Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2012; 15(64): 10-17

Determination of sensitivity and specificity of PCR in diagnosis of human brucellosis

PeeriDogaheh H(PhD)[1]*,Arzanlou M(PhD)[1], Hosseini S(PhD)[2], Habibi N(M.D)[3]

1- Department of Microbiology, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
2- Department of Basic Sciences, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
3- Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Received:1 Nov 2011, Accepted: 10 Jan 2012

Abstract

Background: Brucellosis is one of the most common zoonotic diseases in Iran. In most cases, the diagnosis of brucellosis is difficult not only because of its clinical similarity to many infectious and noninfectious diseases, but also because diagnostic methods often fail to detect organisms. PCR is a rapid and safe diagnostic method applied to the diagnosis of brucellosis. The purpose of this study was to determine the sensitivity and specificity of PCR for diagnosis of human brucellosis by using serum samples.

Materials and Methods: This study which was done to evaluate diagnostic tests included30 serum samples from patients with clinical presentation of brucellosis with positive Wright test and serum samples of30 healthy people with negative Wright test. These samples were examined by PCR.

Results: PCR results were positive for 15 samples of the patients group in comparison with 4 samples from the 30 healthy subjects. The sensitivity and specificity of PCR were 50% and 86.6%, respectively.

Conclusion: Although in some studies, the preferred sample for diagnosis of brucellosis was serum, in this study, PCR on serum samples did not indicate high sensitivity and specificity in diagnosis of brucellosis. Hence, using a combination of methods for diagnosis of human brucellosisis suggested.

Keywords: Brucellosis, PCR, Sensitivity, Specificity

*Corresponding author:
Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Iran
Email: h.peeridogaheh@arums.ac.ir

مقاله پژوهشی
مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 6 (شماره پیاپی 64)، مهر 1391، 17-10

تعیین حساسیت و اختصاصیت روش PCR در تشخیص بروسلوز انسانی

هادی پیری دوگاهه[1*]، محسن ارزنلو[1]، سید سعید حسینی اصل[2]، ندا حبیبی[3]

1- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
2- استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
3- پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: 90/8/11 تاریخ پذیرش: 90/10/21

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام در ایران می‌باشد. در اغلب موارد تشخیص بروسلوز دشوار است و دلیل این دشواری نه فقط به خاطر شباهت بالینی این بیماری با بسیاری از بیماری‌های عفونی و غیرعفونی می‌باشد بلکه هم‌چنین روش‌های تشخیصی در اغلب موارد موفق به جداسازی ارگانیسم نمی‌گردند. یکی از روش‌های تشخیصی سریع و ایمن PCR می‌باشد. هدف این مطالعه تعیین حساسیت و ویژگی روش PCR در تشخیص بروسلوز انسانی با استفاده از نمونه‌های سرم می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع ارزیابی تست‌های تشخیصی می‌باشد. افراد شرکت کننده در این مطالعه شامل 30 فرد دارای علائم بالینی و تست رایت مثبت که گروه بیماران ما را تشکیل می‌دادند و 30 فرد سالم و با تست رایت منفی که گروه شاهد ما بودند. 30 نمونه سرم از افراد گروه بیماران و 30 نمونه سرم از افراد سالم مورد استفاده قرار گرفت. بر روی این نمونه‌ها آزمایش PCR انجام شد.

یافته‌ها: از30 فرد گروه بیماران، 15 نمونه با روش PCR مثبت شدند و از افراد سالم، 4 مورد با روش PCR مثبت شدند. حساسیت روش PCR 50 درصد و ویژگی آن 86/6 درصد تعیین شد.

نتیجه‌گیری: هر چند در تعدادی از مطالعات نمونه ارجح برای تشخیص بروسلوز را سرم می‌دانند، ما به حساسیت و اختصاصیت بالایی برای روش PCR با استفاده از نمونه سرم جهت تشخیص بروسلوز دست نیافته ایم. بدین منظور، استفاده از ترکیبی از روش‌های آزمایشگاهی را برای تشخیص بروسلوز انسانی پیشنهاد می‌کنیم.

