

مقایسه آزمایش‌های سرولوژیک (رزبنگال، رایت لوله‌ای و کومبس رایت) و مولکولی (PCR) در تشخیص بروسلوز گوسفند و بز

مصطفی جعفرپور^{۱*}، نظرعلی کترا ابراهیمی^۲، علی ناظمی^۳، مهدی آسمار^۴، محمد خاتمی‌نژاد^۵

چکیده

بروسلوز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مشترک حیوان و انسان محسوب می‌گردد و در مناطق زیادی از جهان گسترش یافته و در ایران نیز اندمیک است. امروزه تشخیص بروسلوز بر پایه آزمایش‌های سرولوژی و میکروبیولوژی است. در این مطالعه آزمایش‌های سرولوژی (رزبنگال، رایت لوله‌ای و کومبس رایت) بر روی ۱۰۰ نمونه انجام شده و سپس بر روی نمونه‌های خون رزبنگال مثبت و نمونه‌های مثبت و منفی رایت لوله‌ای، آزمایش PCR انجام شد. فراوانی نسبی بروسلوز برحسب سرولوژی ۲۰٪ و برحسب PCR ۵٪ شد. با توجه به اهمیت شناسایی صحیح موارد آلوده در کنترل و پیشگیری بروسلوز در جوامع دامی و انسانی؛ به نظر می‌رسد استفاده از آزمایش‌های متکی بر تکنولوژی اسیدهای نوکلئیک (PCR) از حساسیت و اختصاصیت مناسبی جهت تشخیص بروسلوز برخوردار می‌باشند.

واژگان کلیدی: بروسلوز، سرولوژی، PCR

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۵

مقدمه

بروسلوز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و دام محسوب می‌گردد. عامل مسبب بروسلوز باکتری‌های گرم منفی درون سلولی اختیاری‌اند که به جنس بروسلا و به گروه آلفا - پروتئو باکتر تعلق دارند و بر اساس تمایل میزبانی و بیماری‌زایی به سه گونه شامل، بروسلا آبورتوس (گاو و گاو میش)، بروسلاملیتئسیس (بز و گوسفند)، بروسلا اویس (گوسفند)، بروسلا کانیس (سگ)، بروسلا سوئیس (خوک)،

Comparison of Serological tests (Rosebengal, Tube wright and Coombs wright) with Molecular test (PCR) for Detection of Brucellosis (Goat and Sheep)

Gafarpoor, M^{1*}, Kotra Ebrahemi, N², Nazemi, A³, Assmar, M⁴, khataminezhad, M⁵.

1- Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran. (Sina.Jafarpoor@yahoo.com)

2-M.A.Student of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

3- Department of Genetics, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

4- Ddepartment of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

5-Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

Brucellosis Continues to be of great health Significance and economic importance in many contries including Iran.

The current diagnosis of brucellosis is based on the Serological and the microbiological tests.

In this study , 100 sera specimen were taken from Animals (Goat and Sheep) in tonekabon to wnship, then was screening with serological tests and seroposetive and seronegative specimens (total peripheral blood) confirm by PCR method.

More over, wright's seroaglutination test had titers within the diagnostic range 20 cases, that 5 samples were positive by PCR.

In this study, prevalence rate disease was 20% Incidence rate disease was by PCR 5%.

Different Serological tests and PCR method due to Serological Methods are not always Sensitive and Specific the PCR techniques have proved tobe Useful to Specificity, Sensitivity and rapidness.

Key Words: Brucellosis, Serology, PCR

* گروه آموزشی میکروبیولوژی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران Jafarpoor@yahoo.com

Emill Sina

۲- دانشجوی کارشناس ارشد، رشته میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.

۳- گروه آموزشی ژنتیک، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

۴- گروه آموزشی میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

۵- گروه آموزشی میکروبیولوژی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

استفاده قرار می‌گیرد. کاربرد PCR جهت تشخیص DNA بروسلاها به واسطه حساسیت و اختصاصیت و شناسایی زودهنگام ثابت شده است (۱۱، ۷، ۵، ۴، ۳).

