صفحات: ۲۳۹-۲۳۶

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

، Ph.D.* مسعود حاجیا * 'M.Sc. مسعود حاجیا * 'M.Sc. مسعود حاجیا * 'M.Sc. مسعود حاجیا * 'M.Sc. و لیلا گلمنش * 'M.Sc.

آدرس مکاتبه: * دانشگاه علوم پزشکی بقیه!... $^{(3-3)}$ – پژوهشکده طب رزمی – مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی – تهران – ایران - ایران – ایران - ایریخ اعلام قبولی مقاله: - ۱۳۸٤/۹/۳۰ تاریخ اعلام قبولی مقاله: - ۱۳۸۵/۹/۳۰ تاریخ اعلام تاریخ اع

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، کنتـرل و پیشگیری آن از اولویت ویژهای برخوردار است. تشخیص به موقع و دقیق این بیماری نقطه شروع هرگونه برنامه مـؤثر بهمنظور کنترل آن در انسان و دام است. روشهای متداول تشخیص همیشه همراه با مشکلات فنی بـرای تشـخیص عفونت میباشند. امروزه توجه محققان به روشهای مولکولی و بویژه روش PCR جلب شـده اسـت. در ایـن مطالعـه 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 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

۲– فوق لیسانس بیوتکنولوژی – دانشگاه علوم پزشکی بقیها...^{«عج»}

۴- دانشیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیها... «عج»

۶- فوق لیسانس علوم سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی بقیها... «عج»

۱- دانشیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیها... «عج» - نویسنده مسئول

۳– فوق لیسانس علوم سلولی و مولکولی – دانشگاه علوم پزشکی بقیها...^{«عج»}

۵– فوق لیسانس علوم سلولی و مولکولی – دانشگاه علوم پزشکی بقیها...^{«عج»}

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 می توان به نتایج بهتری نیز دست یافت. عدم ردیابی بروسلا آبورتوس در یک نمونه بالینی در این تحقیق به خاطر 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 می تواند 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 به حساب می آید که می تواند 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 حتى بعضى از كشورهاى پيشرفته بهعنوان يک مسئله ملى مـد نظر است [7]. گونههای بروسلا در بدن حیوانات مختلف از جمله دامها زندگی می کنند و انسان عمدتاً به صورت تصادفی از طریق تماس با دامهای آلوده و یا مصرف فرآوردههای لبنی آنها آلوده می گردد [۳]. بروسلاها باکتریهای گرم منفی، بدون اسپور و غیر متحرک هستند که قادرند به صورت اختیاری و داخل سلولی زندگی كنند [۴]. تمام شش گونه بروسلا (بروسلا ملى تنسيس، بروسلا آبورتوس، بروسلا سویس، بروسلا اویس، بروسلا کانیس و بروسلا نئوتوما) برای انسان پاتوژن بوده و قادر به ایجاد عفونت در انسان مى باشند [۵]. امكان انتقال عامل بروسلوز از طريق أئروسل هاى 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 می نماید. علی رغم اجرای برنامههای متعدد ریشه کنی بروسلوز در نقاط مختلف، هنوز این بیماری اهمیت جهانی خود را حفظ کرده است [۶].

با توجه به این که عفونتهای بروسلوز عمدتاً غیر اختصاصی هستند، تشخیص آن عمدتاً بر مبنای یافتههای آزمایشگاهی انجام می گردد. همچنین تشخیص دقیق و مستقیم بروسلوز به کمک آزمایشات باکتریولوژیک قابل انجام است [۷، ۲۴]. از آنجایی که تشخیص

مستقیم عامل عفونت در نمونه های زیاد قابل انجام نمی باشد، معمولاً در این گونه شرایط از آزمایشات غیرمستقیم مبتنی بر روشهای سرولوژیک استفاده می شود [۱۹]. امروزه چند تست سرولوژیک وجود دارند که آزمایشگاههای مختلف از آنها برای تشخیص بروسلوز استفاده می کنند. با این حال هر کدام از این تستها از جنبههای مختلف با مشکلات و تنگناهایی مواجه است که روی هم رفته استفاده از آنها را محدود می سازد [۱۲، ۲۵، ۲۵]. 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 به صورت 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 ۱۳] IS6501 [۱۳]، سـکانس 16SrRNA [۳، ۸، ۱۸]، ناحیـه اسییسـر ۱۵۶-23S 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

پرایمرهای مربوط به سکانس ژن (insertion) را سنتز کرده و پس از اپتیمایز نمودن ست PCR مربوطه، ارزش آن را در آزمایش نمونههای بالینی و دامی تعیین و گزارش نماییم.

