دانشور
پزشکی

مقایسه روش‌های کشت و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با آزمایش رایت در تشخیص بروسلوز

نویسندگان: دکتر محمدحسن قوسیان‌مقدم[*1]، دکتر حسین کیوانی‌امینه[2]، دکتر تقی زهرایی‌صالحی[3]، دکتر پروانه خضرائی‌نیا[3] و نادر فلاح[4]

۱. استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد
۲. استادیار دانشگاه علوم پزشکی ایران
۳. دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
۴. مربی گروه بهداشت، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

* نویسنده مسئول: Email: ghosian@yahoo.com

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال پانزدهم – شماره ۷۴
اردیبهشت ۱۳۸۷

وصول: ۸۵/۶/۱۴
ارسال اصلاحات: ۸۵/۱۱/۸
دریافت اصلاحات: ۸۵/۱۱/۲۵
پذیرش: ۸۵/۱۲/۱۲

چکیده

مقدمه و هدف: بروسلوز هنوز به‌عنوان یک مشکل عمده بهداشتی در انسان محسوب می‌گردد. پاتوژن از طریق شیر نجوشیده یا پنیر تازه به راحتی به بدن انسان منتقل می‌شود. اهمیت بهداشتی و اقتصادی بروسلوز کاربرد روش‌های تشخیصی سریع و حساس را الزام‌آور می‌کند.

مواد و روش کار: در این تحقیق ۱۰۶ نمونه شیر و۱۰۶ نمونه سرم خون از دام‌های شیری ارجاع شده به کشتارگاه‌های شهرستان ری جمع‌آوری گردید. نمونه‌های شیر در محیط اصلاح شده فارل کشت داده شد. همچنین از نمونه‌های شیر DNA مطابق روش رومرو استخراج و با استفاده از پرایمرهای JPR و JPF آزمایش PCR روی آن‌ها صورت گرفت. روی نمونه‌های سرم خون نیز آزمایش استاندارد رایت انجام گردید.

نتایج: در مقایسه بین نتایج کشت و PCR با آزمایش رایت مشخص گردید که در حالی که روش کشت ۳۱/۶ درصد حساسیت و ۴۸ درصد هم خوانی با نتایج آزمایش رایت دارد، PCR ۵۸ درصد حساسیت و ۶۵ درصد هم‌خوانی با نتایج آزمایش رایت را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد PCR می‌تواند به عنوان یک روش سریع و مناسب در تشخیص بروسلا مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: شیر خام، بروسلا، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، کشت میکروبی، آزمایش رایت

مقدمه

علی‌رغم گذشت بیش از ۱۰۰ سال از شناخت باکتری بروسلا، بیماری بروسلوز، هنوز به‌عنوان یک مشکل عمده بهداشتی در انسان و دام به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود. بروسلاها می‌توانند در ۸۰ درصد موارد به صورت مزمن و موضعی در گره‌های لنفاوی فوق پستانی جایگزین شده و از طریق شیر دفع شوند. انسان با مصرف شیر نجوشیده یا پنیر تازه می‌تواند به این بیماری مبتلا شود[۱و۲]. اهمیت بهداشتی و اقتصادی بروسلوز کاربرد روش‌های

