بر روی محیط کشت

گرفت. برای شروع ۲ میلی لیتر سورفکتانت تریتون ایکس ۱۰۰ (مرک، آلمان)، ۸ میلی لیتر سیکلوهگزان (مرک، آلمان)، ۲ میلی لیتر هگزانول (مرک، آلمان)، ۱۵۰ میکرولیتر از C.I. Reactive Blue 21# sc-358089 (سانتا کروز، آمریکا) و ۴۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر دیونیزه به مدت ۱۵ دقیقه با هم زن به خوبی مخلوط شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر TEOS (سیگما آلدریچ، آلمان)، ۳۳ میکرولیتر APTMS (سیگما آلدریچ، آلمان) و ۱۰۰ میکرولیتر آمونیاک (مرک، آلمان) به مجموعه اضافه و پس از ۴۸ ساعت همگن سازی واکنش تکمیل گردید. به منظور شکستن میکرومولسیون و بدست آوردن نانوذرات سیلیکای رنگی استون (مرک، آلمان) به کمپلکس اضافه و پس از ۳۰ دقیقه، نانوذرات سیلیکای آبی رنگ (blue-SiNP) تولیدی چندین بار با اتانول و آب شستشو داده شدند. به منظور معرفی گروه های آمینی بر سطح نانوذرات سیلیکا، ۳۰ میلی گرم blue-SiNP با ۱۰ میلی لیتر اتانول (مرک، آلمان)، ۱۵۰ میکرولیتر APTMS و ۱۵۰ میکرولیتر آمونیاک به مدت یک شب مخلوط شدند. جداسازی نانوذرات سیلیکای آبی رنگ آمین دار شده (blue-SiNPs-NH₂) توسط سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ rpm و سه بار شستشو با محلول سالین بافر فسفات ۰/۰۱ مولار (PBS, pH ۷) انجام گردید. نانو ذرات بدست آمده در ۱ میلی لیتر PBS و در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان مصرف نگهداری شدند (۸ و ۱۵).

ب) سنتز نانوذرات پارامغناطیسی: ۱/۶ گرم Fe₃O₄ و ۰/۸ گرم Fe₂O₃ (سیگما آلدریچ، آلمان) در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. این مخلوط در دمای ۸۰ درجه سلسیوس برای مدت زمان ۲۰ دقیقه مخلوط شده سپس ۲ میلی لیتر پروپانول (مرک، آلمان) و ۲ میلی لیتر اتانول در مدت یک ساعت به آن اضافه گردید. در ادامه، ۲۰-۳۰ میلی لیتر آمونیاک قطره قطره در طول یک ساعت به مخلوط اضافه شد. ۱۰ میلی لیتر TEOS نیز به آرامی به مجموعه وارد گردید. این شرایط برای مدت دو ساعت بدون تغییر ثابت نگه داشته شده و سپس ۵ میلی لیتر APTMS مجدد اضافه گردید. پس از ۲ ساعت نانوذرات پارامغناطیس (PMNPs) تشکیل گردیدند. به منظور زدودن مواد اضافی ۶-۵ بار با آب مقطر شستشو و در ۴ درجه سلسیوس ذخیره شدند (۱۶).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی جنس و گونه بروسلا (۱۹).

نام پرایمر	توالی پرایمر	محصول (bp)
جنس B4	5-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3	۲۳۳
بروسلا B5	5-CGCGCTTGCCITTCAGGCTG-3	
بروسلا Ba-SP	5-GCAGAACGGAAATTTTCCAATCCC-3	۴۹۸
آبورتوس IS711 SP	5-TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3	

