

ارزیابی آزمون PCR در تشخیص بروسلوز گاوها و مقایسه آن با روش‌های سرولوژیک استاندارد

احمد مرشدی^۱، ملاح احمدی^{۱*}، تقی زهرایی صالحی^۲، پریساقایی^۳

(۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.

(۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۳) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۹ تیر ماه ۱۳۸۸، پذیرش نهایی: ۲۴ فروردین ماه ۱۳۸۹)

چکیده

بروسلوز یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام می‌باشد که در حال حاضر اکثر نقاط کشور را به شکل مستقیم یا غیر مستقیم متأثر می‌سازد. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی آزمون PCR در تشخیص موارد بروسلوز در دام و مقایسه آن با روش‌های سرولوژیک استاندارد می‌باشد. بدین منظور ابتدا نمونه‌های سرمی مثبت از نظر بروسلا از مراکز درمانی جمع‌آوری و آزمایشات رزینگال و آگلوتیناسیون رایت در لوله (SAT)، بر روی آنها انجام گرفت و سپس همین نمونه‌ها مورد آزمون PCR قرار گرفتند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد قابل توجهی از نمونه‌های سرمی ارسالی به آزمایشگاه‌ها از نظر ابتلا به بروسلوز در آزمون رایت مثبت بودند که از این تعداد ۶۵ درصد در آزمون PCR نیز نتیجه مثبت نشان دادند بدین ترتیب که از تعداد ۲۰ نمونه سرم دامی مشکوک به بروسلوز ۶ نمونه (۳۰ درصد) مثبت با عیار ۱:۸۰ و بقیه دارای عیار کمتر از ۱:۸۰ بودند. کلیه نمونه‌ها جهت تأیید تشخیص مورد آزمایش PCR قرار گرفتند که نتایج حاصل از آزمون PCR در ۵ نمونه از بین سرم‌های بیمار (عیار ۱:۸۰) و ۶ نمونه با عیار کمتر از ۱:۸۰ با آزمایش رایت هم‌خوانی داشت در حالی که یک نمونه با تیتراژ کمتر از ۱:۸۰ با آزمایش رایت هم‌خوانی نداشت. مقایسه نتایج حاصل از آزمون رایت و PCR، ۵۵ درصد هم‌خوانی بین نتایج این دو روش را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: بروسلوز، رزینگال، رایت، PCR.

معمول‌ترین آزمایش برای تشخیص بروسلوز در انسان و دام می‌باشد، چون عیار قابل رویت و تا حدی قابل اطمینان می‌باشد و در تشخیص موارد مثبت بروسلوز کارایی خوبی دارد، ولی با توجه به این‌که موارد مشکوک در این آزمایش نسبت به سایر آزمایش‌ها زیاد است نمی‌تواند در این‌گونه موارد به تشخیص نهایی کمک کند و به کارگیری آزمون‌های دقیق‌تر و با ویژگی‌های زیاده‌تر مورد نیاز می‌باشد. به کارگیری توأم آزمایش رایت با آزمایش‌های دیگر می‌تواند یکی از بهترین راه‌های تشخیص و قضاوت نهایی روی سرم انسان یا دام بیمار یا مشکوک باشد (۵). به علت قدرت آزمایش PCR در تشخیص میزان کم ارگانیزم‌ها کاربرد آن در تشخیص عفونت‌های باکتریایی به اثبات رسیده است (۷). گزارشات و وجود دارد که نشان می‌دهند که تشخیص DNA بروسلا توسط PCR حساس‌تر از کشت خون و اختصاصی‌تر از آزمون سرولوژیک برای تشخیص بیماری حاد می‌باشد (۱۶). Imaoka و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بیان کردند در آزمایش PCR علاوه بر فوایدی که در روش‌های معمول برای تشخیص بروسلوز وجود دارد سرعت، اطمینان، حساسیت و ویژگی بالا نیز از دیگر مزیت‌های این آزمایش می‌باشند همچنین آنها گزارش کردند که روش PCR یک روش ایده‌آل برای تشخیص بروسلوز می‌باشد (۹). هدف از تحقیق حاضر ارزیابی آزمون PCR در تشخیص ملکولی بروسلا آبورئوس و ملی تنسیس در سرم دام می‌باشد و همچنین امکان