تشخیصی سریع و حساس را الزام‌آور می‌کند. درحال حاضر تشخیص بروسلا در شیر عمدتاً شامل جداسازی بروسلا از نمونه شیر یا شناسایی پادتن‌های ضد بروسلا در سرم یا در شیر بوده و جداسازی از طریق کشت و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی صورت می‌گیرد. تشخیص باکتریولوژیک بیماری در انسان به جدا کردن بروسلا از خون و انجام تست‌های باکتریولوژی برای تشخیص بیوتایپ آن بستگی داشته و حداقل ۷ روز به طول می‌انجامد[۳]. تشخیص صحیح بروسلوز مهم‌ترین فاکتور برای درمان و کنترل این بیماری است [۴]. از آن‌جا که برای جداسازی این جرم از شیر نیاز به انکوباسیون طولانی مدت بوده و سروکار داشتن با ارگانیسم زنده مخاطره‌آمیز است و مهم‌تر از همه این‌که کشت میکروبی قادر به تشخیص سریع و دقیق گونه باکتری نیست، جداسازی اولیه باکتری از مشکلات کنونی آزمایشگاه‌های تشخیصی است[۲و۵]. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase chain Reaction) یکی از روش‌هایی است که قادر است به سرعت این باکتری دیررشد را تشخیص دهد[۶]. این روش از حساسیت و ویژگی بسیار بالایی برای تشخیص عوامل بیماریزا برخوردار است [۷و۱]. از این‌رو در این پژوهش حساسیت و ارزش تشخیصی روش‌های کشت، PCR، رایت، در تشخیص باکتری بروسلا در شیر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۱۰۶ دام مشکوک به بروسلوز که به کشتارگاه ارجاع شده بودند با استفاده از تمام چشمه‌های پستانی ^{cc} ۲۰ نمونه شیر اخذ و به آزمایشگاه منتقل ودر یخچال $^{°c}$ ۴ نگهداری شد. همزمان با استفاده از لوله‌های ونوجکت واز وریدِ وداج نیز ^{cc} ۱۰ خون اخذ و پس از انعقاد و سانتریفوژ، سرم جداسازی وتا قبل از انجام آزمایش در فریزر ^{oc} ۲۰ – نگهداری گردید.

- کشت نمونه شیر

cc ۱۵ از نمونه شیر را در ۱۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده وشیر زیر سطح خامه دور ریخته شد. مخلوط ته مانده وخامه در روی بوات دوپتری محیط اصلاح شده فارل به‌وسیله سواپ کشت داده ودر انکوباتور ۳۷°c حاوی ده درصد CO_2 قرار گرفت. نمونه‌ها برای مدت حداقل ۵ روز تا یک هفته در اتو ۳۷ درجه قرار گرفته و موارد منفی تا ۱۴ روز تمدید شد. برای تأیید پرگنه‌های بروسلا آزمایش آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم‌های تک ارزشی A و M روی صفحه انجام گرفت [۸].

– آزمایش سروآگلوتیناسیون کند (داخل لوله‌ای) یا آزمایش رایت:در ۷ لوله آزمایش با توجه به روش استاندارد غلظت‌های ۱:۱۰ تا ۱:۶۴۰ تهیه ودر اتو ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴–۲۰ ساعت نگهداری و سپس نتیجه قرائت شد. عیار نهایی مورد آزمایش عبارت از بالاترین رقتی است که از +۲ تا +۴ آگلوتیناسیون بدهد و کم‌تر از آن صرف نظر شده‌است [۸].

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

الف. استخراج DNA

برای انجام PCR بر روی هر نمونه ابتدا با روش ذیل DNA از نمونه‌ها استخراج گردید[۲و۹].

ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه شیر در یک میکروتیوپ ۱/۵ سی‌سی ریخته شد.سپس بافر NET (Nacl, EDTA, Tris)و NaOH ۲/۶ نرمال وسدیم دودسیل سولفات ۲۴ درصد به ترتیب به مقدار ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر اضافه ومحتویات توسط ورتکس مخلوط شد. مخلوط ۱۰ دقیقه در حرارت ۱۰۰– ۸۰ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه در فریزر قرار گرفت[۹].

بعد از آن آنزیم پروتیناز K ۲ درصد به میزان ۱۵ میکرولیتر اضافه و۳–۲ ساعت در حرارت ۵۰درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۴۰۰ میکرولیتر فنل و کلروفرم به حجم مساوی افزوده و ورتکس گردیده و

سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد.مایع رویی و هم حجم آن کلروفرم و ایزوآمیل الکل با هم مخلوط و مجدداً در همان سرعت به مدت ۶-۵ دقیقه سانتریفوژ گردید.مایع رویی و هم حجم آن ایزوپرپانل و معادل ۰/۱ حجم آن استات سدیم ۲/۵ مولار اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به‌مدت ۱۵دقیقه با همان سرعت سانتریفوژ انجام گرفت. نهایتاً رسوب باقیمانده را با ۳۰۰ تا ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط ودر ۱۲۰۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و پس از خارج کردن مایع رویی، رسوب را خشک کرده و با ۳۰ میکرولیتر بافر TE در ۲۰-درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

ب- انجام PCR

از پرایمر معرفی شده توسط Klevezas و همکاران در سال ۱۹۹۵ به طول ۲۰ نوکلئوتید بنام JPR و JPF استفاده گردید، این قطعه مربوط به پروتئین غشایی خارجی از بروسلا آبورتوس است[۲]. با استفاده از ده میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده و ۴۰ میکرولیتر از محلول کار آماده برابر جدول ۱ و براساس برنامه زیر PCR با روش رومرو در سال ۱۹۹۹انجام گردید[۹]. کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شد.

- مرحله قبل از گرم‌شدن (Pre-heating) در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه.
- مرحله واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه.
- مرحله اتصال در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ثانیه.
- مرحله ساخت در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه.
- مرحله ساخت نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه.

مرحله دوم تا چهارم به تعداد ۳۵ سیکل تکرار گردید.

جدول ۱محلول کار آماده جهت انجام PC

نوع ماده	یک نمونه (میکرولیتر)	۱۳نمونه (میکرولیتر)
PCR Buffer	۵	۶۵
$Mgcl_2$ 50 mM	۳	۳۹
d NTP mix 10mM	۱/۵	۱۹/۵
Primer forward 10µ M	۱	۱۳
Primer Reverse 10 µ M	۱	۱۳
Taq DNA polymerase 5 µ/ml	۰/۳	۳/۹
Sterile double distilled water	۲۸/۲	۳۶۶/۶
جمع کل	۴۰	۵۲۰

ج- الکتروفورز روی ژل آگاروز

۱۵ میکرولیتر محلول PCR را با ۳ میکرولیتر از بافر الکتروفورز (Loading buffer) مخلوط و روی ژل قرار داده و پس از ۳۰ دقیقه در ولتاژ ۱۱۰ نتیجه را بروی دستگاه ترانس ایلومینیتور UV مشاهده و نتایج ثبت گردید[۹].

نتایج

در این تحقیق از ۱۰۶ دام شیری ارجاع شده به کشتارگاه نمونه شیر و خون اخذ شد. نوع نمونه‌گیری غیراحتمالی بود.

الف. نتایج آزمایش رایت

از مجموع ۱۰۶ نمونه سرم خون اخذ شده، پس از انجام آزمایش رایت ۷۹ مورد (۷۴/۵ درصد) در رقت یک هشتادم معادل چهار مثبت بود که به‌عنوان نمونه مثبت تلقی گردید و ۲۷ مورد (۲۵/۵درصد) در رقت مذکور منفی تشخیص داده شد (جدول ۲).

ب: نتایج آزمایش کشت

از مجموع ۱۰۶ نمونه شیر اخذ شده پس از کشت میکروبی در ۲۶ مورد ۲۴/۵ درصد باکتری بروسلا جدا گردید و ۸۰ مورد علی‌رغم نگهداری تا دو هفته در

انکوباتور پاسخ منفی بود. حساسیت و ویژگی کشت در مقایسه با آزمایش رایت به ترتیب ۳۱/۶درصد و ۹۶ درصد و هم خوانی نتایج بین کشت و آزمایش رایت ۴۸ درصد بود (جدول ۳).

ج: نتایج آزمایش PCR

از مجموع ۱۰۶ نمونه شیر اخذ شده پس از استخراج DNA و انجام مراحل آزمایش PCR، ۵۰ نمونه (۴۷درصد) مثبت تشخیص داده شد و در ۵۶ مورد (۵۳درصد) پاسخ PCR منفی بود. حساسیت و ویژگی PCR در مقایسه با آزمایش‌های سرمی از جمله رایت ۵۸ و ۸۵ درصد بود و هم خوانی نتایج بین PCR و آزمایش رایت ۶۵ درصد بود (جدول ۴).

