Archive of SID

طب و تجربه
پاییز ۱۳۸٤، شماره ۷ (۳)
صفحات: ۲٤٤-۲۳۹

ارزیابی تشخیص بروسلا آبورتوس با PCR و مقایسه آن با روش کشت

سید رضا حسینی‌دوست [۱]*.Ph.D، علی احمدی [۲]*.M.Sc، زینب احمدی [۳] *.M.Sc، مسعود حاجیا [۴] *.Ph.D ،
زهرا سفیری [۵] *.M.Sc و لیلا گل‌منش [۶] *.M.Sc

*آدرس مکاتبه: * دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج» - پژوهشکده طب رزمی - مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی - تهران - ایران*

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸٤/۶/۲٤ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸٤/۹/۲۲ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸٤/۹/۳۰

خلاصه

مقدمه: بروسلوز یک بیماری زئونوز است که انتشار جهانی دارد. این بیماری از قدیم در نقاط مختلف ایران شایع بوده و با توجه به عوارض اقتصادی و پزشکی حائز اهمیت است. با توجه به خسارات ناشی از شیوع بروسلوز، کنترل و پیشگیری آن از اولویت ویژه‌ای برخوردار است. تشخیص به موقع و دقیق این بیماری نقطه شروع هرگونه برنامه مؤثر به‌منظور کنترل آن در انسان و دام است. روش‌های متداول تشخیص همیشه همراه با مشکلات فنی برای تشخیص عفونت می‌باشند. امروزه توجه محققان به روش‌های مولکولی و بویژه روش PCR جلب شده است. در این مطالعه کارآیی یک جفت پرایمر در چند نمونه انسانی و حیوانی ارزیابی شد.

مواد و روش کار: سویه‌های استاندارد بروسلا از آزمایشگاه رفرانس تهیه و در شرایط استاندارد نگهداری شدند. کلیه مقالات منتشر شده در خصوص پرایمرهای اختصاصی بروسلا جمع‌آوری و نقاط ضعف و قوت ست‌های مختلف بررسی گردید و پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه ژنومی IS711 با توجه به مزایای آن انتخاب گردید. ژنوم سویه‌های استاندارد استخراج و شرایط PCR در آزمایشگاه بهینه شده و حساسیت و ویژگی آنها تعیین گردید. در انتها، تمامی سویه‌های کلینیکی (انسانی و دامی) با متد بهینه شده PCR، آزمایش و با روش کشت و نیز نتایج سرولوژیک مقایسه گردیدند.

نتایج: نتایج مربوط به آزمایشات کشت و سرولوژی نشان دهنده قابلیت‌های محدود این روش‌ها برای تشخیص گونه‌های بروسلا می‌باشد. مطابق این نتایج در بین ۴۲ نمونه مثبت سرولوژیک تنها از ۶ نمونه با روش کشت، باکتری ایزوله شد. از ده نمونه دامی که با روش کشت و PCR آزمایش شدند، حساسیت کشت ۴۰ درصد و حساسیت PCR ۶۰ درصد بود. ضمناً پنج نمونه انسانی که از نظر سرولوژیک مثبت تلقی شده بودند، به همین ترتیب آزمایش شدند که هر پنج نمونه با روش کشت نیز مثبت گردیدند، ولی تنها چهار نمونه را روش PCR تشخیص داد.

بحث: روش‌های متنوع تشخیص بروسلا اعم از روش کشت و روش‌های سرولوژیک مورد تأیید بوده ولی مشکلات و محدودیت‌های خاص خود را دارند. از آنجا که نتایج مربوط به ست‌های آزمایش شده هم‌خوانی قابل قبولی با یکدیگر نداشتند، این تحقیق به‌منظور دستیابی به یک ست قابل اجرا در آزمایشگاه‌های بالینی طراحی شد. نتایج