مقدمه

بروسلوز یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک انسان و دام محسوب می‌گردد. عامل بیماری باکتری از جنس بروسلا می‌باشد که هفت گونه بروسلا آبورئوس، بروسلا ملی تنسیس، بروسلا کنیس، بروسلا اویس، بروسلا سوئیس و بروسلا نئوتمه و بروسلا ماریس از آن شناسایی شده است. هر یک از گونه‌ها در میزبان خاص بیماری‌زایی بیشتری دارد (۳، ۱۰). افزایش میزان بروسلوز در حیوانات موجب افزایش میزان بروز بیماری در جوامع انسانی می‌شود که این امر نه تنها موجب از کار افتادگی افراد مبتلا می‌گردد، بلکه خسارات اقتصادی زیادی را به سیستم بهداشت و خانواده درگیر تحمیل می‌نماید.

این بیماری به علت ایجاد سقط جنین در دام، کاهش تولید شیر، عقیمی و نازایی و از دست رفتن ارزش اقتصادی دام‌های مبتلا و همچنین به علت انتقال به انسان همواره از دو بعد اقتصادی و بهداشتی مورد توجه قرار می‌گیرد (۱، ۱۱). با توجه به خسارات اقتصادی جبران‌ناپذیری که بیماری بروسلوز به صنعت دامداری کشور و همین‌طور بهداشت عمومی جامعه وارد می‌نماید و جود روش‌هایی برای تشخیص صحیح این بیماری ضروری می‌باشد. از جمله این روش‌ها آزمایش‌های رایت و PCR می‌باشد. AI-Jams و همکاران در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که آزمایش رایت



مایع فوقانی به آرامی دور ریخته شد و قطرات اضافی لوله به مدت ۲ تا ۳ ثانیه با وارونه کردن میکرو تیوب بر روی دستمال کاغذی خشک شد. یک میلی لیتر مایع شستشو به میکرو تیوب اضافه و ۱۰ بار میکرو تیوب را وارونه و برگردانده تا رسوب حاصله حل شود و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ انجام گرفت. در مرحله بعد مایع شستشو دور ریخته و میکرو تیوب به مدت ۵ دقیقه در ۵۶ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا خشک شود. سپس بر روی رسوب حاصله ۳۰ میکرو لیتر محلول حل کننده ریخته شد و با تکان دادن به طور کامل حل می شد که برای این کار از ورتکس استفاده گردیده DNA های استخراج شده تا زمان انجام PCR در ۴- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

روش انجام PCR: برای انجام PCR از کیت شرکت فرمنتاز - آلمان (K 0171) #، PCR Core Kit استفاده شده به این صورت که طبق دستور کارخانه سازنده ۴/۵ میکرو لیتر از مخلوط اصلی PCR (شامل: Taq DNA polymerase، PCR buffer، dNTPS، ۲ میکرو لیتر (۴/۴M) از هر یک از پرایمرهای مربوط به ژن B4 و B5 (۱۵) مختص *Brucella abortus* (جدول ۱)، ۲ میکرو لیتر از DNA استخراج شده (۱۰ نانوگرم) و ۱۴/۵ میکرو لیتر از آب دیونیزه خود کیت در لوله های مخصوص PCR با یکدیگر مخلوط شد. برای هر مرحله یک شاهد منفی و کنترل مثبت هم تهیه شد. در شاهد منفی تمام ترکیبات وجود داشت با این تفاوت که به جای DNA ۲ میکرو لیتر آب دیونیزه استفاده شد. برای شاهد مثبت ۴/۵ میکرو لیتر از مخلوط اصلی، ۱۴/۵ میکرو لیتر از آب دیونیزه، ۲ میکرو لیتر از هر پرایمر و ۲ میکرو لیتر از DNA استخراج شده از کشت خالص *B. abortus* اضافه شد. سپس میکرو تیوب های مخصوص PCR حدود ۳۰ ثانیه سانتریفوژ شده تا اگر محلول در دیواره لوله باشد در ته لوله جمع شود و سپس به دستگاه ترموسایکلر (CP2-003, Australia, Corbett Research) منتقل شد. تکثیر DNA توسط PCR طبق برنامه زیر انجام شد. به این صورت که ابتدا به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۳ درجه سانتیگراد DNA موجود دنا توره شده و سپس ۳۵ سیکل تکثیر و توسعه بر اساس روش ارائه شده توسط Morata و همکارانش انجام شد (۱۳). پس از اتمام سیکل آخر به مدت ۷ دقیقه و در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد عمل انکوباسیون انجام گرفت تا عمل پلیمریزاسیون تکمیل شود. بعد محصول PCR به طور مختصر سانتریفوژ می شد تا مواد چسبیده به دیواره لوله در ته لوله جمع گردد و آماده الکترو فورز شود.