۶۰ °C ، ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۷۲ °C و نهایتاً ۱ سیکل ۸ دقیقه ای در ۷۲ °C درون دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. همچنین از سویه بروسلا آبورتوس ۵۴۴ (Razi institute, Iran) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. سپس الکتروفورز محصولات PCR توسط دستگاه الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪/۱/۵ (Sigma, USA) و با استفاده از رنگ Safe Stain (SinaClon, Iran) انجام گردید. در نهایت ژل ها با استفاده از دستگاه ژل داگ (Syngene, England) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ح) آنالیز آماری: در این مطالعه آزمون ها ۱۰ بار تکرار شدند و نتایج به دست آمده با استفاده از نسخه ۲۵ نرم افزار SPSS و آزمون آنووا آنالیز گردید. از آنجایی که مقادیر هر سه روش بزرگتر از ۰/۰۵ بود بنابراین فرض نرمال بودن بر اساس روش KS پذیرفته شد. نتایج آزمون آنووا نشان داد که در سطح خطای ۱٪ اختلاف معنی داری بین میانگین سه گروه وجود دارد. بر اساس نتایج تعقیبی LSD بین روش تشخیصی مبتنی بر بیوسنسور و PCR اختلاف معنی داری وجود داشت در حالی که بین این روش و روش مبتنی بر کشت اختلاف معنی داری دیده نشد. همچنین بر اساس نتایج این آزمون بین روش PCR و کشت نیز اختلاف معنی دار وجود داشت.

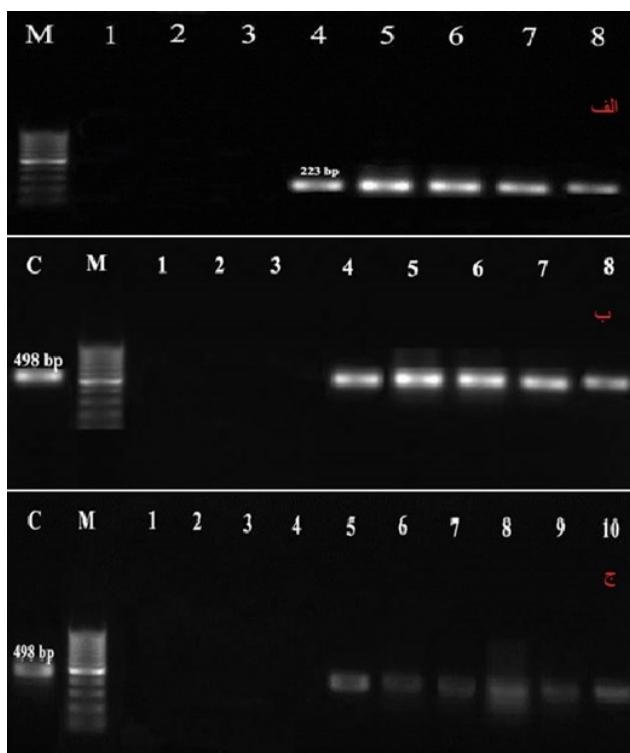
یافته‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون ایمونو رنگ سنجی، دامنه تشخیص در محدوده 10^3 CFU.ml^{-1} - 10^4 CFU.ml^{-1} تعیین گردید که بیشترین میزان جذب رنگ آلی مربوط به غلظت 10^4 CFU.ml^{-1} و کمترین مقدار جذب مربوط به غلظت 10^3 CFU.ml^{-1} بود (شکل ۱). کمترین محدوده تشخیص (Limit Of Detection) نیز بین رقت های 10^3 CFU.ml^{-1}

بروسلا آگار با لوپ استاندارد کشت داده شد. پس از ۷۲ ساعت هر پلیت از نظر رشد باکتری و تعداد کلنی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور دست یابی به تعداد دقیق کمترین میزان شناسایی بروسلا در روش کشت، بین آخرین رقت رشد کرده بر روی محیط با اولین رقت فاقد رشد، رقت های سریالی جدید تهیه و نتایج رشد پس از کشت مجدد بر روی محیط بروسلا آگار و ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری مورد ارزیابی قرار گرفت.