واژگان کلیدی: بروسلوز، PCR، حساسیت، اختصاصیت

* **نویسنده مسئول:** اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی
Email: h.peeridogaheh@arums.ac.ir

مقدمه

بروسلوز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی است و بروسلا ملی تنسیس شایع‌ترین عامل ایجاد بیماری می‌باشد. تنها 17 کشور در دنیا به عنوان کشورهای عاری از بروسلوز شناخته شده‌اند(1). بروسلوز در بسیاری از نقاط جهان آندمیک بوده و در کشورهای در حال توسعه از شیوع بالایی برخوردار است. در ایران بروسلوز انسانی در تمام نقاط کشور آندمیک بوده و تعداد بیماران با تشخیص قطعی در سال 1988، هفتاد و یک هزار و پنجاه و یک نفر بودند که یکی از بالاترین مقادیر شیوع در جهان می‌باشد(2). بر اساس اطلاعاتی که مرکز مدیریت بیماری‌های عفونی منتشر کرده است، وضعیت ایران در مورد بیماری بروسلوز در حال بهتر شدن است. در سال 1989 موارد بروز سالیانه بروسلوز بیش از 1000 مورد در هر یک میلیون نفر بود، در حالی که در سال 2003، موارد بروز سالیانه به238/6کاهش یافت. با وجود این هنوز بروسلوز انسانی بار سنگینی را بر جامعه تحمیل می‌کند(3). سازمان بهداشت جهانی تعداد موارد جدید بیماری بروسلوز را در هر سال 500 هزار مورد گزارش نموده است و این مقدار بسیار کمتر از میزان واقعی محاسبه شده بروز بروسلوز انسانی می‌باشد(4). بروسلوز بیماری است با تظاهرات گوناگون که تمام بافت‌ها و اندام‌های مختلف انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. علایم بالینی فوق العاده غیراختصاصی است و تظاهرات بسیار متغیری را نشان می‌دهد. تظاهرات بیماری به صورت یک سندرم تب‌دار همراه با علایم سیستمیک شامل لرز، تعریق، سردرد، کمردرد، بی‌اشتهایی و کاهش وزن بوده و یا به صورت گرفتاری‌هایی مانند آرتریت، اسپوندیلیت، آندوکاردیت، منتژیت، اپیدیدیموارکیت و غیره بروز می‌کند(5).

کشت خون معیار طلائی (Gold standard) تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز می‌باشد. خون محیطی در اغلب موارد جهت جداسازی گونه‌های بروسلا به کار می‌رود. در اشکال حاد بیماری که توسط بروسلا ملی‌تنسیس ایجاد می‌شود، به طور معمول تعداد موارد مثبت کشت خون بالا بوده و در 80-70 درصد کشت خون مثبت می‌گردد. با وجود این، تعداد کشت خون مثبت در مواردی که بیماران برای مدت طولانی دچار بیماری بوده‌اند و یا دچار عوارض موضعی بیماری (منتژیت، اندوکاردیت، اسپوندیلیت و غیره) شده‌اند و یا عامل ایجاد کننده بیماری بروسلا آبورتوس یا بروسلا کانیس باشد، به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد و به ندرت بیش از 30 تا 50 درصد موارد را شامل می‌گردد(5).

بر اساس سیستم‌های کشت اتوماتیک BACTECشناسایی بیش از 95 درصد کشت‌های مثبت بروسلا ملی‌تنسیس در طی 7 روز بعد از انکوباسیون نمونه گزارش شده است. در صورت عدم دسترسی به این سیستم‌های اتوماتیک، برای جداسازی بروسلا نیاز به محیط‌های کشت اختصاصی، انکوباسیون طولانی مدت و کشت متوالی (Subculture) می‌باشد. باید توجه داشت که تکنولوژی پیشرفته معمولاً در کشورهای در حال رشد و در مناطق روستایی که بروسلوز شایع می‌باشد وجود ندارد. علاوه بر این به دلیل زمان تقسیم طولانی این باکتری، گونه‌های بروسلا به آهستگی در محیط‌های کشت اولیه و متوالی رشد می‌نمایند(6).