الکترو فورز محصولات PCR: جهت بار گذاری محصول PCR ژل آگاروز ۲ درصد تهیه گردید (۸.۰) میکرو لیتر از محصول PCR به طور خالص ۲ میکرو لیتر بافر بارگذار، خوب مخلوط و سپس به آرامی داخل چاهک های ژل منتقل می شد به این ترتیب که در چاهک اول و آخر مارکر #SM1211 شرکت فرمنتاز آلمان به میزان ۴ میکرو لیتر و در چاهک مقابل آخر کنترل منفی و قبل از آن کنترل مثبت قرار می گرفت و برای حدود

جایگزین کردن آزمون PCR در مواردی که آزمون های سرولوژی یک استاندارد مشکوک به نظر برسد و نیاز به تأیید تشخیص داشته باشد.

مواد و روش کار

تعداد ۲۰ نمونه سرم دامی از شبکه دامپزشکی استان آذربایجان غربی در شرایط انجماد اخذ و در داخل لوله های اپندورف ۱/۵ میلی لیتری در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نمونه های سرمی اخذ شده بر اساس آزمایشات اولیه که در آزمایشگاه شبکه دامپزشکی شهرستان ارومیه انجام گرفته بود مشکوک به بروسلا بودند. در بررسی حاضر به منظور ارزیابی آزمون PCR در تشخیص موارد بروسلاز دام و مقایسه آن با آزمایشات سرمی رایج، ابتدا آزمایشات رزبنگال، رایت و سپس PCR بر روی نمونه های سرمی انجام گرفت.

آزمایش رزبنگال: آنتی ژن رنگی بروسلا آبور توس سویه ۱۹، نیم ساعت قبل از استفاده از یخچال بیرون آورده شده تا در هنگام استفاده به دمای اتاق رسیده شود. از هر نمونه سرم یک قطره روی یکی از حفره های پلیت پلاستیکی که هر پلیت حاوی ۱۰ حفره است ریخته شد و سپس هم حجم آن آنتی ژن رزبنگال (موسسه رازی) روی آن ریخته و خوب هم زده شد. پس از مخلوط کردن آنتی ژن با سرم، پلیت پلاستیکی را به مدت چهار دقیقه روی دستگاه مخلوط کن اتوماتیک قرار گرفت و نتایج زیر نور کافی قرائت گردید و کلیه مواردی که کوچکترین اثری از آگلوتیناسیون در آن ها مشاهده می شد مثبت و برای انجام آزمایشات بعدی در نظر گرفته شد (۳).

آزمایش رایت یا سرو آگلوتیناسیون در لوله (SAT): به منظور انجام این آزمایش، رقت های دوگانه از نمونه های سرمی تهیه و با استفاده از آنتی ژن رایت (موسسه رازی، ۸۴۰۲۵۲) آزمایش به روش استاندارد رایت انجام گرفت. نتایج آزمایش پس از ۲۴ ساعت قرائت و ثبت گردید (۲).

استخراج DNA از خون:

برای استخراج DNA از روش تغییر یافته Morata و همکارانش در سال ۱۹۹۹ به ترتیب زیر استفاده شد: کلیه محلول های مورد استفاده ۲۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار گرفت و محلول لیزکننده ۲۰ دقیقه قبل از مصرف در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده می شد.