۱- دانشیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج» - نویسنده مسئول
۲- فوق لیسانس بیوتکنولوژی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۳- فوق لیسانس علوم سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۴- دانشیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۵- فوق لیسانس علوم سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»
۶- فوق لیسانس علوم سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

www.SID.ir

Archive of SID

حاصله حاکی از کارآیی مناسب پرایمرهای مورد استفاده است؛ هر چند حساسیت آنها با آنچه قبلاً گزارش شده بود مطابقت زیادی نداشت. به‌نظر می‌رسد با استفاده از شرایط و مواد استاندارد می‌توان به نتایج بهتری نیز دست یافت. عدم ردیابی بروسلا آبورتوس در یک نمونه بالینی در این تحقیق به‌خاطر مشکلات روش تشخیص نبوده است؛ بلکه احتمالاً به علت ویژگی بالای پرایمرهای مورد نظر بوده است.

واژه‌های کلیدی: بروسلا آبورتوس، PCR، روش کشت، تشخیص

مقدمه

بروسلوز یک بیماری زئونوز است که علاوه بر انسان می‌تواند طیف وسیعی از دام‌ها و نیز حیوانات وحشی را درگیر کرده و با ایجاد سقط‌های خود به‌خودی در دام آلوده از طریق کاهش زاد و ولد آنها خسارات هنگفتی به اقتصاد جامعه تحمیل کند [۱]. در انسان بروسلوز یک بیماری سیستمیک به‌حساب می‌آید که می‌تواند ارگان‌ها و نسوج زیادی را تحت تأثیر قرار داده و یک سلسله علایم غیر اختصاصی ایجاد نماید. امروزه بروسلوز در جوامع در حال توسعه و حتی بعضی از کشورهای پیشرفته به‌عنوان یک مسئله ملی مد نظر است [۲]. گونه‌های بروسلا در بدن حیوانات مختلف از جمله دام‌ها زندگی می‌کنند و انسان عمدتاً به‌صورت تصادفی از طریق تماس با دام‌های آلوده و یا مصرف فرآورده‌های لبنی آنها آلوده می‌گردد [۳]. بروسلاها باکتری‌های گرم منفی، بدون اسپور و غیر متحرک هستند که قادرند به‌صورت اختیاری و داخل سلولی زندگی کنند [۴]. تمام شش گونه بروسلا (بروسلا ملی تنسیس، بروسلا آبورتوس، بروسلا سویس، بروسلا اویس، بروسلا کانیس و بروسلا نئوتوما) برای انسان پاتوژن بوده و قادر به ایجاد عفونت در انسان می‌باشند [۵]. امکان انتقال عامل بروسلوز از طریق آئروسل‌های آلوده (طریقه تنفسی) به انسان، از دیرباز آن را در ردیف عوامل بیولوژیک پر اهمیت قرار داده که همین امر ضرورت پایش علمی آن را در سطوح مختلف جامعه مضاعف می‌نماید. علی‌رغم اجرای برنامه‌های متعدد ریشه‌کنی بروسلوز در نقاط مختلف، هنوز این بیماری اهمیت جهانی خود را حفظ کرده است [۶].

با توجه به این‌که عفونت‌های بروسلوز عمدتاً غیر اختصاصی هستند، تشخیص آن عمدتاً بر مبنای یافته‌های آزمایشگاهی انجام می‌گردد. همچنین تشخیص دقیق و مستقیم بروسلوز به کمک آزمایشات باکتریولوژیک قابل انجام است [۷، ۲۴]. از آنجایی که تشخیص مستقیم عامل عفونت در نمونه‌های زیاد قابل انجام نمی‌باشد، معمولاً در این‌گونه شرایط از آزمایشات غیرمستقیم مبتنی بر روش‌های سرولوژیک استفاده می‌شود [۱۹]. امروزه چند تست سرولوژیک وجود دارند که آزمایشگاه‌های مختلف از آنها برای تشخیص بروسلوز استفاده می‌کنند. با این حال هرکدام از این تست‌ها از جنبه‌های مختلف با مشکلات و تنگناهایی مواجه است که روی هم رفته استفاده از آنها را محدود می‌سازد [۱۲، ۲۵، ۲۶].