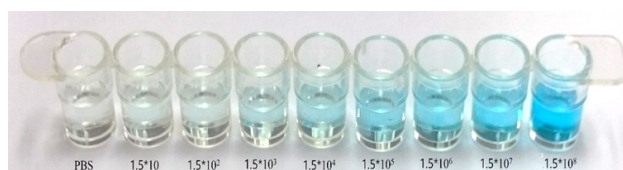
ز) استخراج DNA بروسلا آبورتوس و آزمون PCR: DNA هر رقت مطابق با دستور العمل کیت GENEALL (GeneALL#106-152، کره جنوبی) استخراج گردید. آزمون PCR با پرایمرهای B4 و B5 ارائه شده توسط Baily و همکاران جهت تعیین جنس بروسلا انجام گرفت. این پرایمرها موجب تکثیر ژن محافظت شده *bcs p31* (ژن کدکننده پروتئین غشاء ۳۱ کیلو دالتونی بروسلا آبورتوس) می گردد و اختصاصی جنس بروسلا است. در انجام PCR، $12/5 \mu\text{l}$ مستر میکس $2 \times$ (Ampliqon Co, Denmark)، شامل بافر $1 \times$ PCR، MgCl_2 ، $5 \mu\text{l}$ DNA استخراجی ($10 \mu\text{g}$)، $1/5 \text{ mM}$ dNTPs، $1/5 \text{ mM}$ Taq DNA polymerase و $1/25 \text{ U}$ و 10 pmol از پرایمر های B4 و B5 استفاده شد. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. برنامه زمانی و دمایی ترموسایکلر (Primus 96, Germany) به قرار زیر انجام شد: مرحله شروع با یک سیکل ۵ دقیقه ای در $94 \text{ }^\circ\text{C}$ آغاز و با ۳۵ سیکل ۵۰ ثانیه ای در $94 \text{ }^\circ\text{C}$ ، ۴۵ ثانیه ای در $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ، ۳۵ ثانیه ای در $72 \text{ }^\circ\text{C}$ ادامه و در نهایت با ۱ سیکل ۱۰ دقیقه ای در $72 \text{ }^\circ\text{C}$ خاتمه یافت. برای تشخیص گونه بروسلا آبورتوس از پرایمرهای پیشنهاد شده توسط بیکر (Bricker) و هالینگ (Halling) استفاده گردید. در جدول ۱، توالی پرایمرهای مورد استفاده و اندازه محصول نهایی ارائه شده است (۱۹).

حجم مخلوط نهایی برای انجام آزمایش PCR در هر نمونه ۲۵ میکرولیتر تعیین گردید. به جزء پرایمرها، دیگر مواد مطابق با آزمون PCR تعیین جنس بروسلا بود. در نهایت میکروتیوب ها طبق برنامه دمایی بصورت ۱ سیکل آغازین به مدت ۵ دقیقه در $94 \text{ }^\circ\text{C}$ ، ۳۵ سیکل ۱ دقیقه ای در $94 \text{ }^\circ\text{C}$ ، ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در



شکل ۲: الف) تصویر محصول PCR ژن جنس بروسلا (bcs31) در ژل آگاروز. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. ۱: غلظت $1/5 \times 10^1$. ۲: غلظت $1/5 \times 10^2$. ۳: غلظت $1/5 \times 10^3$. ۴: غلظت $1/5 \times 10^4$. ۵: غلظت $1/5 \times 10^5$. ۶: غلظت $1/5 \times 10^6$. ۷: غلظت $1/5 \times 10^7$. ۸: غلظت $1/5 \times 10^8$ CFU.ml⁻¹ (ب) تصویر محصول PCR ژن اختصاصی بروسلا آبورتوس در ژل آگاروز. C: کنترل مثبت. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. ۱: غلظت $1/5 \times 10^1$. ۲: غلظت $1/5 \times 10^2$. ۳: غلظت $1/5 \times 10^3$. ۴: غلظت $1/5 \times 10^4$. ۵: غلظت $1/5 \times 10^5$. ۶: غلظت $1/5 \times 10^6$. ۷: غلظت $1/5 \times 10^7$. ۸: غلظت $1/5 \times 10^8$ CFU.ml⁻¹ (ج) تصویر محصول PCR ژن اختصاصی بروسلا آبورتوس در ژل آگاروز جهت تعیین کمترین محدوده تشخیص. C: کنترل مثبت. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. ۱: غلظت ۱۰۰۰. ۲: غلظت ۲۰۰۰. ۳: غلظت ۳۰۰۰. ۴: غلظت ۴۰۰۰. ۵: غلظت ۵۰۰۰. ۶: غلظت ۶۰۰۰. ۷: غلظت ۷۰۰۰. ۸: غلظت ۸۰۰۰. ۹: غلظت ۹۰۰۰. ۱۰: غلظت 10000 CFU.ml⁻¹.

