مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶۵، شماره ۳، ۲۱۵-۲۱۱

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

احمد مرشدی [۱] ملاحت احمدی [۱*] تقی زهرایی صالحی [۲] پریسا سقایی [۳]

۱) گروه میکرو بیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه- ایران.
۲) گروه میکرو بیولوژی، 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 ودام می‌باشد که در حال حاضر اکثر نقاط کشور را به‌شکل مستقیم یا غیر مستقیم متأثر می‌سازد. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی آزمون PCR در تشخیص موارد بروسلوز در دام و مقایسه‌آن با روش‌های سرولوژیک استاندارد می‌باشد. بدین منظور ابتدا نمونه‌های سرمی مثبت از نظر بروسلا از مراکز درمانی جمع‌آوری وآزمایشات رزبنگال وآگلوتیناسیون رایت در لوله (SAT)، بر روی آنها انجام‌گرفت وسپس همین نمونه‌ها موردآزمون PCR قرارگرفتند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد قابل توجهی از نمونه‌های سرمی ارسالی به‌آزمایشگاه‌ها از نظر ابتلا به بروسلوز درآزمون رایت مثبت بودند که از این تعداد ۶۵ درصد درآزمون PCR نیز نتیجه مثبت نشان دادند بدین ترتیب که از تعداد ۲۰ نمونه‌سرم دامی مشکوک به بروسلوز ۶ نمونه (۳۰ درصد) مثبت با عیار ۱:۸۰ وبقیه دارای عیار کمتر از ۱:۸۰ بودند. کلیه نمونه‌ها جهت تأیید تشخیص موردآزمایش PCR قرارگرفتند که نتایج حاصل ازآزمون PCR در ۵ نمونه از بین‌سرم‌های بیمار (عیار ۱:۸۰) و ۶ نمونه با عیار کمتر از ۱:۸۰ باآزمایش رایت هم خوانی داشت درحالی‌که یک نمونه با تیتر کمتر از ۱:۸۰ باآزمایش رایت هم‌خوانی نداشت. مقایسه نتایج حاصل ازآزمون رایت و PCR، ۵۵ درصد هم خوانی بین نتایج این دوروش را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: بروسلوز، رزبنگال، رایت، PCR.

مقدمه

بروسلوز یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک انسان و دام محسوب می‌گردد. عامل بیماری باکتری از جنس بروسلا می‌باشد که هفت گونهٔ بروسلا آبورتوس، بروسلا ملی تنسیس، بروسلاکنیس، بروسلا اویس، بروسلا سوئیس و بروسلا نئوتمه و بروسلا ماریس از آن شناسایی شده است. هر یک از گونه‌ها درمیزبان خاص بیماری‌زائی 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 نازائی 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 جبران ناپذیری که بیماری بروسلوز به صنعت دامداری کشور و همین‌طور بهداشت عمومی جامعه وارد می‌نماید وجود روش‌هایی برای تشخیص صحیح این بیماری ضروری می‌باشد. از جمله این روش‌ها آزمایش‌های رایت و PCR می‌باشد. Al-Jams و همکاران در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که آزمایش رایت 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 ویژگی زیادتر 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). به‌علت قدرت آزمایش PCR در تشخیص میزان کم ارگانیسم‌ها کاربرد آن در تشخیص عفونت‌های باکتریایی به اثبات رسیده است(۷). گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهند که تشخیص DNA بروسلا توسط PCR حساس‌تر از کشت خون و اختصاصی‌تر از آزمون سرولوژیکی 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 ایده آل برای تشخیص بروسلوز می‌باشد(۹).

هدف از تحقیق حاضر ارزیابی آزمون PCR در تشخیص ملکولی بروسلا آبورتوس و ملی تنسیس در سرم دام می‌باشد و همچنین امکان

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۴۴۱-۲۹۷۲۶۱۱ نمابر: ۰۴۴۱-۲۷۷۱۹۲۶ Email: m.ahmadi@mail.urmia.ac.ir

جایگزین کردن آزمون PCR در مواردی که آزمون‌های سرولوژیک 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 لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نمونه‌های سرمی اخذ شده بر اساس آزمایشات اولیه که در آزمایشگاه شبکه دامپزشکی شهرستان ارومیه انجام گرفته بود مشکوک به بروسلا بودند. در بررسی حاضر به‌منظور ارزیابی آزمون PCR در تشخیص موارد بروسلوز دام و مقایسه آن با آزمایشات سرمی رایج، ابتدا آزمایشات رزبنگال، رایت و سپس PCR بر روی نمونه‌های سرمی انجام گرفت.

آزمایش رزبنگال: آنتی ژن رنگی بروسلا آبورتوس سویه۱۹، 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 حفره‌های 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 قرارگرفت و نتایج زیر نور کافی قرائت گردید و کلیه مواردی که کوچکترین اثری از آگلوتیناسیون در آن‌ها مشاهده می‌شد مثبت و برای انجام آزمایشات بعدی در نظر گرفته شد(۳).

