ORIGINAL ARTICLE

# *Studying the Polymorphism in the Gene Encoding Interleukin-17 [rs4711998 (A/G)] with PCR-RFLP in Patients with Brucellosis Compared with Healthy Subjects: A Case-Control Study*

Hamed Farhadi Kohan[1],
Fariba Keramat[2,3],
Hassan Mahmoudi[4],
Alireza Zamani[5],
Massoud Saidijam[6],
Mohammad Ebrahim Ghaffari[7],
Sima Kazemi[4],
Mohammad Yousef Alikhani[2,8]

[1] MSc in Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
[2] Brucellosis Research Center, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
[3] Professor, Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
[4] PhD Candidate in Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
[5] Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
[6] Professor, Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
[7] PhD Candidate in Biostatistics, Faculty of Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
[8] Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

(Received December 3, 2016 Accepted July 10, 2017)

## *Abstract*

**Background and purpose:** Brucellosis is a systemic infection caused by gram-negative coccobacilli and facultative intracellular bacteria of the genus Brucella. Interleukin-17 is one of the important cytokines that plays a role in controlling host immune response in patients with brucellosis. The aim of this study was to investigate polymorphism of the genes encoding IL-17 in patients with brucellosis compared to healthy subjects.

**Materials and methods:** This case-control study included 86 patients with brucellosis who were selected based on clinical symptoms, serology, culture and PCR results. The control group composed of 86 healthy people. The polymorphism gene encoding Interleukin-17 was evaluated in both groups by PCR-RELP method.

**Results:** Current study showed that the frequencies of AA [OR=0.047 (95%CI: 0.01-0.12)] and GG [OR=337.20 (95%CI: 20.49-5541.39] were significant at position -1998 (G/A) in both cases and controls [P-values (AA) and (GG) = 0.001]. But, the frequency of AA genotypes in the control group was greater than the frequency of GG genotype in patients. The odds ratio for catching brucellosis in people who have genotype GG was 41 times higher than those who have genotype AA.

**Conclusion:** Findings showed that, AA and AG genotypes at -1998 (A/G) position are more important. So, the risk of brucellosis in people with GG genotype at position -1998 was higher than that in people with AA genotype. In other words, people with AA genotype are more protected against brucellosis at this position.

***Keywords:*** Interleukin-17, cytokines, brucellosis, polymorphism

**J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (155): 16- 26 (Persian).**

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۵ آذر سال ۱۳۹۶ (۲۶-۱۶)

# بررسی پلی مورفیسم ژن کد کننده اینترلوکین ۱۷ در موقعیت rs4711998 (A/G) به روش PCR-RFLP در بیماران مبتلا به بروسلوزیس در مقایسه با افراد سالم: مطالعه موردی - شاهدی

حامد فرهادی کهن[۱]
فریبا کرامت[۲و۳]
حسن محمودی[۴]
علیرضا زمانی[۵]
مسعود سعیدی جم[۶]
محمد ابراهیم غفاری[۷]
سیما کاظمی[۴]
محمدیوسف علیخانی[۲و۸]

## چکیده

**سابقه و هدف:** بروسلوز یک عفونت سیستمیک است که توسط کوکوباسیل‌های گرم منفی به نام بروسلا ایجاد می‌گردد.IL-۱۷ از سیتوکاین‌های مهمی است که در کنترل پاسخ ایمنی میزبان نسبت به بروسلوزیس نقش دارد. هدف از این مطالعه، بررسی پلی‌مورفیسم ژن کدکننده‌ی IL-۱۷ در بیماران مبتلا به بروسلوز در مقایسه با افراد سالم می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد – شاهدی، تعداد ۸۶ نفر از افراد مبتلا به بروسلوز به عنوان گروه بیمار، براساس علائم بالینی، وارد مطالعه شدند که توسط روش‌های سرولوژی، کشت و PCR، ابتلاء به بروسلوز آنها تائید گردید. تعداد ۸۶ نفر از افراد سالم به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. سپس برای هر دو گروه، پلی مورفیسم ژن کدکننده‌ی اینترلوکین ۱۷ به روش PCR-RFLP مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های (۰/۰۱-۰/۱۲ :CI%) AA (OR= ۰/۰۴۷ و (۵۵۴۱/۳۹-۲۰/۴۹ :CI٪۹۵) GG(OR = ۳۳۷/۲۰ در موقعیت G/A ۱۹۹۸- در دو گروه مورد - شاهد (P-value (GG)=۰/۰۰۱) (P-value ۰/۰۰۱) (AA)= معنی‌دار می‌باشند؛ به طوری که فراوانی ژنوتیپ AA در گروه شاهد بیش‌تر از گروه بیمار بود، در صورتی که فراوانی ژنوتیپ GG در گروه بیمار بیش‌تر از گروه شاهد است. نسبت شانس ابتلا به بروسلوز در افرادی که ژنوتیپ GG دارند، نسبت به افرادی که ژنوتیپ AA دارند، ۴۱ برابر بیش‌تر است.

**استنتاج:** ژنوتیپ های AA و AG در موقعیت A/G۱۹۹۸- از اهمیّت بالاتری برخوردار می‌باشند. به طوری‌که شانس ابتلا به بروسلوز در افرادی که دارای ژنوتیپ GG در نقطه (-۱۹۹۸)، هستند ۴۱ برابر نسبت به افرادی که ژنوتیپ AA (-۱۹۹۸) دارند بیش‌تر است، به عبارتی دیگر ژنوتیپ AA در برابر ابتلا به این بیماری در نقاط (-۱۹۹۸) محافظت کننده می‌باشد.