این مطالعه، حساسیت روش های کشت و واکنش زنجیره ای پلی مرز مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج حاصل را با میزان حساسیت استفاده از ایمونوسنسور مبتنی بر نانوذرات سیلیکای رنگی و پارامغناطیس در شناسایی بروسلا آبورتوس مقایسه گردید. کشت به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص آزمایشگاهی بروسلا مطرح می باشد. با این حال رشد آهسته باکتری، دوره طولانی گرماگذاری و نیاز به واسطه های ویژه غذایی رشد و همچنین خطر انتقال ارگانیسیم به پرسنل استفاده از این شیوه را محدود ساخته است (۲۳). این محدودیت ها در گزارش مطالعات گرسو (Geresu) (۲۴)،



شکل ۱: ایمونو رنگ سنجی بر اساس رقت های $1/5 \times 10^1$ تا $1/5 \times 10^8$ CFU.ml⁻¹.

$1/5 \times 10^2 - 1/5 \times 10^3$ بود که با تقسیم فاصله بین این دو رقت به واحد های کوچکتر در نهایت LOD برابر 450 CFU.ml⁻¹ تعیین شد.

یافته های آزمون کشت نیز دامنه تشخیص را در محدوده $1/5 \times 10^4 - 1/5 \times 10^8$ CFU.ml⁻¹ اعلام داشت در حالیکه LOD محاسبه شده برای آن 400 CFU.ml⁻¹ تعیین گردید.

بر اساس ارزیابی نتایج PCR، تشکیل باند 223 bp حضور جنس بروسلا تأیید گردید (شکل ۲. الف). باند 498 bp نشان دهنده گونه بروسلا آبورتوس بود و دامنه تشخیص در محدوده $1/5 \times 10^4 - 1/5 \times 10^8$ CFU.ml⁻¹ قرار دارد (شکل ۲. ب). حداقل میزان تشخیص 5000 CFU.ml⁻¹ تعیین گردید (شکل ۲. ج).

بحث

بروسلوز بیماری است که انسان بطور مستقیم یا غیر مستقیم از طریق تماس با حیوان یا فرآورده های دامی و لبنی آلوده می تواند مبتلا گردد. تشخیص آزمایشگاهی بروسلوزیس و تأیید قابل اطمینان بودن آن برای پزشکان همواره از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده است چرا که نشانه های بالینی می توانند بسیار گمراه کننده بوده و با بیماری های دیگر مانند آنفولانزا، لیپوسپیروزیس، مالاریا و تیفوئید اشتباه گرفته شود، همچنین باید توجه داشت که افسردگی و اضطراب، تحریک پذیری و زوال مغزی نیز می توانند از عوارض بروسلوز باشند، بنابراین در هر بیماری با علایم افسردگی می بایست احتمال بروز بروسلوز نیز بررسی گردد. از این رو تشخیص صحیح بروسلوز بسیار حائز اهمیت است و تاخیر در آن یکی از مهمترین عوامل افزایش بیماری و نیز منابع آلوده کننده است (۲۰-۲۲). روش های آزمایشگاهی تشخیص بروسلوز بر سه پایه میکروبیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی استوار است. در

۵۰۰۰ بود که دلیل آن می تواند اشتباه های تکنیکی یا محدودیت کیت استخراجی و یا کم بودن مقدار DNA نمونه ها باشد.

