

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

سید رضا حسینی دوست^{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 بقیه... «ع» - پژوهشکده طب رزمی - مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی - تهران - ایران

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۴/۶/۲۴ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۴/۹/۲۲ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۴/۹/۳۰

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- فوق لیسانس بیوتکنولوژی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۲- دانشیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۳- فوق لیسانس علوم سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۴- فوق لیسانس علوم سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۱- دانشیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع» - نویسنده مسئول

۲- فوق لیسانس علوم سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۳- فوق لیسانس علوم سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

۴- فوق لیسانس علوم سلولی و مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «ع»

حاصله حاکی از کارایی مناسب پرایمرهای مورد استفاده است؛ هر چند حساسیت آنها با آنچه قبلاً گزارش شده بود مطابقت زیادی نداشت. به نظر 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 سلسله‌علایم 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 شش‌گونه 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 آئروسول‌های 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].

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 گزارشات 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

گردید. نمونه‌های دامی پس از آماده‌سازی اولیه و هموژناسیون DNA استخراج شد. آزمایشات ایتیمایز با استفاده از پروتکل‌های استاندارد شروع و سپس شرایط آزمایش بهینه گردید. پس از ایتیمایز 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 سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، انیلینگ در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. مجموع سیکل‌ها ۳۵ و پروتکل نهایی PCR طبق جدول ۱ انجام شد.

جدول ۱: غلظت اجزای متشکله PCR

غلظت نهایی	مقدار نهایی	اجزاء مخلوط اولیه PCR
-	1µl	Template DNA
-	2.5µl	Buffer 10 X
1.5 mM	0.6µl	MgCl ₂
250 µM each	1µl	dNTPs
0.1µ M	0.1µl	Primer F
1 µM	1.2µl	Primer R
1.25 unite	0.5µl	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 سانتی‌گراد نگهداری گردید [۱۸]. سپس طبق پروتکل بهینه شده، کلیه نمونه‌ها با روش PCR آزمایش و محصول نهایی آن (494bp) با برش به وسیله آنزیم اختصاصی Taq1 تأیید گردید.

پرایمرهای مربوط به سکانس ژن (insertion) را سنتز کرده و پس از ایتیمایز 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 جمع‌آوری 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 حتی‌المقدور جمع‌آوری 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 به‌طور کلی دقت و ویژگی گزارش را تأیید کردند و سپس سکانس پرایمرهای 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 سویه‌های استاندارد استخراج شده و با روش اسپکترومتری غلظت DNA در آنها تعیین

نتایج

تنوع و نتایج به دست 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 بروسلاز تشخیص داده شده بودند، تهیه شده بود. همه نمونه‌ها از نظر آزمایش سرولوژی مثبت بوده ولی تنها از شش نمونه (۱۴ درصد) 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. همچنان که 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 به ظاهر حساسیت PCR را کمتر از کشت نشان می‌دهد.

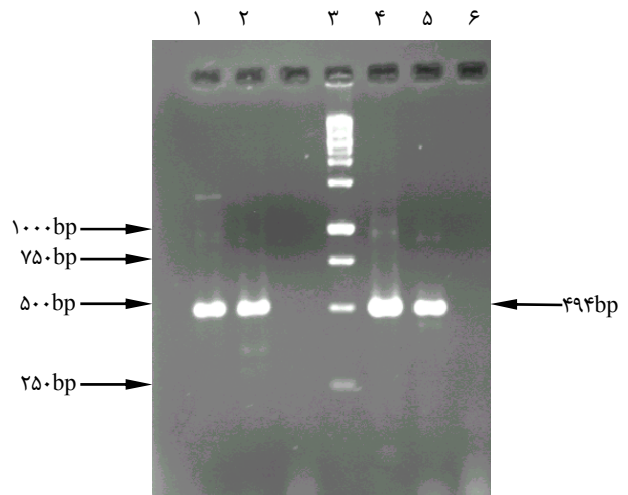
بهینه‌سازی آزمایش PCR و پرایمرهای مورد نظر با ژنوم تخلیص شده سویه استاندارد بروسلا آبورتوس انجام گردید. در شکل ۱ محصول سه سویه S19, S544, S103 ملاحظه می‌شود. محصول ۴۹۴ نوکلئوتیدی توسط برش آنزیمی داده شد. نتیجه آن در شکل ۲ دیده می‌شود. محصول مورد نظر به دو باند ۴۰۲ و ۹۳ نوکلئوتیدی تقسیم شده است. نتایج 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.