آزمایش رایت یا سروآگلوتیناسیون در لوله (SAT): به‌منظور انجام این آزمایش، رقت‌های دوگانه از نمونه‌های 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 سال۱۹۹۹ به ترتیب زیر استفاده شد: کلیه محلول‌های مورد استفاده ۲۰ دقیقه در حرارت اتاق قرارگرفت و محلول لیزکننده ۲۰ دقیقه قبل از مصرف در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده می‌شد.

در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری، ۱۰۰ میکرولیتر سرم و ۵ میکرولیتر پروتئاز اضافه شد، محلول حاصل ورتکس شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

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

به محلول حاصله ۳۰۰ میکرولیتر محلول رسوب دهنده اضافه و میکروتیوب‌ها 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.

مایع فوقانی به آرامی دور ریخته شد و قطرات اضافی لوله به مدت ۲ تا ۳ ثانیه با وارونه کردن میکروتیوب بر روی دستمال کاغذی خشک شد.

یک میلی‌لیتر مایع شستشو به میکروتیوب اضافه و ۱۰ بار میکروتیوب 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 میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در ۵۶ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا خشک شود.

سپس بر روی رسوب حاصله ۳۰ میکرولیتر محلول حل کننده ریخته شد و با تکان دادن به طور کامل حل می‌شد که برای این کار از ورتکس استفاده گردیده DNAهای 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 شد به این صورت که طبق دستور کارخانه سازنده ۴/۵ میکرولیتر از مخلوط اصلی PCR (شامل: dNTPS, PCR buffer, Taq DNA polymerase)، ۲ میکرولیتر (۰/۴μM) از هر یک از پرایمرهای مربوط به ژن B4 و B5(۱۵) مختص *Brucella abortus* (جدول۱)، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده(۱۰ نانوگرم) و ۱۴/۵ میکرولیتر از آب دیونیزه خود کیت در لوله‌های 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 از ۲ میکرولیتر آب دیونیزه استفاده شد. برای شاهد مثبت ۴/۵ میکرولیتر از مخلوط اصلی، ۱۴/۵ میکرولیتر از آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده از کشت خالص B. abortus اضافه شد. سپس میکروتیوب‌های 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 دناتوره 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 می‌شد تا مواد چسبیده به دیواره لوله در ته لوله جمع گردد و آماده الکتروفورز شود.

الکتروفورز محصولات PCR: جهت بارگذاری محصول PCR ژل آگاروز ۲ درصد تهیه گردید(۸). ۸ میکرولیتر از محصول PCR به طور خالص با ۲ میکرولیتر بافر بارگذار، خوب مخلوط و سپس به آرامی داخل چاهک‌های ژل منتقل می‌شد به این ترتیب که در چاهک اول و آخر مارکر SM1211# شرکت فرمنتاز آلمان به میزان ۴ میکرولیتر و در چاهک ماقبل آخر کنترل منفی و قبل از آن کنترل مثبت قرار می‌گرفت و برای حدود

جدول۱- الیگونوکلئوتیدهای پرایمر مورد استفاده در PCR (Vrioni et al., 2004).

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

جدول۲- نتایج حاصل از آزمایشات رز بنگال، رایت و PCR نمونه‌های سرم دامی.

تعداد نمونه	آزمایش رزبنگال	آزمایش رایت	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	+

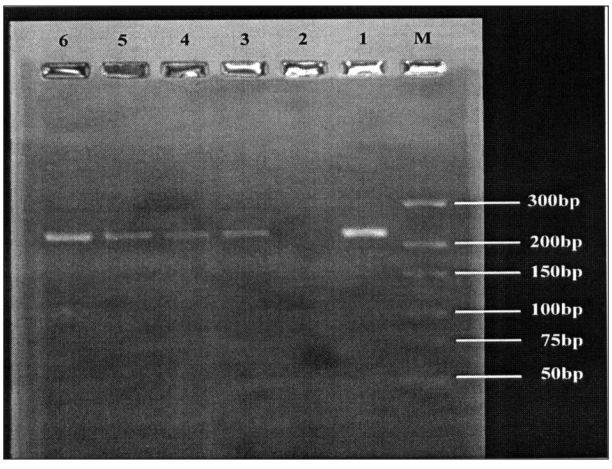
۱۲۰ دقیقه با شدت جریان ۵ ولت بر سانتیمتر، الکتروفورز انجام شد.

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 رایت به‌عنوان آزمون استاندارد برای تشخیص بروسلوزیس بکار می‌رود از این رو داده‌های حاصل از آن به‌عنوان 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، رایت و PCR از ۲۰ نمونهٔ سرم دامی، ۱۵ نمونه دارای آگلوتیناسیون (+) و ۵ نمونه دارای آگلوتیناسیون (++) در آزمایش رزبنگال بودند از بین این نمونه‌ها در آزمون رایت، ۶ نمونه (۳۰ 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 این‌که آزمایش رایت 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 رایت 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



تصویر۱- نتایج باندهای رسوبی حاصل از مارکر، شاهد و ۴ نمونه سرم مورد آزمایش.

PCR نتیجه مثبت داد که با آزمایش رایت مغایرت داشت (جدول۲).