بر اساس نتایج، اندازه گیری جذب رنگ آلی دامنه ای بین 10^1 CFU.ml⁻¹ - 10^3 CFU.ml⁻¹ را در بر می گرفت. کمترین میزان شناسایی 10^1 CFU.ml⁻¹ تعیین گردید. محدوده تشخیصی ایمونوسنسور در مقایسه با کشت حدودا هم تراز ولی نسبت به PCR بالاتر بود. همچنین محدوده کمترین میزان تشخیصی ایمونوسنسور نسبت به کشت کمتر ولی بیشتر از PCR به دست آمد. از سوی دیگر نتایج این مطالعه با دیگر پژوهش های تشخیصی بر پایه نانوذرات نیز مقایسه گردید. استفاده از نانوذرات آهن و راهبرد رنگ سنجی به منظور تشخیص ویبریو پاراهمولیتیکوس در سال ۲۰۱۷ توسط لیو (Liu) و همکاران بکار گرفته شد. نتایج این تحقیق شناسایی باکتری را در دامنه ای بین 10^0 - 10^5 CFU.ml⁻¹ با کمترین میزان 10^1 CFU.ml⁻¹ نشان داد (۳۳). در همین سال سانگ و همکاران روشی سریع به منظور شناسایی بروسلا بر پایه کوانتوم دات، دانه های مغناطیسی و آنتی بادی های پلی کلونال مختلف ارائه دادند. محدوده شناسایی مطالعه آنها 10^1 - 10^5 CFU.ml⁻¹ گزارش گردید (۳۴). در سال ۲۰۱۵ حامدی و همکاران موفق به شناسایی *Entamoeba histolytica* بر اساس نانوذرات سیلیکای فلورسانس گردیدند (۳۵). ستار احمدی و همکاران نیز در همین سال ژنوم بروسلا ملتینسیس را در نمونه های کلینیکی به کمک نانوذرات طلا و راهبرد رنگ سنجی تشخیص دادند (۳۶). دوو (Dou) نیز با نانوذرات سیلیکای رنگی و نانوذرات مغناطیس موفق به شناسایی *سالمونلا پلوروم* در محدوده 10^7 CFU.ml⁻¹ - 10^2 CFU.ml⁻¹ با کمترین میزان 10^1 CFU.ml⁻¹ گردید (۸).

با توجه به محدوده تشخیصی دیگر سنسورهای مبتنی بر نانوذرات و نیز عدم کاربرد تکنیک ایمونو رنگ سنجی مبتنی بر نانوذرات سیلیکای رنگی در تشخیص بروسلا آبوریتوس تاکنون و در نظر گرفتن محدوده و کمترین میزان تشخیصی، می توان عملکرد ایمونوسنسور را در شناسایی باکتری بروسلا آبوریتوس

اومشا (Umsha) (۲۵)، لیستا (Lista) (۶) و نیلسن (Nielsen) (۲۶) نیز مورد بحث قرار گرفته است. در این پژوهش دامنه تشخیصی بروسلا آبوریتوس توسط کشت 10^1 CFU.ml⁻¹ تا 10^3 CFU.ml⁻¹ و کمترین محدوده تشخیصی 10^1 CFU.ml⁻¹ تعیین گردید که در مقایسه با نتایج PCR و ایمونوسنسور، این یافته ها استاندارد طلائی بودن و نیز اهمیت روش مبتنی بر کشت را بار دیگر تاکید می نمایند.