پیشرفت‌های اخیر در بیولوژی مولکولی به تشخیص سریع و دقیق بسیاری از عوامل عفونی کمک‌های شایانی کرده است. روش PCR ردیابی و تشخیص باکتری‌ها و به‌خصوص باکتری‌های کند رشد و پر مشکل را تسهیل کرده و به کمک آن امکان تمایز بین گونه‌ها و سویه‌ها نیز فراهم شده است. تلاش برای استفاده از این روش جهت تشخیص عوامل بروسلوز حدوداً از دو دهه پیش آغاز شد. در سالیان اخیر از این تکنیک برای تشخیص جنس بروسلا و گونه‌های آن به‌صورت اختصاصی استفاده شده است. برای این منظور با استفاده از پرایمرهایی که بر اساس سکانس‌های مختلف موجود در ژنوم بروسلا طراحی شده بودند، ست‌های مختلف PCR مورد استفاده قرار گرفتند. از جمله سکانس ژن IS711 [۲]، سکانس IS6501 [۱۳]، سکانس 16SrRNA [۳، ۸، ۱۸]، ناحیه اسپیسر 16S-23S rRNA [۱۴، ۱۵، ۱۶]، پروتئین ۳۱ کیلودالتن لایه خارجی [۱، ۱۰، ۱۱، ۱۸] و پروتئین لایه خارجی ۴۳ کیلو دالتن [۵، ۶] و پروتئین Omp2 لایه خارجی [۹] که همگی اساس طراحی جفت پرایمرهای مختلف قرار گرفتند. با این حال تحقیقات و گزارشاتی که نشان دهنده ارزش واقعی ست‌های ایجاد شده بر اساس پرایمرهای طراحی شده در نمونه‌های بالینی و محیطی باشند، بسیار انگشت شمار است. به همین علت بر آن شدیم که

www.SID.ir

Archive of SID

پرایمرهای مربوط به سکانس ژن (insertion) را سنتز کرده و پس از اپتیمـایز نمـودن سـت PCR مربوطـه، ارزش آن را در آزمـایش نمونه‌های بالینی و دامی تعیین و گزارش نماییم.

مواد و روش کار

سـویه‌هـای اسـتاندارد بروسـلا آبورتـوس (S19, S544, S103) از آزمایشگاه رفرانس و دانشکده دامپزشکی تهیه شدند. این سـویه‌هـا پس از کشت در شرایط آزمایشگاه بـرای مصـارف بعـدی در دمـای فریزر نگهداری شدند. پنج نمونه بالینی مشـکوک بـه بروسـلوزیس (سرولوژی مثبت) با معرفی پزشک متخصص عفـونی از بیمارسـتان جمع‌آوری و با استفاده از متدهـای باکتریولوژیـک آزمـایش شـدند. نمونه‌های مثبت که از آنها بروسلا جدا شـد، پـس از خـالص‌سـازی سویه‌ها و تأیید نهایی برای مصارف بعدی در فریزر نگهداری شدند. ۴۲ نمونـه بافـت از دام‌هـای سـرولوژی مثبـت (مشـکوک بـه بروسلوزیس) نیز از کشتارگاه تهیـه و بـا روش‌هـای باکتریولوژیـک آزمایش و از نمونه‌های مثبت بروسلا ایزوله شـد. کلیـه سـویه‌هـای ایزوله شده پس از تأیید نهایی، برای آزمایش‌هـای بعـدی در فریـزر نگهداری شدند.

به‌منظور تعیین پرایمرهای مناسب، کلیه گزارشـات منتشـر شـده در خصوص تشخیص مولکولی بروسلا با استفاده از تسهیلات اینترنـت بررسی و مقالات مربوطه حتی‌المقدور جمع‌آوری شده و پرایمرهـای استفاده شده دقیقاً تجزیه و تحلیل شدند. پرایمرهایی که بـر اسـاس قطعه ژنومی اینسرشن سکانس طراحی شده بود، با توجـه بـه تکـرر استفاده در گزارشات قبلی [۲] و نیز ویژگی موجـود در آن در سـطح گونه، مناسب تشخیص داده شـد. آنالیزهـای نـرم‌افـزاری (بلاسـت، اولیگو و ژن رانر) روی سکانس هدف و نیز پرایمرهـا بـه‌طـور کلـی دقت و ویژگی گزارش را تأیید کردند و سپس سـکانس پرایمرهـای زیر جهت سنتز سفارش داده شدند.