هدف این تحقیق مقایسه آزمایش‌های سرولوژی (رزبنگال، رایت لوله‌ای و کومبس رایت) و مولکولی (PCR) در تشخیص بروسلا در نمونه خون دامی (گوسفند و بز) جهت ارائه یک روش سریع و با قابلیت تشخیص دقیق موارد آلوده می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه: تعداد ۱۰۰ نمونه خون از دام‌های اهلی (گوسفند و بز) مشکوک به بروسلا شهرستان تنکابن در شرایط آسپتیک تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان انجام آزمون در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمایش‌های سرولوژی:

تشخیص بروسلا به کمک آزمایش‌های سرولوژیکی (رزبنگال، رایت لوله‌ای و کومبس رایت) صورت گرفت. طبق برنامه سازمان دامپزشکی تیتراژ $\frac{1}{40}$ و بیشتر رایت لوله‌ای و تیتراژ $\frac{1}{40}$ و بیشتر، 2ME به عنوان موارد مثبت هستند.

آزمایش مولکول Polymerase Chain Reaction (PCR)

الف) تخلیص DNA:

DNA ژنومیک از نمونه خون که قبلاً با EDTA جمع‌آوری و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده به کمک کیت استخراج DNA شرکت کیاژن (Amplisense Brucella SP 460S/ICS-770) جدا گردید.

در این کیت از کنترل منفی (Negative Control NC)؛ که حاوی (DNA- buffer) است، کنترل مثبت (Positive Control (PC) (۱۰^۳) کپی از قطعه ۶۶۰ جفت بازی که در بروسلاملیتینیس، بروسلا آبورتوس، بروسلا سوئیس و بروسلا کانیس حفاظت

خرگوش، جوندگان و گوزن)، بروسلا نئو تمه (موش جنگلی)، بروسلا پینی پدیا (خوک آبی)، بروسلا ستاسئا (دلفین‌ها و وال‌ها) تقسیم می‌شوند (۸، ۱۴).

بطور کلی پیشگیری، کنترل و ریشه‌کنی بروسلا نیازمند شناخت سریع و صحیح فراوانی و توزیع مکانی و زمانی آن است. لذا نباید در تعیین اهداف اقدامات مبارزه‌ای صرفاً به درصد پوشش واکسیناسیون و یا درصد اقدام خاص کنترل بسنده شود؛ بلکه کاهش موارد بیماری بعنوان شاخص قابل اندازه‌گیری دوم باید توأمان هدف گذاری شود و معیار دوم است که اثربخشی معیار اول را تعیین می‌نماید.

بنابراین سرعت در شناخت وضعیت بیماری در ارتباط مستقیم با خطر گسترش بیماری است بدین معنی که فاصله زمانی طولانی بین وقوع و لحظه شناخت آن بالطبع در اکثر موارد گسترش بیماری را به دنبال خواهد داشت (۱).

کشت‌های باکتریولوژیکی و آزمایش‌های سرولوژیکی متکی بر آگلوتیناسیون شایع‌ترین آزمون‌های مورد استفاده در تشخیص عفونت‌های انسانی و حیوانی بروسلا هستند.

از جمله مشکلات موجود در انجام این آزمایش‌ها می‌توان به این موارد اشاره کرد که: تکنیک‌های کشت وقت‌گیر بوده و فاقد حساسیت لازم در تشخیص موارد مزمن می‌باشد و حساسیت نتایج کشت در مواردی که هدف شناسایی گونه‌های بروسلا آبورتوس باشد کاهش می‌یابد.

آزمایش‌های سرولوژیکی به دلیل حضور موارد منفی کاذب حاصل از آنتی بادی‌های بلوکان و حضور موارد مثبت کاذب بدلیل تشابه آنتی ژنی با دیگر باکتری‌های گرم منفی (یرسینیا آنتروکولیتیکا، اشرشیا کلی 0:157، سالمونلا اورباننا و ویبریوکلا) از حساسیت و اختصاصیت کافی برخوردار نمی‌باشند و به تنهایی قادر به تشخیص مرحله حاد و مزمن بیماری نیستند (۱۲، ۱۳).