روش های مولکولی با کاهش چشمگیر در زمان، کاهش احتمال آلودگی پرسنل آزمایشگاهی و از همه مهمتر داشتن ویژگی و حساسیت بالا به عنوان یک روش تشخیصی مناسب پیشنهاد می گردند (۲۷). برای تشخیص بروسلا با روش PCR تاکنون بر اساس توالی نواحی مختلف ژنوم سویه های گوناگون باکتری، پرایمر های متعددی طراحی شده و پروتکل های مختلف ارائه شده است. از جمله عوامل مهم در تشخیص جنس بروسلا پروتئین های غشای خارجی (OMP) است که به دلیل ویژگی بارز و منحصر به فرد در جنس بروسلا به عنوان عامل مهم تشخیصی در بروسلوزیس مورد توجه ویژه پژوهشگران می باشد. پروتئین های غشای خارجی بروسلا در ایجاد پاسخ ایمنی سلولی در جنس بروسلا نقش کلیدی دارند. از دیگر پروتئین های غشایی که اختصاص به جنس بروسلا دارد پروتئین های غشایی Bcsp31، ۳۱ کیلودالتونی است که در تمام بیووارهای بروسلا وجود دارد (۲۹-۲۷).

در انجام این پژوهش از پرایمرهای B4 و B5 پیشنهاد شده توسط بایلی (Baily) و همکاران (۱۹) استفاده گردید. این پرایمرها موجب تکثیر ژن *bcs31* می شوند. برای تشخیص گونه بروسلا نیز از پرایمرهای ارائه شده توسط بیکر (Bricker) و هالینگ (Halling) استفاده شد (۱۹). این پرایمر ها بر اساس توالی IS711 طراحی شده و اختصاصی بروسلا آبوریتوس می باشد (۳۰). اندازه محصول PCR با نتایج مطالعات عالی زاده مفرد و همکاران (۲۷) در سال ۲۰۱۶، شمس و همکاران (۱۹) و حاجیا (۳۱) در ۲۰۱۷ و همچنین بانالیکار (Bannalika) و همکاران (۳۲) هم خوانی داشت.

درمورد کمترین محدوده تشخیصی PCR که برابر 10^1 CFU.ml⁻¹

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

رضایت بخش توصیف نمود. تغییرات رنگی قابل مشاهده ای که در مرحله نهایی ایمونو رنگ سنجی اتفاق می افتد نیز به عنوان عامل تشخیص کیفی حضور باکتری در نمونه ها است.

نتیجه گیری

با توجه به وجود محدودیت در روش های تشخیصی مرسوم بروسلوز و به منظور جلوگیری از بروز ضررهای بهداشتی و اقتصادی و در نظر گرفتن نتایج حاصل از این تحقیق می توان عنوان نمود که ایمونوسنسور پیشنهادی قابلیت جایگزینی روش های موجود را داشته و با انجام مطالعات تکمیلی می تواند به عنوان ابزار تشخیصی قدرتمند و در لحظه با حساسیت بالا مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمام کسانی که در اجرای این مطالعه همکاری نموده اند، کمال قدردانی و امتنان را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Shell W. Using real-time polymerase chain reaction as an alternative rapid method for enumeration of colony count in live *Brucella* vaccines. J Veterinary World. 2017; 10(6): 610-615.
2. Godfroid J. Brucellosis in livestock and wildlife: zoonotic diseases without pandemic potential in need of innovative one health approaches. Arch Public Health. 2017; 75(1): 34.
3. Minda A, Gezahegne MK. A review on diagnostic methods of brucellosis. Veterinar Sci Tech. 2016; 7: 3.
4. Raghava S, Umesha S. Brucellosis a review on the diagnostic techniques and medical plants used in the management of the brucellosis. J World Pharmacy Pharmaceutical Sci. 2018; 7(6): 2278-4357.
5. Christopher S, Umaphathy B, Ravikumar K. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. J Lab Physic. 2010; 2(2): 55.
6. Santis Rd. *Brucella*: molecular diagnostic techniques in response to bioterrorism threat. J Bioterror Biodefense. 2014; 5(14): 20.
7. Sun Q, Zhao G, Dou W. An optical and rapid sandwich immunoassay method for detection of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum* based on immune blue silica nanoparticles and magnetic nanoparticles. Sensor Actuator B-Chem. 2016; 226: 69-75.
8. Sun Q, Zhao G, Dou w. Blue silica nanoparticle-based colorimetric immunoassay for detection