نتایج حاصل از آزمون PCR نمونه‌های سرمی به ترتیب در جدول ۲ و تصویر۱ آمده است. همانگونه که تصویر۱ نشان می‌دهد باندهایی با اندازه ۲۲۰bp در روی ژل نمایان شد.

از راست به چپ: چاهک مارکر (M)، چاهک ۱ شاهد مثبت (بروسلا آبورتوس 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 رایت و PCR نتایج مثبت نشان دادند ۵ نمونه بود و نمونه‌های سرم که آزمون رایت 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 رایت مثبت بود و عیار ۱:۸۰ داشت که در PCR منفی شد و نیز ۸ نمونه که رایت منفی داشتند در PCR نتیجه مثبت نشان دادند. نظر به این‌که آزمایش رایت در لوله یک آزمون استاندارد تشخیص بروسلوز است از این رو نمونه‌ای که رایت مثبت ولی PCR منفی نشان داد به‌عنوان 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 این‌که اصولاً به علت دفع سریع مقادیر زیادی باکتری از خون، DNA باکتری در نمونه سرمی وجود نداشته باشد. در مورد نمونه‌های رایت منفی با عیار کمتر از ۱:۸۰ نظر به این‌که افرادی که عیارهای سرولوژیک زیر ۱:۸۰ نشان می‌دهند ضمن این‌که در حال حاضر بیمار نیستند ولی آلودگی با بروسلا را در گذشته داشته‌اند و به علت این‌که آلودگی با باکتری بروسلا سبب آزاد شدن DNA باکتری در سرم می‌گردد از این رو آزمون PCR در این موارد مثبت می‌گردد

Bailyو همکاران در سال۱۹۹۲ نشان دادند که بروسلا می تواند توسط آزمایش PCR تحت شرایط مناسب تشخیص داده شود و این‌که واکنش متقاطعی بین پاتوژن‌های گرم منفی در غلظت‌های پنج برابر بیشتر از آستانهٔ تشخیص بروسلا، وجودندارد. همچنین آنها تفاوتی بین abortus. B و melitensis. B با استفاده از سویه‌های نوع توصیه شده برای این گونه‌ها از نظر حساسیت یا اندازهٔ محصول تکثیر مشاهده نکردند. آنها نشان دادند که این حساسیت تا حد زیادی زمانی که سیستم برای کل ارگانیسم‌های تخریب شده توسط روش‌های 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 لوکوسیت‌های تهیه شده از خون محیطی یا مغز استخوان توسط روش‌هایی که هم اکنون برای PCR استاندارد هستند، ابزار تشخیصی با ارزش خواهد بود(۶). Fekete و همکاران در سال۱۹۹۲ سیستم PCR را برای تشخیص DNA بروسلا مبتنی بر ژن کد کنندهٔ پروتئین ۴۳ کیلودالتونی غشا خارجی که حساسیت‌های مشابهی با DNA خالص شدهٔ باکتری دارد، توصیف نموده‌اند (۸). Zerva و همکارانش در سال۲۰۰۱ 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 نمونه‌های خون کامل ۶۱ درصد است در حالی‌که با نمونه‌های سرم ۹۴ درصد می‌باشد (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 آزمون‌های 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 نمونه‌ها به روش PCR نتیجه مثبت دادند در حالی‌که فقط ۳ نمونه از ۵۷ نمونه با آزمون‌های سرولوژیک 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 نمونه‌های 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 بروسلوز آزمون PCR می‌تواند به‌عنوان تکمیل کننده روش‌های سنتی و آزمون‌های سرولوژیک و یا کشت باشد(۴). در نهایت با توجه به نتایج تحقیق حاضر و دیگر مطالعات انجام شده در این زمینه می‌توان چنین بیان کرد که آزمون PCR شبیه آزمون‌های جلدی بوده و بیماری بهبود یافته را نمی‌تواند از عفونت فعال تفکیک نماید در نتیجه آزمایش PCR نیز مانند آزمایش‌های جلدی می‌تواند فقط گویای آلودگی با جرم باشد و کاربردی در تشخیص بیماری درمانگاهی نمی‌تواند داشته باشد. همان‌طور که اشاره شد آزمون PCR چه با استفاده از سرم و یا خون کامل نمی‌تواند به‌عنوان یک آزمون غربالی و یا تشخیصی به تنهایی بکار رود بلکه کاربرد این آزمون بیشتر جهت تایید تشخیص‌های سرولوژیک می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بدین وسیله از همکاری جناب آقای دکتر حبیب دستمالچی و سرکار خانم دکتر نوشین آیرملو که در طول این تحقیق ما را یاری فرموده‌اند تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

1. Shimi, A. (1376) Veterinary Medicine, 2nd ed. Jahad-Daneshgahi, University of Tehran. Tehran, Iran.
2. Vojgani, M. (1383) Immunology. (6th ed.) Jahad-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

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 meternal 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 unnsul 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 infections diseases. (3^{th} ed.) Churchill Living Stone, USA.
12. Thrusfield, M. (1999) Veterinery Epidemiology. (2^{nd}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. Quipo-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 immunoassaey 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.

J. Vet. Res. 65, 3:211-215, 2010

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]

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

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

[3]*Graduated 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 Agglutrination 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**