جدول ۲ توزیع فراوانی مطلق و نسبی نتایج رایت، کشت و PCR

روش تحقیق	فراوانی مثبت	درصد مثبت	فراوانی منفی	درصد منفی
رایت	۷۹	۷۴/۵	۲۷	۲۵/۵
کشت	۲۶	۲۴/۵	۸۰	۷۵/۵
PCR	۵۰	۴۷	۵۶	۵۳

جدول ۳ مقایسه نتایج روش کشت و آزمایش رایت

کشت / رایت	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۲۵	۵۴	۷۹
منفی	۱	۲۶	۲۷
	۲۶	۸۰	۱۰۶

جدول ٤ مقایسه نتایج روش PCR و آزمایش رایت

PCR / رایت	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۴۶	۳۳	۷۹
منفی	۴	۲۳	۲۷
	۵۰	۵۶	۱۰۶

بحث و نتیجه گیری

بروسلوز موجب ضررهای اقتصادی زیادی در جهان می‌گردد[۱۰]. سازمان بهداشت جهانی آمار مبتلایان جدید به بروسلوز را در هر سال بیش از ۵۰۰ هزار نفر اعلام کرده‌است[۱۱]. تشخیص متداول این بیماری بر اساس آزمایش‌های سرولوژیک استوار است. اگر چه برترین روش، جدا کردن ارگانیسم است ولی در عمل دارای محدودیت‌های زیادی است. در غیاب کشت‌های مثبت بروسلوز، تشخیص معمولاً به وجود پادتن در سرم، شیر، ترشحات واژن، مایع منی بستگی دارد[۱۲]. بنابراین روش‌های سرولوژیک به‌عنوان یک نشانه غیرمستقیم در تشخیص مورد استفاده است[۱۳]. اگرچه حضور پادتن نیز نمی‌تواند همیشه به عنوان یک نمونه فعال بروسلوز تلقی گردد[۱۰] و باید واکنش متقاطع در حضور سایر بیماری‌های عفونی نیز مورد توجه قرار گیرد [۱۴].

اهمیت بیماری و وجود روش‌های مختلف برای تشخیص آن سبب شده‌است که محققین همواره به‌دنبال به‌دست آوردن راهی جهت تشخیص سریع و دقیق بیماری باشند. انتقال بروسلوز از طریق شیر متداولترین روش اشاعه بیماری محسوب می‌گردد[۲و۱۵]. اکثر دام‌های آلوده از راه شیر میکروب بروسلا را دفع می‌کنند با این حال معمولاً تعداد باکتری بروسلا در کلستروم و همچنین در اواخر دوره شیردهی بیش‌تر است. اگرچه جداسازی و شناسایی باکتری بروسلا تاکنون به عنوان معتبرترین و دقیق‌ترین روش تشخیص به شمار می‌آید ولی این روش با محدودیت‌هایی نیز روبرو است. زمان انکوباسیون کشت طولانی است و پاسخ مثبت در طی ۴ تا ۶ روز و در مواردی تا دو هفته و بیش‌تر و در دو درصد موارد بعد از ۲۷ روز نتیجه مثبت بوده‌است.

تأیید هویت کلنی پس از صرف زمان لازم برای کشت و نیاز به مواد غذایی خاص با شرایط آزمایشگاهی ویژه از جمله محدودیت‌های دیگر این

روش است. ضمن آن‌که در بهترین شرایط و با استفاده ه از تمام مقدورات محیط‌های کشت فقط درصد کمی از جمعیت میکروبی یک نمونه قادر به رشد است و تکرارپذیری آن نیز با توجه به محیط‌های کشت همواره قابل انجام نیست.