**واژه های کلیدی:** اینترلوکین ۱۷، سایتوکاین، بروسلوزیس، پلی مورفیسم

## مقدمه

بروسلوزیس بیماری است که توسط جنس‌های بروسلا ایجاد می‌شود. این بیماری از طریق راه‌های متفاوتی از جمله مصرف شیر و محصولات لبنی آلوده، تماس با محصولات لقاح و گاهی اوقات از طریق بلع گوشت حیوانات عفونی آلوده منتقل می‌شود(۱،۳). در مورد بروسلوزیس، چنین به نظر می‌رسد که تعادل بین

**مولف مسئول: محمد یوسف علیخانی**– همدان، خیابان شهید فهمیده، روبه‌روی پارک مردم، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی پزشکی Email: alikhani43@yahoo.com
۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲. مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۳. استاد، گروه بیماری های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۴. دانشجوی دکتری باکتری شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۵. استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۶. استاد، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۷. دانشجوی دکتری آمار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۸. استاد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۹/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۳/۲۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۴/۱۹

سایتوکاین‌های Th1 و Th2 می‌تواند باعث یک مقاومت یا استعداد ابتلا به عفونت بروسلا شود، به طوری‌که در این رابطه، سایتوکاین‌های Th1 باعث القای مقاومت می‌شوند، در حالی‌که سایتوکاین‌های Th2 ، بروسلوزیس را مستعد می‌کند. هم‌چنین مشخص شده که IL-17 برای القای IFN-ɣ و IL-12 از ماکروفاژها و سلول‌های دندریک ضروری است. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که IL-17 می‌تواند بر روی القای ایمنی Th1 که برای کنترل بروسلا ضروری است، تاثیر بگذارد. ژن IL-17 بر روی کروموزوم p12.1 6 قرار گرفته است. هم‌چنین single-nucleotide polymorphism برای این ژن شناسایی شده است(۷). در ابتدا تصور می‌شد که IL-17 به طورکلی توسط Tcells ترشح می‌شود، اما امروزه مشخص شده است که به وسیله برخی از سلول‌های ذاتی شامل ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک و NK, NKT و ∂Tɣ تولید می‌شود(۸،۹). کلید پیشرفت در مورد IL-17 در بروسلوزیس تشخیص این موضوع است که IL-17 جمعیتی از Tcell $CD^{+}_{۴}$ را به وجود می‌آورد که از Th کلاسیک تیپ ۱ و ۲ به طور مجزا و قابل تشخیص است(۸،۱۰). پلی مورفیسم ژن‌ها در میزان و سطح تولید سایتوکاین‌های مشخصی تاثیر می‌گذارد که ممکن است عوامل تعیین‌کننده مهم خطر، شدت یا محافظت برای برخی از بیماری‌های عفونی باشد(۱۱،۱۲). در دهه اخیر، پلی مورفیسم ژنی موضوع بسیاری از تحقیقات و مباحث در زمینه پژوهش بوده است، به طوری‌که در بسیاری از این تحقیقات، ارتباط پلی‌مورفیسم ژنی با موارد بروز بیماری و عفونت‌ها تائید شده است. پلی‌مورفیسم ژنی اینترلوکین ۱۷ در بسیاری از تحقیقات مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج به دست آمده، ارتباط این پلی‌مورفیسم ژنی را با افزایش بروز عفونت تائید می‌کند. با پژوهش‌های به عمل آمده در زمینه چندشکلی بودن و پلی‌مورفیسم ژنی و با توجه به اطلاعات ثبت شده در پایگاه اطلاعات و مقالات مختلف، اینترلوکین ۱۷ در ۹ لوکوس از ژن خود می‌تواند دارای پلی‌مورفیسم ژنی باشد. در ارتباط با عفونت‌های متعددی، پلی‌مورفیسم این اینترلوکین‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند و ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم این اینترلوکین‌ها و سطح سرمی آن‌ها در افراد مبتلا نسبت به افراد کنترل مشاهده شده است(۱۳). با توجه به اهمیت IL-17 در محافظت علیه بروسلوزیس، مطالعه پلی‌مورفیسم ژنی این سایتوکاین در بیماران مبتلا به بروسلا در مقایسه با آن‌هایی که مبتلا نبوده و گروه کنترل می‌باشند، اهمیت به سزایی دارد.

## مواد و روش ها

*گروه‌های مورد مطالعه*

در این مطالعه موردی – شاهدی، که در بازه زمانی دو ساله (۱۳۹۵-۱۳۹۳) در دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام شد، ۸۶ نفر از افراد مبتلا به بروسلوز به عنوان گروه مورد انتخاب شدند که توسط پزشک متخصص عفونی و بر اساس علائم بالینی ( arthralgia, fever sweating, malaise, hepatomegaly, splenomegaly, focal complication) به آزمایشگاه بیمارستان فرشچیان دانشگاه علوم پزشکی همدان مراجعه کردند. ۸۶ نفر از افراد سالم به عنوان گروه کنترل به طور تصادفی از مراجعین بیمارستانی و غیر مبتلا به بروسلوز که دارای علائم بالینی نبودند و به دلیل دیگری به بیمارستان مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. هم‌چنین متغیرهای همراه و زمینه‌ای تاثیر گذار قبل از انجام مطالعه در گروه مورد و شاهد همسان‌سازی شدند.