Pf: 5’ GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC 3’

Pr: 5’ TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT 3’

با استفاده از روش‌های استاندارد [۱۸] DNA سویه‌هـای اسـتاندارد استخراج شده و با روش اسپکترومتری غلظت DNA در آنها تعیـین گردید. نمونه‌های دامی پـس از آمـاده‌سـازی اولیـه و هموژناسـیون DNA استخراج شد. آزمایشات اپتیمایز با اسـتفاده از پروتکـل‌هـای استاندارد شـروع و سـپس شـرایط آزمـایش بهینـه گردیـد. پـس از اپتیمایز شدن اولیه ست PCR، حساسیت و ویژگی پرایمرها تعیین و شرایط برای آزمایش نمونه‌ها آماده شـد. نحـوه اجـرای هـر سـیکل ترموسایکل عبارت بـود از: دناتوراسـیون اولیـه در دمـای ۹۵ درجـه سـانتی‌گـراد بـه‌مـدت ۳ دقیقـه، دناتوراسـیون در دمـای ۹۵ درجـه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه، انیلینگ در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گـراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بـه‌مـدت ۳۰ ثانیـه. مجمـوع سـیکل‌هـا ۳۵ و پروتکـل نهـایی PCR طبـق جدول ۱ انجام شد.

جدول ۱: غلظت اجزای متشکله PCR

اجزاء مخلوط اولیه PCR	مقدار نهایی	غلظت نهایی
Template DNA	1µl	-
Buffer 10 X	2.5µl	-
MgCl2	0.6µl	1.5 mM
dNTPs	1µl	250 µM each
Primer F	0.1µl	0.1µ M
Primer R	1.2µl	1 µM
DNA Taq polymerase	0.5µl	1.25 unite
Distilled Water	18.5µl	-
Final Volume	25µl	-

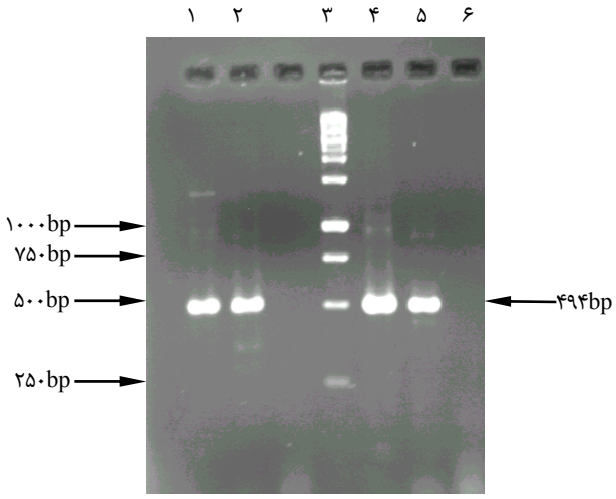
از کلیه سویه‌های ایزوله شده از نمونه‌های دامی و انسانی DNA بـا استفاده از پروتکل‌های استاندارد [۱۸] اسـتخراج و در اتـانول ۹۵ در صد ترسیب شـد. رسـوب حاصـله از سـانتریفیوژ در مرحلـه پایـانی استخراج و در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر TE حل گردید. غلظت DNA و خلوص آن با روش اسپکترومتری تعیـین گردیـد. DNA خـالص شده نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش، در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گـراد نگهداری گردیـد [۱۸]. سـپس طبـق پروتکـل بهینـه شـده، کلیـه نمونه‌ها با روش PCR آزمایش و محصول نهـایی آن (494bp) بـا برش به‌وسیله آنزیم اختصاصی Taq1 تأیید گردید.