در یک میکرو تیوب ۱/۵ میلی لیتری، ۱۰۰ میکرو لیتر سرم و ۵ میکرو لیتر پروتئاز اضافه شد، محلول حاصل ورتکس شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

به محلول حاصل ۴۰۰ میکرو لیتر محلول لیزکننده اضافه کرده و ۲۰ ثانیه ورتکس گردید، ذرات شناور در میکرو تیوب با نوک سمپلر خارج شد.

به محلول حاصله ۳۰۰ میکرو لیتر محلول رسوب دهنده اضافه و میکرو تیوب ها ۱۰ بار به آهستگی تکان داده شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفته و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند.





تصویر ۱ - نتایج باندهای رسوبی حاصل از مارکر، شاهد و ۴ نمونه سرم مورد آزمایش.

PCR نتیجه مثبت داد که با آزمایش راییت مغایرت داشت (جدول ۲). نتایج حاصل از آزمون PCR نمونه‌های سرمی به ترتیب در جدول ۲ و تصویر ۱ آمده است. همانگونه که تصویر ۱ نشان می‌دهد باندهایی با اندازه ۲۲۰bp در روی ژل نمایان شد.

از راست به چپ: چاهک مارکر (M)، چاهک ۱ شاهد مثبت (بروسلا آبور توس استاندارد)، چاهک ۲ شاهد منفی و چاهک‌های ۳ تا ۶ نمونه‌های مورد آزمایش می‌باشد. قرار گرفتن باندهای رسوبی DNA در ۲۲۰bp و مقایسه آن با مارکر موجود، در این شکل چاهک ۳، ۴، ۵ و ۶ نمونه‌های مثبت می‌باشند.

بحث

بر اساس نتایج مطالعه حاضر تعداد نمونه‌هایی که با هر دو آزمون راییت و PCR نتایج مثبت نشان دادند ۵ نمونه بود و نمونه‌های سرم که آزمون راییت منفی (عیار کمتر از ۱:۸۰) و PCR منفی نیز داشتند ۶ نمونه را در بر گرفت از سوی دیگر یک نمونه که از نظر آزمون راییت مثبت بود و عیار ۱:۸۰ داشت که در PCR منفی شد و نیز ۸ نمونه که راییت منفی داشتند در PCR نتیجه مثبت نشان دادند. نظر به این که آزمایش راییت در لوله یک آزمون استاندارد تشخیص بروسلوز است از این رو نمونه‌ای که راییت مثبت ولی PCR منفی نشان داد به عنوان منفی کاذب به حساب می‌آید که حدود ۱/۲ درصد موارد را تشکیل می‌دهد از این رو آزمون PCR ۱/۲ درصد از موارد مثبت را نتوانست تشخیص بدهد شاید علت این امر از بین رفتن DNA بروسلا در سرم توسط آنزیم‌های تخریب کننده آن باشد و یا این که اصولاً به علت دفع سریع مقادیر زیادی باکتری از خون، DNA باکتری در نمونه سرمی وجود نداشته باشد. در مورد نمونه‌های راییت منفی با عیار کمتر از ۱:۸۰ نظر به این که افرادی که عیارهای سرو لوژیک زیر ۱:۸۰ نشان می‌دهند ضمن این که در حال حاضر بیمار نیستند ولی آلودگی با بروسلا را در گذشته داشته‌اند و به علت این که آلودگی با باکتری بروسلا سبب آزاد شدن DNA باکتری در سرم می‌گردد از این رو آزمون PCR در این موارد مثبت می‌گردد

جدول ۱- الیگونوکلوئیدهای پرایمر مورد استفاده در PCR (Vrioni et al., 2004).

نام پرایمر	ژن	ردیف پرایمر	اندازه قطعه مورد نظر
B4 B5	F R	5' TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA 3' 5' CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG 3'	220 bp

جدول ۲- نتایج حاصل از آزمایشات رزبنگال، راییت و PCR نمونه‌های سرم دامی.