امروزه تکنولوژی تکثیر اسیدهای نوکلئیک متکی بر PCR به جهت تشخیص باکتری‌های مشکل پسند و دیررشد مورد

نتایج

آزمایش رز بنگال بر روی ۱۰۰ نمونه سرم دامی انجام شد که ۴۰ نمونه آزمایش رز بنگال آنها مثبت شد. بر روی ۴۰ نمونه که آزمایش رز بنگال آنها مثبت شد؛ آزمایش رایت لوله‌ای، کومبس رایت و مولکولی انجام شد. ۲۰ نمونه آزمایش رایت لوله‌ای آنها مثبت شد؛ ۶ نمونه تیترا $\frac{1}{40}$ ، ۷ نمونه تیترا $\frac{1}{80}$ ، ۳ نمونه تیترا $\frac{1}{160}$ و ۴ نمونه تیترا $\frac{1}{5120}$ را نشان دادند و ۲۰ نمونه آزمایش رایت لوله‌ای آنها منفی (تیترا $\frac{1}{20}$) شد.

۲ نمونه (تیترا $\frac{1}{20}$ و $\frac{1}{80}$ رایت لوله‌ای) آزمایش کومبس رایت آنها مثبت (تیترا $\frac{1}{5120}$) شد؛ ۵ نمونه آزمایش مولکولی آنها مثبت شد، که شامل ۳ نمونه با تیترا رایت لوله‌ای $\frac{1}{5120}$ ، ۱ نمونه با تیترا رایت لوله‌ای $\frac{1}{80}$ و تیترا $\frac{1}{5120}$ کومبس رایت و ۱ نمونه با تیترا $\frac{1}{20}$ رایت لوله‌ای و تیترا $\frac{1}{5120}$ کومبس رایت بودند.

میزان فراوانی بروسلوز در دام‌های اهلی (گوسفند و بز) شهرستان تنکابن برحسب آزمایش رزبنگال ۴۰٪، رایت لوله‌ای ۲۰٪، کومبس رایت ۲٪، مولکولی ۵٪ شد (جدول ۱، ۲).

شده است) و کنترل داخلی (Internal control sample (ICS (قطعه ۷۷۰ جفت بازی که قسمتی از ژنوم فاژ لامبدا است) استفاده شده است.

کنترل داخلی به تمام میکروتیوپ نمونه‌های مورد آزمایش، نمونه کنترل منفی و مثبت افزوده شده و نتیجه منفی کاذب را کنترل می‌کند بطور مثال اگر در ژل الکتروفورز یک نمونه هیچ باندهی (قطعه ۷۷۰ جفت بازی و ۴۶۰ جفت بازی) مشاهده نشد؛ نشان دهنده عدم صحت مراحل انجام آزمایش مولکولی است و یک بار دیگر آزمایش مولکولی نمونه باید انجام شود.

ب) تکثیر DNA

تکثیر DNA به کمک روش کار کیت فوق در دستگاه ترموسایکلر انجام شد در این مطالعه توالی‌های ۴۶۰ و ۷۷۰ جفت بازی مورد تکثیر قرار گرفتند.

ژل الکتروفورز:

محصول PCR در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز گردید، باندهای موردنظر در دستگاه ترانسلومیناتور مجهز به دوربین تحت نور UV مشاهده و مورد عکسبرداری قرار گرفت.

جدول ۱- میزان فراوانی نسبی بروسلوز در دام‌های اهلی (گوسفند و بز) شهرستان تنکابن برحسب آزمایش رزبنگال، رایت لوله‌ای، کومبس رایت و مولکولی

تعداد دام مورد بررسی		آزمایش رزبنگال		آزمایش رایت لوله‌ای		آزمایش کومبس رایت		آزمون مولکولی (PCR)	
۱۰۰		درصد موارد مثبت	موارد مثبت	درصد موارد مثبت	موارد مثبت	درصد موارد مثبت	موارد مثبت	درصد موارد مثبت	
		۴۰	۴۰٪	۲۰	۲۰٪	۲	۲٪	۵	۵٪

جدول شماره ۲- مقایسه نتایج PCR و سرولوژی

PCR	کومیس رایت	رایت لوله‌ای	آزمایش نمونه
+	-	+	۱*
+	-	+	۲
+	-	+	۳
+	+	-	۴
+	+	+	۵
-	-	-	۶-۲۴
-	-	+	۲۵-۳۰
-	-	+	۳۱-۳۶
-	-	+	۳۷-۳۹
-	-	+	۴۰

(* ۱-۴۰ شماره نمونه‌ها را نشان می‌دهد.)