شناسایی گونه‌های بروسلا در نمونه‌های بالینی توسط کشت خون، روشی مشکل و تأخیری می‌باشد. به علاوه گونه‌های بروسلا جزء پاتوژن‌های کلاس III طبقه‌بندی می‌شوند و بنابراین حمل نمونه و کشت نمونه‌های حاوی این باکتری‌ها، خطر آلودگی پرسنل آزمایشگاه را در بر دارد، به طور که بروسلوز شایع‌ترین عفونت باکتریایی کسب شده از آزمایشگاه می‌باشد(7).

آزمایش‌های سروآگوتیناسیون (رز بنگال، رایت لوله‌ای و کومبس رایت) و روش‌های ایمنوفلورسانس غیرمستقیم، ثبوت مکمل و الیزا نیز برای تشخیص بروسلوز در دسترس می‌باشند(10-8).

روش استاندارد سرولوژیک که سایر روش‌های سرولوژیک باید با آن مقایسه شوند، آزمایش سروآگلوتیناسیون رایت لوله‌ای می‌باشد. حساسیت

تست‌های سرولوژیک بین 65 تا 95 درصد می‌باشد اما ویژگی این تست‌ها خصوصاً در مناطق اندمیک، به دلیل شیوع بالای آنتی‌بادی در جمعیت سالم، پایین می‌باشد(8). علاوه بر این، بیشتر تست‌های سرولوژیک دارای واکنش متقاطع (Cross-reaction) با سایر باکتری‌ها می‌باشند و در خصوص نمونه‌هایی که در ابتدای فاز بیماری به دست آمده‌اند یا نمونه‌هایی که از افرادی که به واسطه شغل خویش در معرض قرار گرفته‌اند یا بیمارانی که اخیراً دچار بروسلوز شده‌اند و یا بیمارانی که دچار عود بیماری شده‌اند، تست‌های سرولوژیک در خصوص این افراد محدودیت زیادی دارند(5، 8).

در اغلب موارد تشخیص بروسلوز دشوار است و دلیل این دشواری نه فقط به خاطر شباهت بالینی این بیماری با بسیاری از بیماری‌های عفونی و غیر عفونی می‌باشد بلکه هم‌چنین روش‌های تشخیصی در اغلب موارد موفق به جداسازی ارگانیسم نمی‌گردند. ابداع تکنیک‌های جدید تشخیصی که از یک طرف منجر به ردیابی و شناسایی سریع بروسلا شود و از طرف دیگر خطر عفونت با این باکتری را در آزمایشگاه به حداقل برساند از اهمیت بالایی برخوردار است، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (Polymerase Chain Reaction-PCR) از جمله روش‌هایی است که این مزایا را دارد. تزاید DNA با روش PCR جهت تشخیص چندین بیماری که توسط باکتری‌هایی با رشد کند یا باکتری‌های مشکل پسند ایجاد می‌شود به کار رفته است. نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف نشان می‌دهد که PCR بسیار حساس‌تر از کشت خون و بسیار اختصاصی‌تر از تست‌های سرولوژیک در تشخیص بروسلوز می‌باشد. به علاوه، به علت سرعت روش PCR در تشخیص بروسلوز و کاهش خطر آلودگی جهت کارکنان آزمایشگاه و تشخیص مقادیر بسیار کم DNA در خون یا سرم، به ابزار بسیار مفیدی برای تشخیص بروسلوز تبدیل شده است(11، 12).