- of *Salmonella pullorum*. Anal Methods. 2015; 7(20): 8647-8654.
9. Sun Q, Zhao G, Dou W. A nonenzymatic optical immunoassay strategy for detection of *Salmonella* infection based on blue silica nanoparticles. Anal Chim Acta. 2015; 898: 109-115.
 10. Piriya VSA, Joseph P, Daniel K, Lakshmanan S, Kinoshita T, Muthusamy S. Colorimetric sensors for rapid detection of various analytes. Materials Sci Eng. 2017; 78: 1231-1245.
 11. Koźlecki T. Improved synthesis of nanosized silica in water-in-oil microemulsions. J Nanoparticles. 2016; 3(2): 205.
 12. Zhu C, Zhao G, Dou W. A new synthesis method for bright monodispersed core-shell colored silica submicron particles. J Sol Gel Sci Tech. 2018; 85(1): 76-83.
 13. Mohapatra M, Anand S. Synthesis and applications of nano-structured iron oxides/hydroxides, a review. Int J Eng Sci Tech. 2010; 2(8): 268-275.
 14. Wei Y. Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and their magnetic properties. Procedia Eng J. 2012; 27: 632-637.
 15. Bagwe RP. Optimization of dye-doped silica nanoparticles prepared using a reverse microemulsion method. Langmuir. 2004; 20(19): 8336-8342.
 16. Amini B. Fluorescence bio-barcode DNA assay based on gold and magnetic nanoparticles for detection of Exotoxin A gene sequence. Biosens Bioelectron. 2017; 92: 679-686.
 17. Yu H, Zhao G, Dou W. Simultaneous detection of pathogenic bacteria using agglutination test based on colored silica nanoparticles. CurrPharm Biotechnol. 2015; 16(8): 716-723.
 18. Siadat SD. Preparation and evaluation of a new lipopolysaccharide-based conjugate as a vaccine candidate for brucellosis. Osong Public Health Res Perspectives. 2015; 6(1): 9-13.
 19. Shams N, Jaidari A, Etemadfar L. Molecular detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in raw and unpasteurized bulk cow milk tanks of traditional domestic dairy sale centers in Khorramabad. Iranian J Med Microbiol. 2017; 11(4): 13-20.
 20. Azizi F, Hatami H, Janghorbani M. Epidemiology and control of common diseases in Iran. Tehran: Eshtiagh Publications. 2000; 602-616.
 21. Alavi SM. Brucellosis risk factors in the southwestern province of Khuzestan, Iran. Int J Enteric Pathog. 2014; 2(1): 1-4.
 22. Roushan MRH, Ebrahimpour S. Human brucellosis: An overview. Caspian J Med. 2015; 6(1): 46.
 23. Šiširak M, Hukić M, Knežević Z. Evaluation of some diagnostic methods for the brucellosis in humans-a five-year study. Prilozi. 2010; 31(1): 91-101.