۱ و ۲ و ۳ و ۴) رایت لوله‌ای ۱/۵۱۲۰ و کومیس رایت ۱/۲۰
 ۵) رایت لوله‌ای ۱/۸۰ و کومیس رایت ۱/۵۱۲۰
 ۶-۲۴) رایت لوله‌ای ۱/۲۰
 ۲۵-۳۰) رایت لوله‌ای ۱/۴۰
 ۳۱-۳۶) رایت لوله‌ای ۱/۸۰
 ۳۷-۳۹) رایت لوله‌ای ۱/۱۶۰
 ۴۰) رایت لوله‌ای ۱/۵۱۲۰

M: شناساگر ملکولی (100 bp)
 PC: کنترل مثبت (460bp)
 NC: کنترل منفی (DNA – buffer)
 1,4: نمونه‌های مثبت (460bp)
 2,3: نمونه‌های منفی
 NC,1,2,3,4,PC: کنترل داخلی (770pb)

بحث

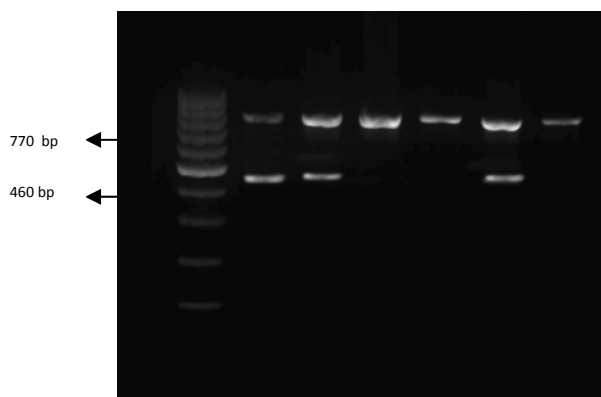
با توجه به اینکه دام‌های اهلی (گوسفند، بز و گاو) مخزن اصلی عامل بیماری هستند در نتیجه افزایش آلودگی در جوامع انسانی نسبت مستقیمی با شیوع گسترش یافته بیماری در دام‌ها دارد.

برنامه سازمان دامپزشکی در مقابله با بیماری کنترل و پیشگیری عامل بیماری می‌باشد.

کنترل بیماری به واسطه واکسیناسیون دام‌های حساس و دو اقدام تشخیص موارد آلوده و کشتار آنها جهت پیشگیری انجام می‌شود(۱).

محصولات تکثیر DNA در نمونه‌های خون مطالعه شده در شکل (۱) نشان داده شده است. تمام نمونه‌ها (PC، ۱، ۲، ۳، ۴، NC) باند ۷۷۰ جفت بازی مربوط به کنترل داخلی را نشان دادند که نشان دهنده صحت انجام مراحل PCR است و باند ۴۶۰ جفت بازی در نمونه‌های کنترل مثبت (PC) و نمونه‌های مثبت (۱، ۲، ۳، ۴) مشاهده شد.

M PC 1 2 3 4 NC



شکل ۱- الکتروفورز بر روی ژل آگاروز و رنگ‌آمیزی به وسیله اتیدیوم برماید

مثبت بودن آزمایش مولکولی سه نمونه با تیتراژ رایت لوله‌ای $\frac{1}{5120}$ و کومبس رایت منفی نشان دهنده حساسیت آزمایش مولکولی جهت تشخیص موارد حاد بیماری می‌باشد.