www.SID.ir

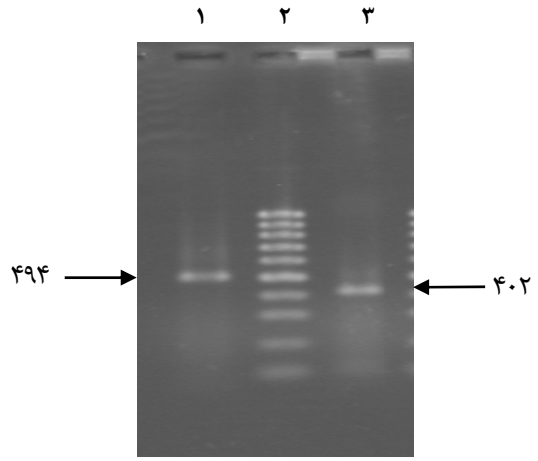
Archive of SID

نتایج

بهینه‌سازی آزمایش PCR و پرایمرهای مورد نظر با ژنوم تخلیص شده سویه استاندارد بروسلا آبورتوس انجام گردید. در شکل ۱ محصول سه سویه S19, S544, S103 ملاحظه می‌شود. محصول ۴۹۴ نوکلئوتیدی توسط برش آنزیمی داده شد. نتیجه آن در شکل ۲ دیده می‌شود. محصول مورد نظر به دو باند ۴۰۲ و ۹۳ نوکلئوتیدی تقسیم شده است. نتایج مربوط به آزمایش حساسیت و ویژگی پرایمرها در شکل ۱ دیده می‌شود. در این تحقیق ۴۲ نمونه مشکوک که با معیارهای دامپزشکی از دام‌های آلوده تهیه شده بودند، با استفاده از روش‌های باکتریولوژی آزمایش شدند.



شکل ۱: انجام واکنش PCR با محصول ژنومیک سه سویه استاندارد بروسلا آبورتوس (S19, S103, S544). شماره ۳ و ۶ مارکر DNA ، شماره ۱ ، شماره ۲، شماره۴، شماره ۵ ، شماره ۶ کنترل منفی.



شکل ۲: آزمایش برش آنزیمی. نمونه اول محصول PCR قبل از برش، نمونه دوم مارکر DNA، نمونه سوم محصول PCR بعد از برش آنزیمی

تنوع و نتایج به‌دست آمده از این نمونه‌ها در جدول ۲ دیده می‌شود. کلیه نمونه‌های مورد آزمایش از ۳۰ راس دام مشکوک که مطابق معیارهای سازمان دامپزشکی آلوده به بروسلوز تشخیص داده شده بودند، تهیه شده بود. همه نمونه‌ها از نظر آزمایش سرولوژی مثبت بوده ولی تنها از شش نمونه (۱۴ در صد) بروسلا با روش کشت جدا شد. چنانچه در جدول ۲ مشاهده می‌شود، هر شش نمونه کشت مثبت مربوط به نمونه‌های بافتی (۲۳ درصد) بودند. نتایج حاصله از آزمایش پنج نمونه انسانی با روش PCR و کشت در جدول ۳ مشاهده می‌شود. همچنان‌که در این جدول مقایسه‌ای ملاحظه می‌شود، نتایج آزمایش سرولوژی و کشت در هر پنج نمونه مطابق (۱۰۰ درصد مثبت) هستند. از طرفی پرایمرهای انتخاب شده، DNA بروسلا آبورتوس را در یک نمونه ردیابی نکردند. این واقعیت به‌ظاهر حساسیت PCR را کمتر از کشت نشان می‌دهد.

جدول ۲: مقایسه نتایج حاصله از آزمایش نمونه‌های دامی

شناسه دام	نمونه بالینی	نتایج		
		سرولوژی	کشت	PCR
۱	غدد لنفاوی	+	−	+
۲	کلیه	+	+	−
۳	رحم و جفت	+	+	+
۴	پستان	+	−	+
۵	رحم و جفت	+	+	+
۶	غدد لنفاوی	+	−	+
۷	کبد	+	−	−
۸	کلیه	+	+	+
۹	غدد لنفاوی	+	−	+
۱۰	کبد	+	−	−