در چندین مطالعه نشان داده شده است که DNA پاتوژن‌ها در نمونه‌های سرم وجود دارد(13،14) و در مطالعه‌ای که در یونان توسط زروا و همکاران صورت گرفته نشان می‌دهد که با توجه به وجود بسیاری از مهار کننده های که در خون محیطی وجود دارند، سرم نمونه بهتری برای تشخیص بروسلوز در مقایسه با خون تام می‌باشد(15). هدف این مطالعه تعیین حساسیت و ویژگی روش PCR با استفاده از نمونه سرم در تشخیص بروسلوز انسانی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع ارزیابی تست‌های تشخیصی می‌باشد. در ابتدا سی نمونه سرم از افرادی که دارای علائم بالینی بروسلوز و تست رایت مثبت بودند و30 نمونه سرم از افرادی که بدون علائم بالینی و تست رایت منفی بودند، تهیه شد. بعد از تهیه سرم تست سرولوژیک رایت لوله‌ای با کیت تهیه شده از انستیتو پاستور ایران که حاوی آنتی ژن بروسلا آبورتوس بود بر اساس دستور العمل کیت انجام شد.

جهت استخراج DNA از به روش Crude nucleic Acid extraction استفاده شد.

در این روش چند کلونی باکتری را در آب مقطر دو بار تقطیر به صورت سوسپانسیون در آورده و به مدت10 دقیقه می‌جوشانیم و در مرحله بعد بقایای سلولی را توسط عمل سانتریفیوژ رسوب می‌دهیم. مایع روئی حاوی DNA را به ویال دیگری منتقل کرده و غلظت و میزان خلوص DNA توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌گردد. در مواردی که به DNA کامل و شکسته نشده احتیاج نمی‌باشد، برای مثال در خصوص PCR موارد تشخیصی، این روش استخراج DNA روشی مناسب برای بروسلا می‌باشد زیرا عمل جوشانیدن باعث مرگ باکتری‌های پاتوژن شده و خطر آلودگی برای پرسنل آزمایشگاه ندارد. از این DNA برای کنترل مثبت و راه انداز روش کار استفاده شد.

برای استخراج DNA از سرم، از کیت شرکت سیناژن استفاده شد.

برای انجام آزمایش PCR از پرایمرهائی با توالی زیر استفاده شد:

F4 (5'-TCG AGC GCC CGC AAG GGG-3')

R2(5'-AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA-3')

پرایمر F4/R2 به طور اختصاصی موجب تکثیر یک قطعه 905 جفت باز از RNA ریبوزومی می‌شودکه به تعداد چند کپی در ژنوم باکتری وجود دارد. با توجه به این که چندین کپی از ژن 16 srRNA که توسط پرایمر F4/R2 تکثیر می‌شود در ژنوم باکتری بروسلا وجود دارد، انتظار می‌رودکه این پرایمر حساسیت مناسبی به DNA باکتری بروسلا داشته باشد به همین دلیل این پرایمر برای واکنش انتخاب شد(16).

برای تهیه محلول کار 5 میکرولیتر از پرایمرR4 با غلظت 100 پیکومولار و 5 میکرولیتر از پرایمر R2 با غلظت 100 پیکومولار به حجم 100 میکرولیتر رسانده شد. بدین‌ترتیب غلظت نهایی هر کدام از پرایمرها در محلول به دست آمده 5 پیکومول می‌باشد.

دما، زمان و تعداد سیکل‌ها در واکنش PCR برای پرایمرهای F4/R2 در جدول 1 ارائه شده است.

جدول 1. شرایط واکنش PCR برای پرایمرهایF4/R2

مراحل واکنش زنجیره ای پلی مراز	زمان	دما (سانتیگراد)
واسرشت اولیه	5 دقیقه	95
واسرشت	45 ثانیه	94
اتصال پرایمر به اسید نوکلئیک الگو	1 دقیقه	60
مرحله طویل شدن	45 ثانیه	72
طویل شدن نهایی	10 دقیقه	72

غلظت مناسب ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR بر روی نمونه های سرمی در جداول 2 و 3 نشان داده شده است.