تعداد نمونه	آزمایش رزبنگال	آزمایش راییت	آزمایش PCR
۱	+	۱:۱۰	-
۱	+	۱:۱۰	+
۳	+	۱:۲۰	-
۵	+	۱:۲۰	+
۲	+	۱:۴۰	-
۲	+	۱:۴۰	+
۱	+	۱:۸۰	-
۵	+	۱:۸۰	+

۱۲۰ دقیقه با شدت جریان ۵ ولت برسانیمتر، الکترو فورز انجام شد.

ردیابی محصولات PCR الکترو فورز شده: ژل به داخل دستگاه Trans illuminator (BTS-20M, Japan) منتقل شده و با تابش اشعه ماوراء بنفش قطعات DNA مشخص و با باندهای موجود در مارکر مارکر #SM1211 شرکت فرمنتاز آلمان مقایسه و اندازه قطعات تکثیر یافته تخمین زده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: با توجه به این که راییت به عنوان آزمون استاندارد برای تشخیص بروسلوزیس بکار می‌رود از این رو داده‌های حاصل از آن به عنوان نتایج حقیقی در نظر گرفته شد و حساسیت و ویژگی نتایج حاصل از آزمون PCR با آن مقایسه و تعیین گردید (۱۲).

نتایج

نتایج حاصل از آزمایشات رزبنگال، راییت و PCR از ۲۰ نمونه سرم دامی، ۱۵ نمونه دارای آگلوتیناسیون (+) و ۵ نمونه دارای آگلوتیناسیون (+) در آزمایش رزبنگال بودند از بین این نمونه‌ها در آزمون راییت، ۶ نمونه (۴۰ درصد) مثبت با عیار ۱:۸۰ و باقی نمونه‌ها (۷۰ درصد) دارای عیار پایین تر از ۱:۸۰ بودند از ۲۰ نمونه سرمی ۱۳ نمونه (۶۵ درصد) در PCR مثبت شدند که از این تعداد، ۵ نمونه با عیار ۱:۸۰ و ۸ نمونه با عیار کمتر از ۱:۸۰ در این آزمایش (PCR) نتیجه مثبت داشتند. یک نمونه با عیار ۱:۸۰ و ۶ نمونه با عیار کمتر از ۱:۸۰ در آزمایش PCR نتیجه منفی داد. با توجه به این که آزمایش راییت استاندارد فرض شده است پس ۵ نمونه با عیار ۱:۸۰ در این آزمایش نتیجه مثبت و ۶ نمونه با عیار کمتر از ۱:۸۰ در این آزمایش نتیجه منفی در PCR دادند که با آزمایش راییت مطابقت داشت و یک نمونه با عیار ۱:۸۰ در این آزمایش نتیجه منفی و تعداد ۸ نمونه با عیار کمتر از ۱:۸۰ در آزمایش



عفونت فعال تفکیک نماید در نتیجه آزمایش PCR نیز مانند آزمایش های جلدی می تواند فقط گویای آلودگی با جرم باشد و کاربرد در تشخیص بیماری درمانگاهی نمی تواند داشته باشد. همان طور که اشاره شد آزمون PCR چه با استفاده از سرم و یا خون کامل نمی تواند به عنوان یک آزمون غربالی و یا تشخیصی به تنهایی بکار رود بلکه کاربرد این آزمون بیشتر جهت تایید تشخیص های سرولوژیک می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بدین وسیله از همکاری جناب آقای دکتر حبیب دستمالچی و سرکار خانم دکتر نوشین آبرملو که در طول این تحقیق ما را یاری فرموده اند تقدیر و تشکر می نمایند.