*جمع‌آوری نمونه مبتلا به برسلوز*

ابتلا گروه مورد به بروسلوز توسط روش‌های سرولوژی و کشت تائید شد. در روش سرولوژی با استفاده از سرم بیمار، آزمایش رایت استاندارد لوله‌ای، ۲-مرکاپتواتانول و کومبس- رایت انجام شد. برای انجام کشت، مقدار ۱۰ سی سی خون بیمار در شرایط استریل بلافاصله به محیط کشت مخصوص BACTEC تلقیح و

محیط کشت به مدت ۳۰ روز در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به فاصله‌ی زمانی هر ۷ روز یکبار از محیط کشت بر روی محیط بروسلا آگار حاوی خون تازه گوسفندی کشت داده شد. برای تشخیص این باکتری بر روی کلنی‌های رشد یافته، آزمون‌های کاتالاز، اوره آز و اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم انجام گرفت(۱۰).

*شناسایی ژن BCSP31 برای تایید بروسلوزیس با روش PCR*

در نمونه‌های بالینی، برای ردیابی DNA بروسلا و جهت تشخیص ژن BCSP۳۱ توسط آزمایش PCR از پرایمرهای Forwar P: TGGCTCGGTTGCCAATATCAA، Reverse P: CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG استفاده شد. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Cinnagene-Iran انجام شد. این پرایمرها به طور اختصاصی موجب تکثیر یک قطعه ۲۲۳ جفت بازی از یک ژن محافظت شده می‌شوند. شرایط ترموسایکلر به این صورت از مرحله دناتوراسیون ابتدایی، ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد یک سیکل و سپس ۳۵ سیکل شامل مراحل دناتوراسیون، ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد مرحله اتصال پرایمر، ۵۰ ثانیه در دمای ۵۹–۵۳ درجه سانتی‌گراد مرحله تکثیر، ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. مرحله تکثیر نهایی، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. این ژن یک پروتئین غشائی ۳۱ کیلودالتونی بروسلا آبورتوس را رمزدهی می‌کند و اختصاصی جنس بروسلا بوده و در تمام سویه‌ها و بیوواریان‌های بروسلا وجود دارد(۱۱).

*تکثیر ناحیه ژنی IL-17*

تکثیر قسمت‌های از ژنIL-۱۷ که حاوی پلی مرفیسم(A/G) rs ۴۷۱۱۹۹۸ می‌باشد، با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی جدول شماره ۱ به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) تکثیر یافت. شرایط ترموسایکلر پس از بهینه‌سازی عبارت بود از مرحله دناتوراسیون ابتدایی، ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد یک سیکل و سپس ۲۵ سیکل شامل مراحل دناتوراسیون، ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد مرحله اتصال پرایمر، ۵۰ ثانیه در دمای ۵۹، درجه سانتی‌گراد مرحله تکثیر و ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. مرحله تکثیر نهایی، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد(۱۲).

*تعیین ژنوتیپ IL-17*

به منظور انجام پلی‌مورفیسم ژن کدکننده‌ی IL-۱۷ به روش PCR-RFLP، ابتدا PCR برای هر دو گروه بیمار و شاهد انجام گردید و پس از اطمینان از وجود باند بر روی ژل الکتروفورز برای دستیابی به باندهای حاصل از برش، از آنزیم‌های TaqI (فرمنتاس – آلمان) استفاده شد. به این ترتیب که مقدار ۱۰µl از محصول PCR به همراه U۱۰ آنزیم را در داخل یک میکروتیوپ ریخته (حجم نهایی ۲۰µl) و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید (۱۳). در نهایت، محصولات هضم شده در ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز گردیده و توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد(۱۴). سپس ژل‌ها در زیر دستگاه UV ترانس لومینیتور (SYNGENE, USA) مورد مطالعه قرار گرفتند.

**جدول شماره ۱:** پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص نقطه rs4711998(A/G)

| IL-17snp | | PCR primers | Restrictionenzymes | Fragment sizes( bp) | Referance |
|---|---|---|---|---|---|
| rs4711998(A/G) | R | GTTAAAGGCATGTTCCAACC | TaqI | A:322<br>G:236+86 | (۱۲) |
| | F | AGAAGGGTGACATATAGCCA | | | |

*آنالیز آماری*

در این مطالعه به منظور تعیین عوامل موثر بر بیماری بروسلوز و محدودیت آزمون chi squre در اختلاف معنی‌داری بین توزیع ژنوتیپ‌ها اقدام به محاسبه‌ی نسبت شانس (OR) با فاصله‌ی اطمینان (CI) ۹۵درصد بین دو گروه بیمار و شاهد، انجام گردید. تمامی آنالیزهای آماری توسط نرم افزار (Stata 11.2) انجام گردید.

## یافته ها

مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی و بررسی پلی‌مورفیسم ژن کدکننده IL-17 در موقعیّت (A/G) rs ۴۷۱۱۹۹۸ در بیماران مبتلا به بروسلوز و افراد سالم در بازه زمانی دو ساله (۱۳۹۵-۱۳۹۳) با جمع‌آوری اطلاعات ۸۶ نفر بیمار به عنوان گروه مورد و ۸۶ نفر کنترل به عنوان گروه شاهد صورت پذیرفت.