در مواردی که تعداد زیادی دام مد نظر باشند انجام این روش همیشه عملی نخواهد بود و سروکار داشتن با ارگانیسم زنده به‌ویژه که برای انسان پاتوژن است از دلایل عدم استقبال تکنسین‌های آزمایشگاه از این روش است [۱،۲،۱۶،۱۷و۱۸].

در این تحقیق از ۲۴/۵ درصد نمونه‌ها باکتری به‌وسیله کشت جداشد. و در مطالعه‌ی صدر بزاز و همکاران در سال ۱۳۷۹ در مشهد بر روی ۲۶۶ گاو بروسلوز مثبت کشتار شده در کشتارگاه، توانستند از ۲۱ درصد نمونه‌ها باکتری را جدا کنند. دکتر ذوقی نیز از کشت ۲۱ نمونه شیر در ۲۸ درصد نمونه‌ها باکتری بروسلا جدا کرد. در ارزیابی کلی با توجه به مشکلات و محدودیت‌های کشت بروسلا به‌ویژه بروسلا آبورتوس که نیازمند وجود CO2 و مدت طولانی کشت است و مخاطرات این روش برای تکنسین‌های آزمایشگاه، یافتن روش جدید که بتواند جایگزین کشت گردیده و از حساسیت قابل‌قبولی نیز برخوردار باشد ضرورت دارد. روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) که در دهه اخیر گسترش قابل توجهی یافته‌است از جمله روش‌هایی است که دارای مزایای بسیاری بوده و تا حدودی محدودیت‌های موجود در کشت را برطرف می‌کند. با استفاده از این روش در کم‌تر از یک روز می‌توان، عامل بیماریزا را مشخص کرد. ویژگی و حساسیت بالای روش PCR می‌تواند به ابزار با ارزشی برای تشخیص بروسلوز تبدیل شده و به‌عنوان یک روش مکمل در تشخیص بروسلوز بکار رود[۱۰و۱۹]. قدرت و قابلیت تکرار در زمان‌ها و مراکز مختلف، سادگی و سرعت قابل‌انجام و عدم واکنش متقاطع با باکتری‌های منسوب و قدرت تشخیص عامل عفونی در نمونه‌های مختلف مرضی و محیطی، به‌ویژه در موارد عود مجدد بیماری، کم خطربودن برای پرسنل آزمایشگاه و نیاز به حداقل نمونه از جمله مزیت‌های این روش است.البته مهم‌ترین محدودیت آن حساسیت بالای PCR است که بایستی مراقبت شدید به‌ویژه از نظر آلودگی نمونه‌ها به عمل آید[۶،۲۰،۲۱و۲۲].

در این تحقیق از مجموع ۱۰۶ نمونه، PCR توانست ۵۰ مورد را مثبت ارزیابی کند که ۴۷ درصد نمونه‌ها است.جداسازی DNA یکی از مهم‌ترین مراحل انجام یک PCR موفق است. ممانعت‌کننده‌هایی نظیر هپارین یا پورفیرین می‌توانند تأثیر گذار باشند.SDS در غلظت بالاتر از یک درصد و مقادیر اندک فنل می‌تواند در PCR دارای اثر بازدارندگی باشد[۹]. یکی از مهم‌ترین اجزا PCR پرایمرها می‌باشند. در این تحقیق از پرایمر JPE و JPR که در ۱۹۹۵ توسط کلوزاس معرفی شده‌است استفاده گردید. حساسیت این پرایمرها جدا کردن کم‌تر از ۱۰ سلول در یک ml شیر بود[۲].