مواد و روش کار

سویههای استاندارد بروسلا آبورتوس (S19, S544, S103) از آزمایشگاه رفرانس و دانشکده دامپزشکی تهیه شدند. این سویهها پس از کشت در شرایط آزمایشگاه برای مصارف بعدی در دمای فریزر نگهداری شدند. پنج نمونه بالینی مشکوک به بروسلوزیس (سرولوژی مثبت) با معرفی پزشک متخصص عفونی از بیمارستان جمع آوری و با استفاده از متدهای باکتریولوژیک آزمایش شدند. نمونههای مثبت که از آنها بروسلا جدا شد، پس از خالصسازی سویهها و تأیید نهایی برای مصارف بعدی در فریزر نگهداری شدند. ۴۲ نمونه بافت از دامهای سرولوژی مثبت (مشکوک به بروسلوزیس) نیز از کشتارگاه تهیه و با روشهای باکتریولوژیک آزمایش و از نمونههای مثبت بروسلا ایزوله شد. کلیه سویههای ایزوله شده پس از تأیید نهایی، برای آزمایشهای بعدی در فریزر نگهداری شدند.

بهمنظور تعیین پرایمرهای مناسب، کلیه گزارشات منتشر شده در خصوص تشخیص مولکولی بروسلا با استفاده از تسهیلات اینترنت بررسی و مقالات مربوطه حتی المقدور جمع آوری شده و پرایمرهای استفاده شده دقیقاً تجزیه و تحلیل شدند. پرایمرهایی که بر اساس قطعه ژنومی اینسرشن سکانس طراحی شده بود، با توجه به تکرر استفاده در گزارشات قبلی [۲] و نیز ویژگی موجود در آن در سطح گونه، مناسب تشخیص داده شد. آنالیزهای نرمافزاری (بلاست، اولیگو و ژن رانر) روی سکانس هدف و نیز پرایمرها بـهطـور کلـی دقت و ویژگی گزارش را تأیید کردند و سپس سکانس پرایمرهای زير 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 سویههای استاندارد استخراج شده و با روش اسپکترومتری غلظت DNA در آنها تعیین

گردید. نمونههای دامی پس از آمادهسازی اولیه و هموژناسیون DNA استخراج شد. أزمايشات اپتيمايز با استفاده از پروتكلهاي استاندارد شروع و سپس شرایط آزمایش بهینه گردید. پس از اپتیمایز شدن اولیه ست PCR، حساسیت و ویژگی پرایمرها تعیین و شرایط برای آزمایش نمونهها آماده شد. نحوه اجرای هر سیکل ترموسایکل عبارت بود از: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد بهمدت ۶۰ ثانیه، انیلینگ در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد بهمدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بـهمـدت ۳۰ ثانیه. مجموع سیکلها ۳۵ و پروتکل نهایی PCR طبق جدول ۱ انجام شد.

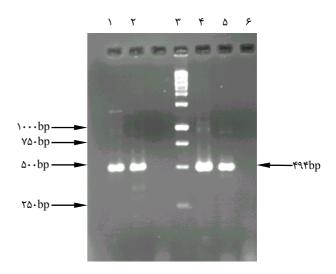
جدول 1: غلظت اجزای متشکله PCR

غلظت نهایی	مقدار نهایی	اجزاء مخلوط اوليه PCR
-	1μ1	Template DNA
-	2.5μ1	Buffer 10 X
1.5 mM	0.6μ1	MgCl2
250 μM each	1μ1	dNTPs
0.1μ M	0.1μ1	Primer F
1 μΜ	1.2μ1	Primer R
1.25 unite	0.5μ1	DNA Taq polymerase
-	18.5μl	Distilled Water
-	25µl	Final Volume

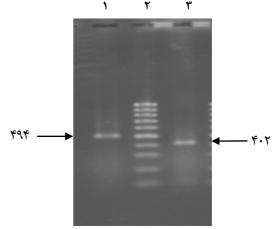
از کلیه سویههای ایزوله شده از نمونههای دامی و انسانی DNA با استفاده از پروتکلهای استاندارد [۱۸] استخراج و در اتانول ۹۵ در صد ترسیب شد. رسوب حاصله از سانتریفیوژ در مرحله پایانی استخراج و در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر TE حل گردید. غلظت DNA و خلوص آن با روش اسپکترومتری تعیین گردید. DNA خالص شده نمونهها تا زمان انجام آزمایش، در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردیـد [۱۸]. سـپس طبـق پروتکـل بهینـه شـده، کلیـه نمونهها با روش PCR آزمایش و محصول نهایی آن (494bp) با برش بهوسیله آنزیم اختصاصی Taq1 تأیید گردید.

نتايج

بهینه سازی 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 می شود. محصول ۴۹۴ نوکلئوتیدی توسط برش آنزیمی داده شد. نتیجه آن در شکل ۲ دیده می شود. 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.



شكل 1: انجام واكنش PCR با محصول ژنوميك سه سويه استاندارد بروسلا آبورتوس (S19, S103, S544). شماره ۳ و ۶ مارکر DNA ، شماره ۱ ، شماره ۲ شماره ۴، شماره ۵ ، شماره ۶ کنترل منفی.