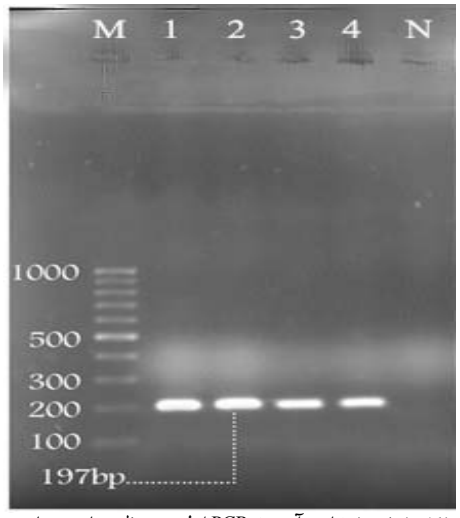
در این مطالعه، میانگین و انحراف معیار سنی گروه مورد ۱۶/۰۶± ۴۳/۶۵ سال و میانگین سنی گروه شاهد ۸±/۶۵ ۳۶/۴۷ سال می‌باشد. نتایج متغیرهای دموگرافیک جنس، شغل، محل سکونت، سابقه‌ی ابتلا به بروسلوز، سابقه‌ی درمان، طبق جدول شماره ۲ به دست آمده است.

**جدول شماره ۲:** فراوانی بر حسب متغیرهای دموگرافیک در دو گروه بیمار و شاهد

| متغیر | | بیمار(٪) | شاهد (٪) | سطح معنی داری |
|---|---|---|---|---|
| جنس | مذکر | ۶۳ (۷۳/۳) | ۸۳(۹۶/۵) | |
| | مونث | ۲۳ (۲۶/۷) | ۳ (۳/۵) | |
| شغل | دامدار-کشاورز | ۵۰ (۵۸/۱) | ۱۳(۱۵/۱) | |
| | قصاب | ۳(۳/۴) | ۰ | |
| | آزاد | ۱۱(۱۲/۷) | ۷۰(۸۱/۴) | |
| | خانه دار | ۲۲(۲۵/۵) | ۳(۳/۵) | |
| محل سکونت | شهری | - | ۵۲(۶۰/۴) | |
| | روستایی | ۸۶(۱۰۰) | ۳۴(۳۹/۶) | |
| سابقه ی ابتلا به بروسلوز | دارد | ۲۲(۲۵/۵) | - | P<0.001 |
| | ندارد | ۶۴(۷۴/۵) | ۸۶(۱۰۰) | |
| سابقه ی درمان بروسلوز | دارد | ۲۰(۲۳/۳) | - | |
| | ندارد | ۶۶(۷۶/۷) | ۸۶(۱۰۰) | |

*نتایج PCR ژن ۳۱ BCSP*

به منظور بررسی وجود باکتری بروسلا در نمونه‌های خون بیماران مبتلا به بروسلوز از ژن ۳۱ BCSP استفاده گردید. در نمونه خون افراد مبتلا به بروسلوز این ژن حضور داشت(شکل شماره ۱).

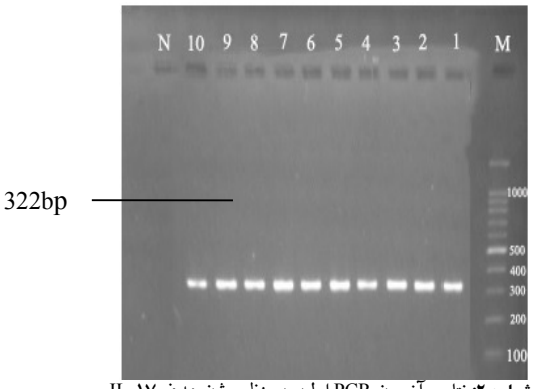



**شکل شماره ۱:** نتایج آزمون PCR اولیه به منظور تایید بیماری بروسلوزیس

ستون M: مارکر ۱۰۰ bp؛ ستون ۱: کنترل مثبت (از سویه‌های تائید شده‌ی مطالعات گذشته)؛ ستون ۲، ۳ و ۴ نمونه‌های مربوطه؛ ستون N: کنترل منفی. طول محصول PCR ژن ۳۱ BCSP، ۱۹۷ جفت باز می‌باشد.

نتایج PCR اولیهIL-۱۷

به منظور انجام آزمون PCR-RFLP برای ژن کدکننده‌ی IL-۱۷ در موقعیت (A/G) rs۴۷۱۱۹۹۸ ابتدا PCR برای هر دو گروه بیمار و شاهد انجام گردید(شکل شماره ۲).



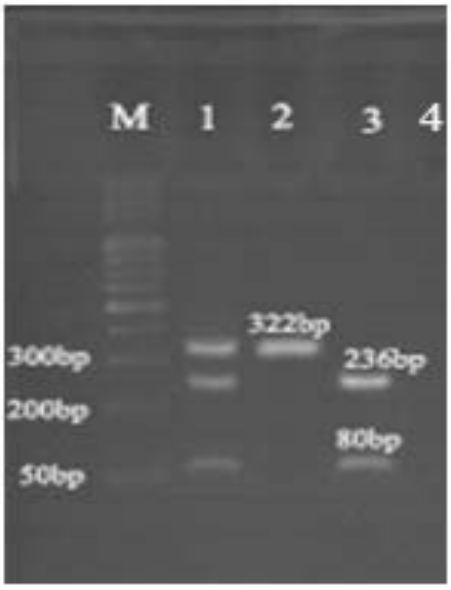

**شکل شماره ۲:** نتایج آزمون PCR اولیه به منظور ژن هدفIL-۱۷

ستون :M مارکر۱۰۰جفت باز ؛ ستون ۱ تا ۱۰: نمونه‌های مربوطه؛ ستون :N کنترل منفی) کلیه‌ی

محتویات مستر میکس به غیر از) .(Template طول محصول PCR ، ۳۲۲ جفت باز می‌باشد).