در این تحقیق نتایج حاصل از کشت و PCR بر روی نمونه‌ها مورد مقایسه قرار گرفت ۲۴ نمونه توسط هر دو روش مثبت و ۵۴ نمونه توسط هر دو روش منفی تشخیص داده شد. همخوانی بین این دو روش ۷۳/۵ درصد محاسبه گردید. کلوزاس در سال ۱۹۹۵ در یک مطالعه تجربی با استفاده از پرایمر JPR و JPF بر روی ۲۲ نمونه خون و شیر آزمایش‌هایی انجام داد که در مجموع ۱۴ مورد از آزمایش‌های سرمی مثبت و کشت یک مورد و PCR ۱۱ مورد را مثبت تشخیص داد [۲]. رومرو در سال ۱۹۹۵ با استفاده از دو پرایمر F4 و R2 مقایسه بین کشت و PCR بر روی نمونه شیر انجام داد و بر اساس آن حساسیت PCR نسبت به کشت ۸۷/۵ درصد بود[۲۳]. زروا و همکاران در سال ۲۰۰۱ با استفاده از پرایمر JPF و JPR مقایسه بین سرم خون و خون کامل در انسان به عنوان نمونه مناسب برای تشخیص بروسلوز انجام داد. حساسیت برای سرم خون ۹۴درصد و برای خون کامل ۶۱ درصد عنوان شد که

اثر نوع نمونه را بر روی حساسیت روش در انسان مشخص می‌کند[۲۴]. بیست و شش مورد از نمونه‌هایی که توسط PCR مثبت تشخیص داده شد در کشت میکروبی هیچگونه پرگنه مشاهده نگردید که نظر به محدودیت‌های موجود در کشت باکتری حساسیت این روش را نشان می‌دهد این نتیجه توسط آزمایشات سرمی تأیید گردید. ضمناً ۲ مورد از نمونه‌هایی که در کشت مثبت اعلام شده بود توسط PCR امکان شناسایی فراهم نگردید که با توجه به روش جداسازی DNA از شیر که با استفاده از SDS، پروتئیناز K و فنل است، می‌تواند به‌عنوان عوامل مداخله‌گر مورد توجه قرار گیرد. ضمناً در بعضی مواقع به دلیل ابتلاء دام به بیماری امکان وجود خون در شیر اجتناب‌ناپذیر است که در حین جداسازی DNA ترکیبات مختلف آن می‌تواند روی PCR اثر ممانعت کنندگی مشابه نتایج زروا داشته باشد، البته نوع پرایمر نیز می‌تواند در تشخیص توسط PCR مؤثر باشد. در خصوص آزمایش‌های سرولوژی، طیف وسیع، حساسیت آزمایش، ویژگی کم در مناطق آندمیک، ضعیف‌بودن کارایی در تشخیص بیماری‌های مزمن، حضور واکنش‌های متقاطع پادتن، و مهم‌تر از همه ضرورت داشتن آنتی‌ژن استاندارد و روش سرولوژی استاندارد از مشکلات پیش روی این روش‌ها است[۱۸]. اگرچه دارای مزایایی نیز می‌باشند، اکثر مبتلایان به بروسلوز حاد در تمام آزمایش‌ها واکنش مثبت نشان می‌دهند. تست استاندارد برای مقایسه همه روش‌های تشخیصی آگلوتیناسیون رایت است [۱۱،۱۳و۲۵].

در این مطالعه عیار تست یک هشتادم معادل چهار مثبت که بیش از ۲۰۰ واحد بین‌المللی آنتی‌بادی است به عنوان مثبت تلقی گردید. در مجموع ۷۹ نمونه مثبت و ۲۷ مورد منفی ارزیابی گردیدند. در مقایسه نتایج روش‌های کشت و PCR با آزمایش رایت مشخص شد که در حالی که PCR دارای ۵۸ درصد حساسیت است، روش کشت با۳۱/۶ درصد حساسیت نسبت به آزمایش رایت از حساسیت کم‌تری برخوردار است.

همچنین هم‌خوانی نتایج بین PCR و آزمایش‌های سرمی ۶۵ درصد و هم‌خوانی نتایج کشت و آزمایش‌های سرمی ۴۸ درصد بود که حکایت از هم‌خوانی بیش‌تر تست PCR با روش‌های سرمی است.