References

1. Shimi, A. (1376) Veterinary Medicine, 2nd ed. Jihad-Daneshgahi, University of Tehran. Tehran, Iran.
2. Vojgani, M. (1383) Immunology. (6th ed.) Jihad-Daneshgahi, University of Tehran. Tehran, Iran.
3. Abul, K. A., Andrew, H. L. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5th ed.) Blackwell Sciences, London, UK.
4. Al-Attas, R. A., Al, khalifa, M., Al, Qurashi, A. R., Badawy, M., Al, Gualy, N. (2000) Evaluation of PCR, culture and serology for diagnosis of acute human brucellosis. Ann. Saudi. Med. 20:224-228.
5. Al-Jams, A. H., Elbashir, A. M., Al-Faris, S. S. (1993) Brucella Pneumonia, A case report. Ann. Int. Med. 13: 74-77.
6. Baily, G. G., Krahn, J. B., Drasar, B. S., Stoker, N. G. (1992) Detection of Brucella abortus and Brucella melitensis by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg. 95: 271- 275.
7. Brisson-Noel, A., Aznar, C., Chureau, C., Nguyen, S. (1991) Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification

Baily و همکاران در سال ۱۹۹۲ نشان دادند که بروسلا می تواند توسط آزمایش PCR تحت شرایط مناسب تشخیص داده شود و این که واکنش متقاطع بین پاتوژن های گرم منفی در غلظت های پنج برابر بیشتر از آستانه تشخیص بروسلا، وجود ندارد. همچنین آنها تفاوتی بین *abortus* B و *melitensis* B با استفاده از سویه های نوع توصیه شده برای این گونه ها از نظر حساسیت یا اندازه محصول تکثیر مشاهده نکردند. آنها نشان دادند که این حساسیت تا حد زیادی زمانی که سیستم برای کل ارگانیسم های تخریب شده توسط روش های ساده به کار رفته است، حفظ شده است. حساسیت ممکن است توسط هیبرید کردن محصولات تکثیر با استفاده از یک پروب داخل توالی تکثیر شده یا توسط PCR ثانویه با پرایمرهای تودرتوی داخلی افزایش یابد. آنها اعتقاد دارند که این روش به کار رفته در لوکوسیت های تهیه شده از خون محیطی یا مغز استخوان توسط روش هایی که هم اکنون برای PCR استاندارد هستند، ابزار تشخیصی با ارزش خواهد بود (۶). Fekete و همکاران در سال ۱۹۹۲ سیستم PCR را برای تشخیص DNA بروسلا مبتنی بر ژن کد کننده پروتئین ۴۳ کیلو دالتونی غشا خارجی که حساسیت های مشابهی با DNA خالص شده باکتری دارد، توصیف نموده اند (۸). Zerva و همکارانش در سال ۲۰۰۱ در طی تحقیقی ۳۱ نمونه خون کامل و سرم را از نظر آلودگی به بروسلا با استفاده از روش PCR آزمایش کردند و گزارش نمودند که حساسیت آزمون در نمونه های خون کامل ۶۱ درصد است در حالی که با نمونه های سرم ۹۴ درصد می باشد (۱۶). Queipo-Ortuno و همکارانش در سال ۱۹۹۹، ۵۰ نمونه خونی مشکوک به بروسلا را به روش PCR آزمایش کردند که ۴۷ نمونه را مثبت گزارش کردند (۹۸/۲ درصد) و فقط ۱۵ نمونه از ۵۰ نمونه به روش آزمون های سرولوژیکی مثبت گزارش شد (۱۴). Morata و همکارانش در طی آزمایشی دیگر بر روی ۵۹ نمونه سرم خونی مشکوک به بروسلا گزارش کردند که ۵۷ نمونه از این نمونه ها به روش PCR نتیجه مثبت دادند در حالی که فقط ۳ نمونه از ۵۷ نمونه با آزمون های سرولوژیکی مثبت بودند (۱۳).