*نتایج PCR-RFLP ژن کدکننده‌ی IL-۱۷ (A/G) rs۴۷۱۱۹۹۸*

در موقعیت (A/G) ۴۷۱۱۹۹۸ rs IL-۱۷ جهت بررسی معنی‌دار بودن بین ژنوتیپ‌ها در گروه‌های بیمار/شاهد اقدام به انجام آزمون chi-square و Fisher گردید. نتایج آزمون نشان می‌دهد ارتباط معنی‌داری بین دو گروه وجود دارد. P-value(GG)= ۰/۰۰۱ ، P-value (AG)= ۰/۱۰۴ ، P-value (AA)= ۰/۰۰۱. هم‌چنین با در نظر گرفتن عوامل موثر بر این بیماری و محدودیت آزمون chi-square در اختلاف معنی‌دار بین توزیع ژنوتیپ‌ها نسبت شانس (Odds Ratio) (OR) با فاصله‌ی اطمینان ۹۵٪ برای این موقعیت نیز انجام گردید. جدول شماره ۲ نسبت شانس برای ژنوتیپ‌های موقعیت rs۴۷۱۱۹۹۸ (A/G) به شرح زیر می‌باشد: (A/G) rs۴۷۱۱۹۹۸ ) در شکل شماره ۳ نشان داده شده است.




**شکل شماره ۳:** نتایج آزمون PCR-RFLP به منظور ژن هدف rs۴۷۱۱۹۹۸ (A/G)

ستون M: مارکر bp ۵۰؛ ستون ۱: دارای ۳ قطعه‌ی ۳۲۲، ۲۳۶ و bp ۸۶ می‌باشد که ژنوتیپ این فرد AG می‌باشد، ستون ۲: دارای باند bp ۳۲۲ که ژنوتیپ این فرد AA می‌باشد، ستون ۳: دارای قطعات ۲۳۶ و ۸۶ جفت باز می‌باشد که ژنوتیپ فرد GG است و ستون ۴: کنترل منفی (کلیه‌ی محتویات مستر میکس به غیر از Template). (لازم به ذکر است که تعیین ژنوتیپ افراد طبق الگویی که در مقاله ذکر شده است، تعیین گردید.)

**جدول شماره ۳:** فراوانی و درصد ژنوتیپ های GG,AA,AG در موقعیت rs4711998 (A/G)

| ژنوتیپ های IL-17(174G/C) | گروه بیمار (%) (Patient Group) | گروه شاهد (%) (Control group) | سطح معنی داری (P-value) | OR(٪۹۵CI) |
|---|---|---|---|---|
| GG | ۵۷(۶۶/۳) | ۰(۰.۰) | ۰.۰۰۱ | ۳۳۷.۲۰(۲۰.۴۹-۵۵۴۱.۳۹) |
| AA | ۶(۷) | ۵۳(۶۱.۶) | ۰.۰۰۱ | ۰.۰۴۷(۰.۰۱-۰.۱۲) |
| AG | ۲۳(۲۶/۷) | ۳۳(۳۸.۴) | ۰.۱۰۴ | ۰.۵۹(۰.۲۹-۱.۱۷) |

جهت بررسی اختلاف معنی‌دار توزیع دو آلل A و G در موقعیت rs۴۷۱۱۹۹۸ (A/G) در گروه‌های بیمار/شاهد مانند ژنوتیپ‌ها اقدام به انجام آزمون chi-square و OR (Odds Ratio) گردید. با توجه به نتایج آزمون آماری داده‌های موجود، ارتباط معناداری بین وجود هریک از آلل‌های A و G و احتمال ابتلا به بیماری بروسلوز را نشان می‌دهند (P-value=۱) (OR= ۱) (جدول شماره ۴).

**جدول شماره ٤:** فراوانی و درصد آلل‌های G و A در موقعیت rs۴۷۱۱۹۹۸ (A/G)

| آلل های IL-۱۷ rs۴۷۱۱۹۹۸ (A/G) | گروه بیمار (%) (Patient Group) | گروه شاهد (%) Control ) (group | سطح معنی داری (P-value) | OR(٪۹۵CI) |
|---|---|---|---|---|
| G | ۱۳۷ | ۳۳ | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۶ (۰/۰۳۴-۰/۱۰۶) |

## بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ‌های AA (OR= ۰/۰۴۷ (%CI: ۰/۰۱ -۰/۱۲) و (۵۵۴۱/۳۹- GG(OR = ۳۳۷/۲۰ (۹۵٪CI:۲۰/۴۹ در موقعیت ۱۹۹۸ G/A در دو گروه مورد - شاهد (P-۰/۰۰۱) value (GG)= (P-value (AA)=۰/۰۰۱) معنی‌دار می‌باشند. به طوری که فراوانی ژنوتیپ AA درگروه شاهد بیش‌تر از گروه بیمار بود، در صورتی که فراوانی ژنوتیپ GG در گروه بیمار بیش‌تر از گروه شاهد است. نسبت شانس ابتلا به بروسلوز در افرادی که ژنوتیپ GG دارند، نسبت به افرادی که ژنوتیپ AA دارند، ۴۱ برابر بیش‌تر است.