در مقایسه نتایج کشت و PCR، حساسیت PCR در مقابل کشت ۹۲/۳ درصد و ارزش اخباری منفی (NPV) ۹۶ درصد محاسبه گردید. نهایتاً در مقابل نقاط ضعف روش کشت همچون طولانی‌بودن زمان،حساسیت پایین و مخاطرات انجام آن برای کارکنان آزمایشگاه روش PCR دارای مزایای مختلفی است. بزرگ‌ترین مزیت آن سرعت انجام آن در کم‌تر از یک روز است. مقدار نمونه مورد نیاز بسیار کم و وجود ارگانیسم زنده ضروری نیست و می‌توان بعد از نمونه‌گیری باکتری را کشت و سپس برای تشخیص ارسال کرد [۲۶]. علاوه بر این در همه نتایج به‌دست‌آمده در تحقیقات مختلف ودر مقایسه دو روش کشت و PCR مشخص شده است که PCR در مقایسه با کشت ضمن حساسیت بیش‌تر می‌تواند میزان بیش‌تری از آلودگی‌ها را تفکیک کند و در همه موارد میزان هم خوانی آن با نتایج آزمایش رایت از همخوانی نتایج کشت و این تست بیش‌تر است.

پیشنهادها

با توجه به محدودیت‌های ذکر شده برای روش‌های تشخیصی بروسلوز ضرورت دارد تحقیقات درخصوص استفاده از روش PCR برای تشخیص بروسلوز ادامه یابد، ازجمله پیشنهاد می‌شود:

۱- تحقیقات به منظور بهبود روش‌های جداسازی DNA از شیر و سایر نمونه‌های مرضی ادامه یابد.

۲- تلاش برای یافتن پرایمرهای مناسب‌تر ومقایسه کارایی پرایمرهای موجود در تشخیص بروسلا انجام پذیرد.

۳- روش‌های مختلف PCR در تشخیص بروسلا با استفاده از نمونه‌های مختلف مرضی مقایسه گردد.

تشکر و قدردانی

از کارکنان و کارشناسان آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و جناب آقای مهندس غفاری و همچنین کارشناسان آزمایشگاه کیوان که ما را در انجام این تحقیق صمیمانه یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Navarro E, Casao Ma, Solera J. Diagnosis of human *Brucellosis* using PCR. Export Rev Mol Diagn. 2004 Jan; 4(1):115-23.

2. Leal- Klevezas, D.S, I.O. Martinez- Vazquez, A. Lopez-Merino, and J.P. Martinez- Soriano. Single-step PCR for detection of *Brucella spp*. From blood and milk of infected animals. J.Clin. Microbiol. 1995.33:3087-3090.

3. Jay E. Gee, Barunk. De, Paul N. Lovett, Anne M. Whitney, Ryan T. Novak, and Tanjo Poporic. Use of 16s rRNA Gene sequencing for Rapid confirmatory Identification of *Brucella* Isolates. Journal of clinical Microbiology. 2004. 42(8):3649-3654.

4. Elfaki MG, AL-Hokail AA, Nakeeb SM, Rabiah FA. Evaluation of culture, tube agglutination، and PCR Methods for the diagnosis of *brucellosis* in humans. Med sci Monit. 2005 11 (11): 69-74.

5. Ouahrani s, s. Michaux, J.S. widoda, G. Bourg, R. Tournebize, M. Ramuz, and J.P. Liautared. Identification and sequence analysis of IS6501, And insertion sequence in *Brucella spp*.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. J.Gen. Microbiol.1993. 139: 3265-3273.

6. Hamdy ME, Aroin As. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. Vet J. 2002 163(3): 299-305.

7. Morata, P., M.I. Queipo- ortuno, J.M. Reauera, M.A. Garlic- Ordonez, C.Pihardo and J. de Dies colmenero. Postreatment follow-up of *Brucellosis* by PCR Assay. J. clin. Microbiol 1999. 37;4163-4166.

۸. عبادی عبدالله، اسماعیل ذوقی. روش‌های آزمایشگاهی استاندارد برای تشخیص بروسلوز و سویه‌های بروسلا.

9. Romero, C. and I. Lopez. Goni. Improved methods for purification of Bacterial DNA from Bovine milk for detection of *Brucella spp*. by PCR. Appl. Environ.Microbiol. 1999.65:3735-3737.