مثبت بودن آزمایش مولکولی، دو نمونه با تیتراژ $\frac{1}{20}$ و $\frac{1}{80}$ که کومبس رایت آنها $\frac{1}{5120}$ شد نشان دهنده حساسیت آزمایش مولکولی جهت تشخیص موارد مزمن می‌باشد.

اختلاف فراوانی نسبی سرولوژی نسبت به آزمایش مولکولی، ۱۵٪ شد در نتیجه ۱۵٪ از دام‌ها که آلوده نیستند به کشتارگاه اعزام می‌شوند و طبق روال گرامتی به آنها تعلق می‌گیرد؛ و از طرفی موارد منفی کاذب آزمایش‌های سرولوژی (رایت لوله‌ای و 2ME) در دامداری‌ها باقی مانده و سبب انتقال آلودگی در دام‌ها و انسان می‌گردد و واکسیناسیون در چنین دامداری‌هایی ثمره بخش نخواهد بود.

با توجه به اهمیت تشخیص صحیح موارد آلوده در کنترل و پیشگیری بیماری در جوامع دامی و انسانی بنظر می‌رسد استفاده از آزمایش‌های متکی بر تکنولوژی اسیدهای نوکلئیک (PCR) از حساسیت و اختصاصیت مناسبی جهت شناسایی موارد آلوده برخوردار می‌باشند.

و امید است با تداوم سیستم مراقبت اپیدمیولوژیکی با شناخت بموقع و بهنگام بیماری‌های دامی از جمله بروسلوز و ارائه روند آنها در مناطق و زمان‌های مختلف و با بکارگیری راهکارهای ضروری به اهداف این سیستم که قطعاً پیشگیری، کنترل و ریشه کنی بیماری‌ها است دست یابیم.

تشکر و قدردانی

با تشکر از ریاست محترم شبکه دامپزشکی تنکابن جناب آقای دکتر شمس‌پور و پرسنل شبکه آقای دکتر سادات و آقای شریفی که در این پژوهش همکاری قابل توجه داشته‌اند.

شناسایی موارد آلوده توسط آزمایش‌های سرولوژیک رزبنگال، رایت لوله‌ای و 2ME انجام می‌شود و این آزمایش‌ها به علت حساسیت و اختصاصیت پایین، قادر به تشخیص صحیح موارد آلوده نمی‌باشند.

همچنین تشخیص دام مبتلا از طریق کشت میکروبی محدود به موارد خاص بوده و امکان نمونه‌برداری جهت کشت میکروبی در حجم وسیع انجام نمی‌شود (۱، ۱۳، ۱۴).

چندین مطالعه استفاده PCR را برای تشخیص بروسلوز ارزیابی کردند (۱۴، ۱۱، ۵، ۴، ۳، ۲).

در مطالعه‌ای که در شهرستان‌های نور، بابل، قائمشهر صورت گرفت (۲)، از ۴۰۵ نمونه خون انسانی مشکوک به بروسلوز؛ (۵/۷٪) ۲۳ نمونه آزمایش رایت لوله‌ای و 2ME مثبت داشتند که از این ۲۳ نمونه (۳/۲٪) ۱۳ نمونه آزمایش مولکولی آنها مثبت شد اختلاف آزمایش سرولوژی و مولکولی به علت درمان بیماری وجود مهارکننده‌ها (ترکیبات هم و DNA کامل میزبان) بیان شد.

به منظور جلوگیری از منفی کاذب آزمایش مولکولی، کنترل وجود ترکیبات بازدارنده (هم و DNA کامل میزبان) در نمونه‌های خون اهمیت دارد.

در تحقیق حاضر از ۱۰۰ نمونه خون دامی مشکوک به بروسلوز؛ ۲۰ نمونه آزمایش رایت لوله‌ای مثبت و ۵ نمونه آزمایش مولکولی مثبت داشتند که اختلاف فراوانی (۱۵٪) بین آزمایش سرولوژی و مولکولی مشاهده می‌گردد.