24. Arjmadzadegan M. molecular diagnosis of brucellosis causing bacteria isolated from patients with brucellosis with the help of TRPE and OMP25 by PCR. *Daneshvar J.* 2014; 21(110): 1-7.
25. Pakzad I. Diagnosis of human brucellosis by PCR using L7/L12 and *I6srRNA* genes compared with common serological tests. *Arak Med uni J.* 2012; 14(6): 31-39.
26. Yu W L, Nielsen K. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *Croatian Med J.* 2010; 51(4): 306-313.
27. Mofrad F.A. Evaluation of the sensitivity of the PCR technique in detecting genes omp31, omp25 and bcp31 in patients with brucellosis. *Iranian J Med Microbiol.* 2016; 10(4): 63-68.
28. Zowghi E, Bagheri Nejad R. Historical process of taxonomy of genus *Brucella*: A review. *Iranian J Med Microbiol.* 2015; 9(2): 1-19.
29. Matrone M. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. *Braz J Microbiol.* 2009; 40(3): 480-489.
30. Thorat V. Isolation, identification and molecular detection of *Brucella abortus* from cattle and buffalo. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2017; 6(10): 2853-2864.
31. Hajia M, Jazi FM. Looking again at the diagnosis of brucellosis difficulties in Iran. *Iranian J Med Microbiol.* 2018; 12: 68-77.
32. Londhe S, Bannaliker A, Dighe V. Detection of *Brucella abortus* in buffalo blood and milk by IS711 PCR assay. *J V Public Health.* 2010; 8(2): 95-98.
33. Liu Y. Colorimetric immunoassay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microchim Acta.* 2017; 184(12): 4785-4792.
34. Song D. A rapid detection method of *Brucella* with quantum dots and magnetic beads conjugated with different polyclonal antibodies. *Nanoscale Res Lett.* 2017; 12(1): 179.
35. Hemadi A. Bioconjugated fluorescent silica nanoparticles for the rapid detection of *Entamoeba histolytica*. *Acta Trop.* 2015; 145: 26-30.
36. Sattarahmady N, Kayani Z, Heli H. Highly simple and visual colorimetric detection of *Brucella melitensis* genomic DNA in clinical samples based on gold nanoparticles. *Iranian J Chem Soc.* 2015; 12(9): 1569-1576.



Comparison of the sensitivity of colored silica nanoparticle-based immunosensor with culture and PCR methods in detection of *Brucella abortus*

Arash Shams¹, Bahareh Rahimian Zarif², Mojtaba Salouti³, Reza Shapouri⁴, Sako mirzaii⁵

¹Ph.D. student, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Faculty of Science, Department of Biochemistry. ²Assistant Professor, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Faculty of Science, Department of Microbiology. ³Professor, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Faculty of Science, Biological Research Center. ⁴Assistant Professor, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Faculty of Science, Department of Microbiology. ⁵Assistant Professor, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Faculty of Science, Department of Biochemistry.

Abstract

Background & Objectives: Brucellosis has always been a threat to the health and economy of the community. The limitations of human and animal disease detection methods justify the need for new diagnostic methods. This study was aimed to compare the sensitivity of colorimetric strategy based-immunosensors in the diagnosis of *Brucella abortus* with those of culturing and PCR methods.

Materials & Methods: The colored silica nanoparticles and paramagnetic nanoparticles after synthesis were conjugated with polyclonal antibody to form EDC/NHS complexes to form probe sequences, respectively. These probes were collected after being added to serial dilutions of *B. abortus* and completing the reaction. Then, with releasing organic dye from the silica structure, absorbance intensity was measured at 670 nm. On the other hand, at the time of each dilution, the corresponding chromosomal DNA was extracted by a DNA extraction kit and used for PCR analysis. The results of all three tests were ultimately compared.

Results: Based on the results, the detection range of the immunosensor and culture was the same and equal to 1.5×10^3 - 1.5×10^8 CFU mL⁻¹. But, the limit of detection for immunosensor and culture was measured as 450 CFU mL⁻¹ and 400 CFU mL⁻¹, respectively. The results of the PCR test exhibited a wide dynamic range of 1.5×10^4 to 1.5×10^8 CFU mL⁻¹, with LOD of 5000 CFU mL⁻¹.

Conclusion: Comparing the results of this study showed that the proposed immunosensor is capable of replacing conventional *B. abortus* detection methods and can be considered as an on-site diagnostic tool, with high sensitivity.

Keywords: *Brucella abortus*, Immunosensor, Colored silica, Culture, PCR.

Correspondence to: Mojtaba Salouti

Tel: +98 2433421001

E-mail: saloutim@yahoo.com

Journal of Microbial World 2019, 12(3): 229-238.



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.