10. Romero, C., C. Gamazo, M. pardo, and I. Lopez- goni. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J. clin. Microbial. 1995.33: 615-617.

11. Plommet, M. Minimal requirements for growth of *Brucella suis* and other Brucella species. Zentralbl. Bakteriol. 1991. 275: 436-450.

۱۲. غفاری مسعود. بررسی سرولوژیک بروسلوز انسان و دام در شهرستان گلپایگان- پایان‌نامه شماره ۲۴۸۰. جهت اخذ درجه دکتری دامپزشکی از دانشگاه تهران ۱۳۷۵.

13. MertA, ozaras R, Tabak F, Bilir M, et al. The sensitivity and specificity of *Brucella* agglutination tests. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003 46(4) 241-3.

14. Yildiz F, Tanyel E, Hatipoglu CA, et al. Evaluation of *Brucella* tube agglutination test in patients with *Brucellosis*, patient with bacterial infections other than *Brucellosis* and healthy subjects. Mikrobiyol. Bul. 2005. 39(2) 211-7.

۱۵. ذوقی اسماعیل، دکتر گیتی ثمر- دکتر عبدالله عبادی. دفع باکتری بروسلا از شیر مادران مبتلا به بروسلوز. مجله دانشور شماره ۱۵و۱۶ سال ۷۶ صفحه ۳۸-۳۵.

16. Georghiou, P. R. and E. J. Young. Prolonged incubation in *Brucellosis*.1991 Lancet. 337;1543.

17. Matar, G. M.,I.A. Khneisser, and A.M. Abdelnoor. Rapid laboratory confirmation of human *Brucellosis* by PCR analysis of target sequence on the 31-kilodalton Brucella antigen DNA.1996 J.Clin. Microbiol. 34:477-478.

18. Viscaino, N., J.M.Verger, M.S.Zygmunt and Axel cloeckaert. DNA polymorphism at the omP-31 locus of *Brucella spp*: evidence a large deletion in *Brucella abortus*, and other species- specific Markers. 1997. Microbiology 143:2913-2921.

19. Manterola L. Tjero-Garces A, Ficapal A, shopayeva G, Blasco JM, Maricm, Lopez- Goni I. Evaluation of PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. 2003. Vet Microbiol. 20; 92(1-2):65-72.

20. Elfaki MG, Uz-zamant, Al-hokail AA, Nakeeb SM. Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with *Brucellosis* by polymerase chain reaction. 2005 Diagn Microbiol Infec Dis. 53(1):1-7.

21. Leyla G, Kadri G, Umran O. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep *Brucellosis* using aborted fetus samples. 2003.vet Microbiol. 2;93(1):53-61.

22. Nimri LF. Diagnosis of recent and relapsed cases of human *Brucellosis* by PCR assay. 2003 BMC Infect Dis. 28;3:5.

23. Romero. C, M. Pardo, M.J. Grillo, R.Diaz, J. Blascoa and i. Lopez Goni. Evaluation of PCR and indirect-ELISA Milk samples for the diagnosis of *Brucellosis* in dairy cattle. 1995. J.Clin. Microbiol. 33:3198-3200.

24. **Zerva, L. K. Bourantas, S. Mitka, A. Kansouzidou and N.J. Legakis. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human *Brucellosis* by PCR. 2001. J.Clin. Microbiol. 39:1661-1664.**

25. **Ciftci C, Ozturk F, Oztekin A, Karaoglan H, saba R, Gultekin M, Mamikoglu L. Comparison of the serological test used for laboratory diagnosis of *Brucellosis*. 2005. Mikrobiyol Bul. 39(3): 291-9.**

26. **Briker B, J., and S.M.Halling. Differentiation of *Brucella abortus bv.1, 2.* and 4 *Brucella melitensi*. *Brucella ovis* and *Brucella suis bv.1* by PCR. 1994. J.Clinical. Microbial. 32:2660-2666.**