جدول ۳: مقایسه نتایج به‌دست آمده از نمونه‌های انسانی

نمونه	سرولوژی	کشت	PCR
۱	+	+	+
۲	+	+	+
۳	+	+	−
۴	+	+	+
۵	+	+	+

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز و تعیین هویت گونه‌های بروسلا اساساً بر پایه کشت ارگانیسم و تعیین ویژگی‌های فنوتیپی آن قرار دارد. این فرآیند ضمن این‌که زمان بر و مستلزم کار آزمایشگاهی قابل توجهی است، می‌تواند خطر ایجاد آلودگی‌های آزمایشگاهی بروسلوز را نیز به همراه داشته باشد [۲۰]. برای رفع این مشکلات و نیز دستیابی به متدهای ردیابی سریع پاتوژن و نیز تعیین دقیق گونه‌های بروسلا، تکثیر اسیدهای نوکلئیک آن مد نظر قرار گرفت [۱۴]. برای تشخیص بروسلا با روش PCR تاکنون بر اساس سکانس نواحی مختلف ژنوم سویه‌های مختلف باکتری پرایمرهای متعددی طراحی شده و پروتکل‌های گوناگون PCR ارایه شده و نتایج آنها منتشر شده است [۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۰، ۱۱]. بیشتر ست‌های PCR با استفاده از ژنوم تخلیص شده کشت خالص باکتری ارزیابی شده‌اند؛ بنابراین کارآیی عملی آنها در آزمایش نمونه‌های بالینی تا حدود زیادی بستگی به شرایط آزمایش دارد. البته پرایمرهایی نیز طراحی و با استفاده از نمونه‌های بالینی (انسانی و دامی) آزمایش شده که در این مورد نیز نتایج به‌دست آمده در همه شرایط قابل تکرار نمی‌باشد. در این تحقیق یک ست پرایمر که قبلاً برای تشخیص بروسلا در سطح گونه (بروسلا آبورتوس) طراحی شده بود [۷] در شرایط آزمایشگاهی بهینه شده و با استفاده از چند نمونه بالینی و دامی مورد ارزشیابی قرار گرفت. این نتایج سپس با نتایج به‌دست آمده از آزمایشات باکتریولوژی و سرولوژی مقایسه شدند. بیشتر ست‌های طراحی شده برای بروسلا، باکتری را در سطح گونه تشخیص داده و قادر به تمایز بین گونه‌ها نمی‌باشند. پرایمرهای به‌کار برده شده بر اساس اینسرشن سکانس یا IS711 (ویا IS6501) طراحی شده که در تمامی گونه‌های بروسلا منحصر بوده و تعداد کپی و موقعیت اینسرشن سکانس در هر گونه و بیو وار متمایز است [۲۱]. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق قبلاً آزمایش شده و نسبت به باکتری‌های نزدیک با بروسلا نتیجه منفی داشته‌اند [۲۲]. در این تحقیق باکتری‌های استرپتوکک بتا همولیتیک، اشرشیا کلی، پروتئوس، شیگلا، استافیلوکک اورئوس، کلبسیلا، انتروباکتر و سودومونا آئروژینوزا با پرایمر مورد نظر آزمایش شدند ولی بر خلاف انتظار باکتری‌های کلبسیلا و استرپتوکک توسط پرایمرهای مورد نظر ردیابی شدند، که این به‌وضوح مغایر ادعاهای محققین قبلی بوده و ویژگی آن را مورد تردید قرار می‌دهد. البته محصول تولید شده با باکتری‌های یاد شده با محصول اختصاصی بروسلا آبورتوس (حدود 500bp) متفاوت بوده و بنابراین از این حیث مشکلی وجود نخواهد داشت. محدوده ردگیری پرایمرهای مورد استفاده در بررسی‌های قبلی نسبتاً پایین گزارش شده است که در تحقیق ما نیز این محدوده حفظ شد [۲۳]. حساسیت ست اپتیمایز شده با روش شمارش کلنی و نیز غلظت DNA در حدود ۶۰۰ باکتری تعیین گردید. از مجموع ۱۰ نمونه که با دو روش آزمایش شدند، ۴ مورد با کشت و ۶ مورد با روش PCR مثبت شدند. این بدان معنی است که حساسیت PCR ۲۰ درصد بیشتر از روش کشت است. از طرف دیگر تعداد ۵ نمونه انسانی نیز با این ست آزمایش شدند که همه آنها با روش کشت مثبت شدند ولی تنها در چهار مورد روش PCR جواب مثبت داد. به‌عبارت دیگر در این تحقیقات حساسیت PCR در خصوص نمونه‌های بالینی۸۰ درصد و روش کشت ۱۰۰ در صد بود. علت این کاهش حساسیت ممکن است به‌خاطر این باشد که ست آماده شده PCR برای یک گونه خاص (بروسلا آبورتوس) طراحی شده [۷] و طبیعی است که قادر به تشخیص بروسلاهای غیر از آبورتوس مناسب نباشد. ضمن این‌که پرایمرهای استفاده شده در سطح گونه اختصاصی بوده و احتمال دارد نمونه تشخیص داده نشده محتوی گونه‌ای غیر از بروسلا آبورتوس بوده باشد. به بیان دیگر بروسلای تشخیص داده نشده با PCR به احتمال زیاد گونه‌ای غیر از آبورتوس بوده که پرایمرهای اختصاصی برای بروسلا آبورتوس قادر به ردیابی آنها نبوده است. علت دیگری که می‌تواند توجیه کننده این حساسیت نه چندان مناسب باشد این است که حساسیت این واکنش در مرحله اپتیمایز کردن حدود ۶۰۰ باکتری تعیین شد. بنابراین قابل انتظار است که قادر به ردیابی DNA باکتری‌های کمتر از این حد نباشد. به‌نظر می‌رسد با آزمایشات بیشتر در آینده کارآیی این ست پرایمر در عمل افزایش یابد. با آزمایش تعداد بیشتری نمونه‌های بالینی (دامی و انسانی) و استانداردسازی، بیش از پیش شرایط کار و کارآیی PCR می‌توان به ارزشیابی بیشتر آن پرداخت. به‌هر حال در شرایط فعلی پیشنهاد می‌شود که روش