شكل ۲: آزمايش برش آنزيمي. نمونه اول محصول PCR قبل از برش، نمونه دوم مار کر DNA، نمونه سوم محصول PCR بعد از برش اَنزیمی

تنوع و نتایج به دست آمده از این نمونه ها در جدول ۲ دیده می شود. 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 می شود، 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 می شود. همچنان که در این جدول مقایسهای ملاحظه می شود، 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 به ظاهر حساسیت PCR را کمتر از کشت نشان می دهد.

جدول ۲: مقایسه نتایج حاصله از آزمایش نمونههای دامی

نتايج		نمونه باليني	شناسه دام	
PCR	کشت	سرولوژی	مود بایتی	شناه
+	1	+	غدد لنفاوي	١
-	+	+	كليه	۲
+	+	+	رحم و جفت	٣
+	-	+	پستان	۴
+	+	+	رحم و جفت	۵
+	ı	+	غدد لنفاو <i>ي</i>	۶
-	ı	+	کبد	٧
+	+	+	کلیه	٨
+	-	+	غدد لنفاوي	٩
_	_	+	کبد	١٠

جدول ۳: مقایسه نتایج بهدست آمده از نمونههای انسانی

		,	
PCR	کشت	سرولوژی	نمونه
+	+	+	١
+	+	+	۲
_	+	+	٣
+	+	+	۴
+	+	+	۵

ىحث

تشخيص أزمايشگاهي بروسلوز و تعيين هويت گونههاي بروسلا اساساً بر پایه کشت ارگانیسم و تعیین ویژگیهای فنوتیپی آن قرار دارد. این فرآیند ضمن این که زمان بر و مستلزم کار آزمایشگاهی قابل توجهی است، می تواند خطر ایجاد آلودگی های آزمایشگاهی بروسلوز را نیز به همراه داشته باشد [۲۰]. برای رفع این مشکلات و نیز دستیابی به متدهای ردیابی سریع پاتوژن و نیـز تعیـین دقیـق گونههای بروسلا، تکثیر اسیدهای نوکلئیک آن مد نظر قرار گرفت [۱۴]. برای تشخیص بروسلا با روش PCR تاکنون بر اساس سكانس نواحى مختلف ژنوم سويههاى مختلف باكترى پرايمرهاى متعددی طراحی شده و پروتکلهای گوناگون PCR ارایه شده و نتایج آنها منتشر شده است [۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۱]. بیشتر ستهاى PCR با استفاده از ژنوم تخليص شده كشت 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 بـهدسـت آمـده در همه شرایط قابل تکرار نمی باشد. 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 به کار برده شده بر اساس اینسرشن سکانس یا IS711 (ویا IS6501) طراحی شده که در تمامی گونههای بروسلا منحصـر بوده و تعداد کیی و موقعیت اینسرشن سکانس در هر گونه و بیو وار متمایز است [۲۱]. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیـق قـبلاً 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، كلبسيلا، انتروباكتر و سودومونا آئروژينوزا با پرايمر مورد نظر آزمایش شدند ولی بر خلاف انتظار باکتریهای کلبسیلا و

استریتوکک توسط پرایمرهای مورد نظر ردیابی شدند، که این بهوضوح مغایر ادعاهای محققین قبلی بوده و ویژگی آن را مورد تردید قرار می دهد. البته محصول تولید شده با باکتری های یاد شده با محصول اختصاصى بروسلا أبورتوس (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 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. به عبارت دیگر در این تحقیقات حساسیت PCR در خصوص نمونههای بالینی ۸۰ درصد و روش کشت ۱۰۰ در صد بود. علت این كاهش حساسيت ممكن است بهخاطر اين باشد كه ست آماده شده PCR برای یک گونه خاص (بروسلا اَبورتوس) طراحی شده [۷] و طبیعی است که قادر به تشخیص بروسلاهای غیر از آبورتوس مناسب نباشد. ضمن این که پرایمرهای استفاده شده در سطح گونـه 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 می تواند توجیه کننده این حساسیت نه چندان مناسب باشد این است که حساسیت این واکنش در مرحله ایتیمایز 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 می توان به ارزشیابی بیشتر آن یرداخت. به هر حال در شرایط فعلی پیشنهاد می شود که روش

تشكر و قدرداني

این تحقیق با حمایت طرح تحقیقاتی شماره ۱۱۵ – RCMB –۸۱ –۱۱۵ 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 می گردد.

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 می گردد که در مراحل نهایی بتوان بهعنوان یک روش تکمیلی آن را به جامعه آزمایشگاهی معرفی نمود.

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 polumnary 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.
- خواجه کرمادین مهرانگیز، افضلی بزاز صدیقه. تهیه آنتی ژن بروسـالا جهـت تشخیص تب مالت برای اولین بـار در اسـتان خراسـان، مجلـه علمـی پژوهشـی 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: ۷۲-۷۱.