جدول ۲: مقایسه نتایج حاصله از آزمایش نمونه‌های دامی

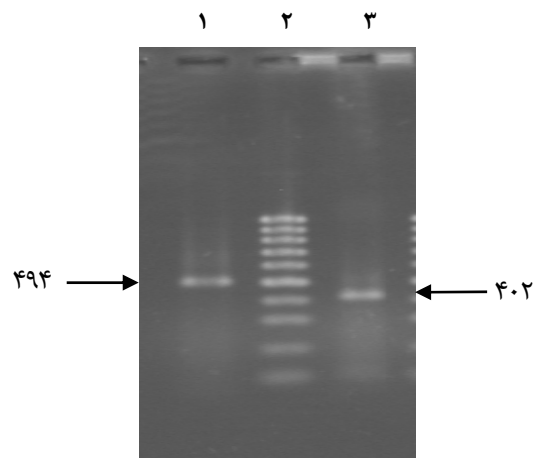
نتایج	نمونه بالینی	شماره	نتایج		
			سرولوژی	کشت	PCR
+	غدد لنفاوی	۱	+	-	+
-	کلیه	۲	+	+	-
+	رحم و جفت	۳	+	+	+
+	پستان	۴	+	-	+
+	رحم و جفت	۵	+	+	+
+	غدد لنفاوی	۶	+	-	+
-	کبد	۷	+	-	-
+	کلیه	۸	+	+	+
+	غدد لنفاوی	۹	+	-	+
-	کبد	۱۰	+	-	-

جدول ۳: مقایسه نتایج به دست آمده از نمونه‌های انسانی

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



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، شماره ۴، 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

بحث

تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز و تعیین هویت گونه‌های بروسلا اساساً بر پایه کشت ارگانیسیم و تعیین ویژگی‌های فنوتیپی آن قرار دارد. این فرآیند ضمن این که 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 کارایی 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 سروولوژی 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 استرپتوکوک بتا همولیتیک، اشرشیا کلی، پروتوس، شینگلا، استافیلوکوک اورئوس، کلبسیلا، اتروباکتر و سودومونا آئروژینوزا با پرایمر مورد نظر آزمایش شدند ولی بر خلاف انتظار باکتری‌های کلبسیلا و

استرپتوکوک 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 بالینی ۸۰ درصد و روش کشت ۱۰۰ درصد 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 این که 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 بروسلاهای 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 نه‌چندان 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 کارایی این ست پرایمر در عمل افزایش یابد. با آزمایش تعداد بیشتری نمونه‌های بالینی (دامی و انسانی) و استانداردسازی، بیش از پیش شرایط کار و کارایی PCR می‌توان به ارزشیابی بیشتر آن پرداخت. به‌هر حال در شرایط فعلی پیشنهاد می‌شود که روش

تشکر و قدردانی

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

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 آزمایشگاه‌هی سریع و حساس، در آزمایشگاه‌های بالینی و نیز تحقیقات اپیدمیولوژی بروسوز جای خود را باز نماید. ارزیابی می‌گردد 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. melitensis*, *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 brucellosis. *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 Microbiol* 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-Ordenez 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 reverse 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 immunosorbent 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 polmonary 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 بروسوز. *مجله نبض*، شماره ششم. ۱۳۷۵. صفحات: ۳۰-۲۶
- ۲۶- عبادی عبدا...، ذوقی اسماعیل. روش‌های آزمایشگاهی استاندارد برای تشخیص بروسوز (سویه‌های بروسلا). انتشارات سازمان دامپزشکی، شماره ۲۴. ۱۳۶۱، صفحات: ۲۷-۱۷.