www.SID.ir

Archive of SID

PCR در کنار سایر روش‌ها به‌ویژه روش کشت، روش‌های سرولوژی و نیز تابلوی بالینی بیمار [۱۸] استفاده شود، تا محدودیت‌های آن به‌مرور بر طرف شده و در نهایت بتواند به‌عنوان یک روش آزمایشگاه هی سریع و حساس، در آزمایشگاه‌های بالینی و نیز تحقیقات اپیدمیولوژی بروسلوز جای خود را باز نماید. ارزیابی می‌گردد که در مراحل نهایی بتوان به‌عنوان یک روش تکمیلی آن را به جامعه آزمایشگاهی معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت طرح تحقیقاتی شماره ۱۱۵- ۸۱- RCMB در مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج» انجام شد. همچنین از مسئولین دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بخاطر همکاری‌هایی که در انجام این تحقیق ارایه نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1- Baily GG, Krahn JB, Drasar BS and Stoker NG. Detection of B. melitensis and B.abortus by DNA amplification. J Trop Med Hyg 1992;95:271-275.

2- Bricker BJ and Halling SM. Differentiation of Brucella abortus bio 1, 2 and 4, B.melitansis, B.ovis and B.suis bio 1 by PCR. J Clin Microbiol 1994;32:2660-2666.

3- Cetikaya B, Ongur H, Muz A, Ertas HB, Kalender HM and Erdogan HM. Detection of Brucella species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. Veterinary Records 1999;144:239-240.

4- Diaz R, and morion I. Laboratory techniques in the diagnosis of human brocellosis. Clinical & laboratory aspects. Young E J and corbel M J Eds. CRCP Press.Boca Raton; 1984.p.73- 83.

5- Fekete A, Bantle JA, Hailling SM and Sanborn MR. Preliminary development of diagnostic test for Brucella using polymerase chain reaction. J Appl Bacteriol 1990;69:216-227.