گرچه احتمال ابتلاء به بروسلوز در تمام طول سال وجود دارد، اما اوج بیماری بروسلوز در فصل بهار و تابستان است. همان طور که انتظار می رفت، در این مطالعه نیز این رابطه تایید شد، به طوری‌که بیش از ۹۰ درصد از کل نمونه‌های مثبت در دو فصل بهار و تابستان بود که کاملا" با سایر مطالعات مشابه مطابقت دارد(۱۹، ۱۴).

در مطالعه حاضر، تمام موارد کشت مثبت در طی هفته اوّل توسط دستگاه BACTEC مثبت اعلام شد و پس از Subculture باکتری بر روی محیط‌های جامد باکتری بروسلا جداسازی گردید. از ویال‌های کشت منفی اعلام شده توسط دستگاه BACTEC بعد از انجام Subcultureحتی بعد از هفته چهارم نیز هیچگونه باکتری بر روی محیط‌های جامد جداسازی نشد و در واقع حساسیت دستگاه BACTEC برای جداسازی بروسلا ۱۰۰ درصد بود، به همین دلیل، استفاده از دستگاه BACTEC 9050 را برای جداسازی و تشخیص بروسلا توصیه می‌نماییم.

روش PCR یک روش سریع و اختصاصی در تشخیص بروسلوز می‌باشد. روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز که در دهۀ اخیر گسترش قابل توجهی یافته است، از جمله روش‌هایی است که دارای مزایای بسیاری بوده و تا حدودی محدودیت‌های موجود در کشت را برطرف می‌کند. با استفاده از این روش در کم‌تر از یک روز می‌توان عامل بیماری‌زا را مشخص کرد. ویژگی و حساسیت بالای روش PCR می‌تواند به ابزار با ارزشی برای تشخیص بروسلوز به کار رود. قدرت و قابلیت تکرار در زمان‌ها و مراکز مختلف، سادگی و سرعت قابل انجام و از همه مهم‌تر عدم واکنش متقاطع با باکتری‌های منصوب و قدرت تشخیص عامل عفونی در نمونه‌های مختلف مرضی و محیطی، به ویژه در موارد عود مجدد بیماری، کم خطر بودن برای پرسنل آزمایشگاه و نیاز به حداقل داشتن نمونه از جمله مزیت‌های این روش می‌باشد. البته مهم‌ترین محدودیت آن حساسیت بالای PCR است که بایستی مراقبت شدید به ویژه از نظر آلودگی نمونه‌ها به عمل آید(۲۰). در این مطالعه، از ژن BCSPI ۳۱ برای اثبات وجود باکتری بروسلا استفاده گردید. در این تحقیق حساسیت PCR را با توجه به ژن مخصوص بروسلا و انتخاب پرایمرهای مناسب ۱۰۰ درصد یافتیم. مقاومت علیه گونه‌های بروسلا بستگی به پاسخ مناسب سلول T و تولید سایتوکاین‌های اینترفرون گاما (IFN-□) و IL -۱۲) دارد(۲۲، ۲۱). در واقع محافظت میزبان در برابر باکتری بروسلا به طور اولیه توسط پاسخ‌های ایمنی Th۱ ایجاد می‌گردد. سلول‌های Th1 که سایتوکاین اینترفرون گاما را ترشح می‌کنند، واسطه‌ی برقراری ایمنی سلولی هستند. در حالی که سلول‌های Th۲ سایتوکاین‌های IL- ۴ و ۱۰ را ترشح نموده و شرایط را جهت ابتلا به بروسلوز مستعد می‌کنند(۲۴، ۲۳). چندین جایگاه پلی مورفیک در ناحیه ژن کدکننده‌ی IL -۱۷ دیده شده که شامل ۱۹۹۸-، ۳۰۳۶-، ۹۰۲۴-، ۵۹۱۳-، ۹۰۲۵-، ۳۰۳۸-، ۴۵۱۳-، ۴۲۲۶- و ۸۰۶۷- می‌باشد (۱۰، ۲۵، ۲۶). در این مطالعه، نقطه ۱۹۹۸- مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که توزیع ژنوتیپ‌های AA و GG در موقعیت G/A ۱۹۹۸- در دو گروه مورد - شاهد (P-value (GG)=۰/۰۰۱) (P-value ۰/۰۰۱)