در مطالعه حاضر ۵۵ درصد همخوانی بین آزمایش استاندارد رایت و PCR با استفاده از سرم وجود داشت و همچنین ۴۵ درصد عدم توافق بین دو تست وجود دارد. در این مطالعه میزان حساسیت و ویژگی این آزمون در نمونه های سرمی دامی به ترتیب ۸۳/۳ درصد و ۴۲/۸۵ درصد به دست آمد. ضمناً درصد منفی و مثبت اخباری به ترتیب ۸۵/۱ درصد و ۳۸/۴۶ درصد و درصد منفی کاذب و مثبت کاذب به ترتیب ۱۶/۷ درصد و ۵۷/۱۵ درصد و میزان دقت تست ۵۵ درصد محاسبه گردید. Al-attas و همکارانش در سال ۲۰۰۰ بیان کردند برای ارزیابی موارد بروسلاز آزمون PCR می تواند به عنوان تکمیل کننده روش های سنتی و آزمون های سرولوژیکی و یا کشت باشد (۴). در نهایت با توجه به نتایج تحقیق حاضر و دیگر مطالعات انجام شده در این زمینه می توان چنین بیان کرد که آزمون PCR شبیه آزمون های جلدی بوده و بیماری بهبود یافته را نمی تواند از



- in clinical practice evaluation. *Lancet*. 19: 338: 364.
8. Fekete, A., Bantle, J. A., Halling, S. M. (1992) Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:79-83.
 9. Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T., Yamada, A. (2007) Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60:137-139.
 10. Khorvash, F., Hassanzadeh Keshteli, A., Behjati, M., Salehi, M. (2007) An unusual presentation of brucellosis, involving multiple organ systems, with low agglutinating titers: a case report. *J. Med. Case Reports*. 21: 53.
 11. Mandell, G. L., Douglas, R. G., Bennet, J. E. (1990) Principles and practice of infectious diseases. (3th ed.) Churchill Living Stone, USA.
 12. Thrusfield, M. (1999) *Veterinary Epidemiology*. (2nd ed.) Blackwell sciences, London, UK.
 13. Morata, P., Queipo- Ortuno, M. I., Reguera, J. M., Garcia- Ordonez, M. A., Pichardo, C., Colmenero, J. D. (1999) Posttreatment follow- up of brucellosis by PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 37: 4163- 4166.
 14. Quijo-Ortuno, M. I., Garcia-Ordonez, M. A., Colmenero, J. D., Morata, P. (1999) Hydrogen peroxide improves the efficiency of a peripheral blood PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *Biotechniques*. 27: 248-252.
 15. Vrioni, G., Gartzonika, C., Kostoula, A., Boboyianni, C., papadopoulou, C., levidiotou, S. (2004) Application of a polymerase chain reaction enzyme immunoassay in peripheral whole blood and serum specimens for diagnosis of acute brucellosis. *Europ. J. Clin. Micro. Infec. Dis.* 10: 10096-10103.
 16. Zerva, L., Bourantas, K., Mitka, S., Kansouzidou, A., Legakis, N. J. (2001) Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J. Clin. Microbio.* 39: 1661-1664.



COMPARATIVE EVALUATION OF PCR AND STANDARD SEROLOGICAL METHODS IN DETECTION OF BRUCELLOSIS IN CATTLE

Morshedi, A.¹, Ahmadi, M.^{1*}, Zahraie Salehi, T.², Sagaie, P.³

¹Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran.

²Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran- Iran.

³Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran.

(Received 19 July 2009 , Accepted 13 April 2010)

Abstract:

Brusellosis is one of the most dangerous infectious zoonotic diseases which at present affect most areas of Iran directly or indirectly. The aim of the present study was evaluate the efficacy of PCR test in detection of brucellosis. Suspected animal sera (n=20) to brusellosis were collected from clinics and subjected to Rose Bengal and Wright Agglutination tests and to PCR analysis. While 6 samples (30%) were positive with titer 1:80, titer of the rest ones were less than 1:80. To confirm, all samples were subjected to PCR which revealed 5 samples of 1:80 and 6 samples of less than 1:80 were in agreement with wright test. However, 8 samples of 1:80 and 1 sample of less than 1:80 were in disagreement with wright test. The results of this study revealed that considerable percent of submitted samples were positive for brucellosis and positivity of ones were confirmed with PCR test we have shown 55% agreement between SAT(Standard Agglutination Test) and PCR results.

Key words: brusellosis, Rose Bangal, Wright, PCR.

*Corresponding author's email: m.ahmadi@mail.urmia.ac.ir, Tel: 0411-2972611, Fax: 0411-2771926