6- Fekete A, Bantle JA, Hailling SM. Detection of Brucella by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. J Veterin Diag Invest 1992;4:79-83.

7- Guler L, Gundiz K and Omran OK. Comparison of PCR and Bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. Veterin Microbiol 2003;93:53-61.

8- Herman L and Ridder H. Identification of Brucella species by using the polymerase chain reaction. Appl Envir Microbiol 1992;58:2099-2101.

9- Leal-Kelevezas DSL, Vazques IOM, Merino AL and Soriano JPM. Single step PCR for detection of Brucella spp. From blood and milk of infected animals. J Clin Microbiol 1995;33:3087-3090.

10- Matar GM, Khneisser IA and Abdelnoor AM. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31 kilodalton Brucella antigen DNA. J Clin Microbioly 1996;34: 477-478.

11- Morata P, Queipo-Ortuno MI and Colmenero DJ. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol 1998;36:2443-2446.

12- Navarro E, Escribano J, Fernandez J and Solera J. Comparison of three different PCR methods for detection of Brucella spp. In human blood samples 2000;34(2):147-51.

13- Ouahrani S, Soubrier MP and Liautard JP. IS6501-anchored PCR for the detection and identification of Brucella species and strains. J Appl Bacteriol 1996;81:154-160.

14- Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera MJ, Garcia-Ordonez AM, Gardens A and Colmenero DJ. Development and evaluation of a PCR-enzyme–linked Immunosorbent assay for diagnosis of human Brucellosis. J clin Microbiol 2003;41(1):144-148

15- Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P, Manchado P and Colmenero JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral blood PCR assay. J Clin Microbiol 1997;35:2927- 2930.

16- Rijpens NP, Jannes G, Asbroeck M, Rossau R and Herman LM. Direct detection of Brucella spp. In raw milk by PCR and riverse hybridization with 16S rRNA spacer probes. Appl Envir Microbiol 1996;62: 1683-1688.

17- Romero C, Gamazo C, Pardo M and Lopez-Goni H. Specific detection of Brucella DNA by PCR. J Clin Microbiol 1995;33:615-617.

18- Romero C, Pardo M, Grillo MJ, Diaz R, Balsco JM and Goni IL. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosurbent assay on milk samples for diagnosis of Brucellosis in dairy cattle. J Clin Microbiol 1995;33:3198-3200.

19- Sambrook J, Fritch EF and Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NW. protocol 1,2,3. 1989;1:31-42.

20- Serpe I, Gallo P, Fidanza N and Scaramuzzo A. Single-step method for detection of Brucella species in soft cheese by gene specific polymerase chain reaction. Journal of dairy research 1999;66:313-317.

21- Thomsen V, Kok-Jensen A, Buser M, Shulz P and Burkardt H. J. Monitoring treatment of patients with polmunary tuberculosis: can PCR be applied? J Clin Microbiol 1999;27:3601- 3607

22- Probert WS, Schrader KN, Khoung NK, Bystrome LS and Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of Brucella spp., B. abortus, and B.melitensis. J clin Microbiol 2004;42 (3):1290-1293

23- Zerva L, Bourantas K, Mika S, Kansouzidou A and Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. J Clin Microbiol 2001;39:1661- 1664.

۲۴- خواجه‌کرم‌ادین مهرانگیز، افضلی بزاز صدیقه. تهیه آنتی ژن بروسلا جهت تشخیص تب مالت برای اولین بار در استان خراسان. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل، جلد اول شماره ۳. ۱۳۸۰. صفحات: ۲۴-۲۸.

۲۵- ذوقی اسماعیل و ثمر گیتی. تفسیر آزمایشهای سرمی بروسلوز. مجله نبض، شماره ششم. ۱۳۷۵. صفحات: ۳۰-۲۶

۲۶- عبادی عبدا...، ذوقی اسماعیل. روش‌های آزمایشگاهی استاندارد برای تشخیص بروسلوز (سویه های بروسلا). انتشارات سازمان دامپزشکی، شماره ۲۴. ۱۳۶۱، صفحات: ۲۷-۱۷.

www.SID.ir