=(AA) معنی‌دار می‌باشند به طوری‌که فراوانی ژنوتیپ AA در گروه شاهد بیش‌تر از گروه بیمار می‌باشد، اما فراوانی ژنوتیپ GG در گروه بیمار بیش‌تر از گروه شاهد است. نسبت شانس ابتلا به بروسلوز در افرادی که ژنوتیپ GG دارند، نسبت به افرادی که ژنوتیپ AA دارند، ۳۳۷ برابر بیش‌تر است. (۰/۰۱-۰/۱۲ :CI%) AA (OR= ۰/۰۴۷ و (۹۵٪CI:۲۰/۴۹-۵۵۴۱/۳۹) GG(OR = ۳۳۷/۲۰ . پلی‌مورفیسم ژن کدکننده‌ی IL-۱۷ در بیماران مبتلا به بروسلوز فقط در جمعیت ایرانی در شیراز مورد بررسی قرار گرفته است. رسولی و همکاران در ایران نشان دادند که توزیع ژنوتیپ‌های ژنIL-۱۷در موقعیت‌های -۱۹۹۸(A/G) به طور حائز اهمیتی در بیماران بیش‌تر از کنترل بوده است. نتایج مطالعه‌ی ما با مطالعه‌ی رسولی در توزیع هیچ یک از ژنوتیپ در موقعیت -۱۹۹۸(A/G) مشابه نیست. در مطالعه رسولی، محققین نتیجه گرفتند که ژنوتیپ‌های مختلف این سایتوکاین در استعداد ابتلا به بروسلوز، محافظت یا گسترش آن، تاثیری دارد(۱۶). در این مطالعه، در موقعیت -۱۹۹۸ (A/G) بین دو ژنوتیپ AA, و GG و هم‌چنین آلل‌های A و G در همین موقعیت، بین دو گروه بیمار و شاهد اختلاف قابل ملاحظه‌ای مشاهده گردید. در مطالعاتی که در سال ۱۹۹۹ توسط Grainger DJ و همکاران انجام شد، اعلام داشتند که پلی‌مورفیسم ژنی بر روی سطح تولید سایتوکاین‌های مشخصی تاثیر می‌گذارد که ممکن است به عنوان یک شاخصه مهم از خطر، شدت یا محافظت در برابر برخی از بیماری‌های عفونی باشد(۱۲). اما با توجه به این که پلی‌مورفیسم ژن کدکننده‌IL-۱۷ در موقعیت (A/G) rs۴۷۱۱۹۹۸ در نواحی اگزونی می‌باشند، اختلاف بین دو گروه شاهد و بیمار از نظر عملکرد این سایتوکاین خواهد بود. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ بر روی ۷۶۰ نفر در دو گروه کنترل (۳۸۰ نفر) و گروه بیمار (۳۸۰ نفر) در چین انجام شد، وجود ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن کد کننده IL-۱۷ و میزان ابتلا به سرطان مری توسط J. Yin و همکارانش مشخص شد(۲۷). این مطالعه می‌تواند اهمیّت پلی‌مورفیسم‌های در این اینترلوکین را نشان دهد. تفاوت‌های مشاهده شده بین نتایج ما و دیگر مطالعات ممکن است مربوط به تفاوت‌های نژادی باشد، به طوری که گروه‌های مورد مطالعه‌ی ما از جمعیت ایرانی که در غرب کشور زندگی می‌کنند، انتخاب شدند در حالی‌که افراد مورد بررسی در مطالعات دیگر از جمعیت‌های ایرانی که در جنوب کشور بودند، انتخاب شدند. علاوه بر این نحوه‌ی انتخاب گروه شاهد و هم‌چنین اختلاف در تعداد نمونه‌های گروه بیمار و شاهد می‌توانند در ایجاد اختلافات نقش مهمی را داشته باشد. به طور مثال در مطالعه‌ی رسولی، گروه کنترل به طور تصادفی از میان دامداران سالمی انتخاب شده بودند که تماس نزدیکی با حیوان آلوده به بروسلا داشته و یا محصولات لبنی یا شیر حیوان آلوده را مصرف کرده باشند، در صورتی‌که افراد شاهد در مطالعه ما شامل افراد سالمی هستند که همانند گروه بیمار در یک ناحیه‌ی جغرافیایی زندگی می‌کنند. در مورد تعداد نمونه‌ها بین دو گروه بیمار و شاهد، به طور مثال در مطالعه‌ی رسولی (۱۶) تعداد افراد بیمار ۱۷۶ نفر و تعداد افراد گروه شاهد ۸۴ نفر بود. در حالی‌که در مطالعه ما تعداد افراد گروه‌های بیمار و شاهد ۸۶ نفر می‌باشد. در این مطالعه سعی شده بود تا ارتباط بین واریانت‌های ژنتیک IL- ۱۷ و استعداد ابتلا به تب مالت انسانی بررسی شود. ما ارتباط قوی بین Snpهای ژنIL- ۱۷ و استعداد ابتلا و یا مقاومت به بیماری یافتیم. بررسی پلی‌مورفیسم ژنIL- ۱۷ در بیماران مبتلا به بروسلا و کنترل‌های سالم نشان داده شد که توارث ژنوتیپ AA در موقعیت(۱۹۹۸-) A/G در کنترل‌ها در مقایسه با بیماران فراوانی بیش‌تری داشتند، به این دلیل آن‌ها میتوانند به عنوان فاکتور مقاومت برای بروسلوز حساب شوند. توالی ژنوتیپ GG در موقعیت - (۱۹۹۸-) A/G در بیماران نسبت به گروه کنترل بسیار بالاتر بود که ممکن است به عنوان فاکتورهای استعداد برای بیماری در نظر گرفته شوند. این نتایج به این معنی

است که افرادی که ژنوتیپ یاد شده را در نقطه ذکر شده به ارث می‌برند، ۳۳۷ برابر شانس بیش‌تر برای ابتلا به بروسلا دارند، وقتی که در معرض آن قرار می‌گیرند.

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که فراوانی های بالا و حائز اهمیت ژنوتیپ‌های و GG در موقعیت –۱۹۹۸(A/G) در گروه بیمار و ژنوتیپ AA در موقعیت –۱۹۹۸(A/G) در گروه شاهد در این مطالعه از اهمیت بالاتری برخوردار می‌باشند. علاوه بر این، در این مطالعه ما به این نتیجه رسیدیم که ژنوتیپ GG در موقعیت 1998- (A/G) در برابر ابتلا به بیماری بروسلوز مستعدکننده می‌باشند. در حالی‌که ژنوتیپ AA در موقعیت –۱۹۹۸(A/G) یک عامل محافظت‌کننده در بیماری بروسلوز می‌باشد.

## سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی را از دانشگاه علوم پزشکی همدان برای حمایت‌های مالی و بخش باکتری‌شناسی دانشکده پزشکی به منظور حمایت‌های اجرایی دارند.

## References


1. Elfaki MG, Al-Hokail AA, Nakeeb SM, Al-Rabiah FA. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosisof brucellosis in humans. Med sci Monit. 2005;11(11):MT69-MT74.
2. Rezazadeh M, Hajilooi M, Rafiei A, Haidari M, Nikoopour E, Kerammat F, et al. TLR4 polymorphism in Iranian patients with brucellosis. Journal of infection. 2006;53(3):206-210.
3. Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, et al. Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole Microtus arvalis. Int J Sys Evol Microbiol. 2008;58(2):375-382.
4. Alikhani MY, Hashemi SH, Naseri Z, Farajnia S, Peeri-Dogaheh H, Hashemi SH. Diagnosis of human brucellosis by blood culture (BACTEC) and PCR method via whole blood and serum. Jundishapur J Microbiol 2013;6(3):248-51.
5. Tabibnejad M, Alikhani MY, Arjomandzadegan M, Hashemi SH, Naseri Z. The optimization of molecular detection of clinical isolates of brucella in blood cultures by eryD transcriptase gene for confirmation of culture-negative samples. Iran Red Crescent Med J. 2016;18(4): 1-6.
6. Naseri Z, Alikhani MY, Hashemi SH, Kamarehei F, Arabestani MR. Prevalence of the most common virulence-associated genes among Brucella Melitensis isolates from human blood cultures in Hamadan Province, West of Iran. Iran J Med Sci. 2016 Sep; 41(5): 422–429.
7. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. Nat Rev Immunol. 2009;9(8):556-567.
8. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin

17. Nat Immunol. 2005;6(11):1133-1141.
9. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol. 2005;6(11):1123-1132.
10. Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell–mediated tissue damage. Nat Med. 2007;13(1):139-145.
11. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type β1. Hum Mol Genet. 1999;8(1):93-97.
12. Kazemi S, Saidijam M, Hashemi SH, Karami M, Vaisi-Raygani A, et al. Analysis of IL-10 and IL-6 Gene Polymorphisms and Their Serum Levels in Patients with Brucellosis: A Case Control Study. Immunological investigations 45 (2), 107-115.
13. Ghorbani A, Hosseini V, Ajami A, Rafiei A, Hosseini-khah Z, Janbabai G, et al. Association between polymorphism of interleukin 17 (IL-17F) and increased susceptibility to gastric cancer. J Mazand Univ Med Sci. 2012;22(91):11-20. (Persian)
14. Gul ST, Khan A. Epidemiology and epizootology of brucellosis: A review. Pak Vet J. 2007;27(3):145- 151.
15. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification. J Trop Med Hyg. 1992;95(4):271-275.
16. Rasouli M, Asaei S, Kalani M, Kiany S, Moravej A. Interleukin-17A genetic variants can confer resistance to brucellosis in Iranian population. Cytokine. 2013;61(1):297-303.
17. Mahmoudi H, Arabestani MR, Mousavi SF, Alikhani MY. Molecular analysis of the coagulase gene in clinical and nasal carrier isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by restriction fragment length polymorphism. J Glob Antimicrob Resis. 2017;8:41-45.
18. Mahmoudi H, Arabestani MR, Mousavi SF, Ghafel S, Alikhani MY. Study of polymorphism spa gene (encoding protein A) of Staphylococcus aureus in clinical isolates and nasal carriers. Tehran Univ Medl J. 2015;73(1):24-30. (persian)
19. Kassiri H, Amani H, Lotfi M. Epidemiological, laboratory, diagnostic and public health aspects of human brucellosis in western Iran. Asian Pac J Tropical Biomed. 2013;3(8):589-594.
20. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of Brucella abortus bv. 1, 2, and 4, Brucella melitensis, Brucella ovis, and

Brucella suis bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol. 1994;32(11):2660-2666.

21. Zhan Y, Kelso A, Cheers C. Differential activation of Brucella-reactive CD4+ T cells by Brucella infection or immunization with antigenic extracts. Infect Immun. 1995;63(3):969-975.
22. Zhan Y, Liu Z, Cheers C. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium Brucella abortus by different mechanisms. Infect Immun. 1996;64(7):2782-2786.
23. Golding B, Zaitseva M, Golding H. The potential for recruiting immune responses toward type 1 or type 2 T cell help. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1993;50(4):33-40.
24. Fernandes DM, Baldwin CL. Interleukin-10 downregulates protective immunity to Brucella abortus. Infect Immun. 1995;63(3):1130-1133.
25. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet Microbiol. 2002;90(1-4):81-110.
26. Wang JY, Shyur SD, Wang WH, Liou YH, Lin CG, Wu YJ, et al. The polymorphisms of interleukin 17A (IL17A) gene and its association with pediatric asthma in Taiwanese population. Allergy. 2009;64(7):1056-1060.
27. Yin J, Wang L, Shi Y, Shao A, Tang W, Wang X, et al. Interleukin 17A rs4711998 A> G polymorphism was associated with a decreased risk of esophageal cancer in a Chinese population. Dis Esophagus. 2014;27(1):87-92.