که به منظور جلوگیری از موارد منفی کاذب آزمایش رایت لوله‌ای، به علت وجود آنتی بادی‌های بلوک‌کننده (IgG, IgA) و پدیده پرو زون (میزان بالای آنتی بادی در سرم) آزمایش کومبس رایت انجام شده همچنین نوع آنتی بادی یعنی IgM از IgG در بروسلوز توسط آزمایش کومبس رایت مشخص شد. موارد منفی کاذب آزمایش مولکولی با عدم تشکیل باندها مربوط به قطعه ۷۷۰ جفت بازی و ۴۶۰ جفت بازی مشخص شد.

فهرست منابع

- the discovery of the Malta fever's agent to the brucellosis of a marine mammal reservoir, bnjrelloais has Continuosly been a reemerging zoonosis. *Vet. Res.* 36:313-326.
11. Lihan, z. Aksakal, A. Ekin, I.H Guihan, A. Solmaz, H. Erdenlig, S.(2008): Comparison Of Cultur and PCR for the Detection of *Brucella melitensis* in blood and Lymphoid Tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *lett appl Microbiol.* 46:301-306.
 12. Lübeck, P.S. Skurnik, M. Ahrens, P. Hoorfar, J. (2003): A multiplex PCR detection assay for *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9 and *Brucella* spp. based on the perosamine synthetase gene. Application to *Brucella* diagnostics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 529, 451 - 453.
 13. Nielsen, K. Smith, P. Widdison, J. Gall, D. Kelly, L. Kelly, W. Nicoletti, P. (2004): Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia* O157: H7. *Vet. Microbial.* 100:25-30.
 14. Scholz, H.C. Hubalek, Z. Sedláček, I. Vergnaud, G. Tomaso, H. Al Dahouk, S. Melzer, F. Kampfner, P. Neubauer, H. Cloeckaert, A. Maquart, M. Zygmunt, MS.Whatmore, AM. Falsen, E. Bahn, P. Gollner, C. Pfeffer, M. Huber, B. Busse H.J Nockler, K. (2008): *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 375-382.
 1. سازمان دامپزشکی کشور. (۱۳۸۸): برنامه اجرایی بررسی، مبارزه و مراقبت بیماری های دامی: ۱۰-۴ و ۹۱-۶۷.
 ۲. ملکی. م. (۱۳۸۶): اپیدمیولوژی مولکولی بروسلا در مبتلایان به تب مالت استان مازندران، شهرستان های نور، بابل، قائمشهر. پایان نامه کارشناسی ارشد: ۶۱-۵۳.
 3. Al Dahouk, S. Nockler, K., Scholz, H.C. Pfeffer, M. Neubauer, H. Tomaso, H. (2007): Evaluation of genus-specific and specific real- time PCR assays for the identification of *Brucella* spp. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45:1464-1470.
 4. Bogdanovich, T. Skurnik, M. Lubeclek. P.S. Ahrens. P. Hoorfar, J. (2004): validated
 - 5'. Nuclease PCR Assay for rapid identification of the genus *Brucella*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2261-2263.
 5. Bounaadja, L. Albert, B. Chenais , B. Henault, S. Zygmunt, M. poliak , S.Garin-Bastuji, B. (2009): Real- time PCR for identification of *Brucella* spp: Acomparative study of Is 711 , bcp26 and per target genes. *Vet. Mic.* 137: 156-164.
 6. Bricker, B.J. (2002):. PCR as diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.* 90:435-446.
 7. Cloeckaert, A: Grayon, M. Grepinet, O. (2000):. An IS711 element down stream of the bp26 gene is a specific of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7: 835-839.
 8. Foster, G. Osterman, B.S. Godfroid, J. Jacques, I. Cloeckaert, A. (2007): *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2680-2693.
 9. Godfroid, J. Saegerman, C. Walleman, V. Walravens, K. Letesson, J.J. Tibor, A. Mc. Millan, A. Spencer, S., Sanna. M., Bakker, D. 2002. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when a specific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet. Micro boil.* 90:461-477.
 10. Godfroid, J. Cloeckaert, A. Liautard, J.P Kohler, S. Fretin, D . walravens, K. GarinBastuji, B. Letesson, J.J. (2005): From