جدول 2. غلظت مواد مورد استفاده جهت واکنش (Master Mix)PCR

مواد	در هر میلی لیتر
آب مقطر دیونیزه	820 میکرولیتر
بافر 10X PCR	120 میکرولیتر
مخلوط دی نوکلوتیدهای تری فسفات 10 میلی مولار	24 میکرولیتر
کلرید منیزیم 50 میلی مولار	34 میکرولیتر

جدول3. مقدار مواد مورد نیاز برای انجام هر واکنش PCR

ماده	هر نمونه
1/5 میکرومول مستر میکس	20 میکرولیتر
پرایمر F4/R2	0/5 میکرولیتر
Taq DNA پلیمراز	0/2 میکرولیتر
DNA الگو	5 میکرولیتر

از هر کدام از DNA های استخراج شده نمونه‌ها به میزان 5 میکرولیتر DNA به واکنش PCR اضافه شد. حجم واکنش PCR ، 25 میکرولیتر می‌باشد. در واکنش PCR از DNA استخراج شده از باکتری بروسلا به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

پس از انجام عمل PCR بر روی DNAهای استخراج شده از سرم؛ قطعات DNA تکثیر یافته توسط PCR روی ژل آگاروز 1 درصد الکتروفورز شدند. برای رنگ آمیزی قطعات DNA از اتیدیوم بروماید به مقدار 0/5 میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد.

یافته ها

از 60 نمونه که شامل 30 بیمار دارای علائم بالینی و تست رایت مثبت و 30 نمونه بدون علائم بالینی و تست رایت منفی بودند؛ نمونه‌گیری شد و از سرم آنها با استفاده از کیت شرکت سیناژن، DNA استخراج شد و بر روی آنها واکنش PCR انجام شد.

از 30 نمونه‌ای که دارای علائم بالینی و تست رایت مثبت بودند تنها 15 نمونه با روش PCR مثبت شدند و از 30 نمونه‌ای که بدون علائم بالینی و تست رایت منفی بودند، 4 نمونه با روش PCR مثبت شدند(جدول 4).

جدول 4. نتیجه ی PCR نمونه‌های سرم

نتایج PCR / نتایج سرولوژی	PCR مثبت(درصد)	PCR منفی(درصد)	جمع
سرولوژی مثبت	(50)15	(50)15	30
سرولوژی منفی	(13/4)4	(86/6)26	30
جمع	19	41	60

چنانچه موارد مثبت PCR با تیترهای آنتی بادی بیماران سنجیده شود می‌توان دریافت که هر چه تیتر آنتی بادی افزایش یابد احتمال مثبت شدن PCR درآن نمونه افزایش می‌یابد و بیشترین درصد موارد PCR در بیماران با تیتر 1/640 دیده شد(جدول 5).

جدول 5. مقایسه تیتر آنتی بادی با نتایج روش PCR

تیتر رایت	تعداد	PCRمثبت (درصد)	PCR منفی (درصد)
1/160	3	0	(100)3
1/320	11	(54/5)6	(55/5)5
1/640	16	(56/3)9	(43/7)7
جمع	(100)30	(50)15	(50)15

بر اساس نتایج حاصل از PCR بر روی نمونه‌های سرم، حساسیت مطالعه ما 50 درصد و ویژگی آن 86/6 درصد بود.

بحث

اصولا دقت PCR به عوامل متعددی از جمله به مقدار DNA موجود در نمونه بالینی و به تعداد باکتری‌های زنده یا مرده موجود در آن بستگی دارد. هم‌چنین عوامل مهار کننده PCR مانند هموگلوبین نیز در دقت آن تاثیر گذار می‌باشد. بر اساس نتایج این مطالعه PCR می‌تواند در تشخیص سریع بیماری بروسلوز موثر باشد ولی موارد منفی کاذب آن قابل توجه بود (حساسیت PCR در مطالعه حاضر 50 درصد بود).کم بودن دقت تام PCR را می‌توان به اشتباه‌های تکنیکی، عدم کارائی مواد شیمیائی مصرفی، کم بودن مقدار DNA در نمونه سرم، مزمن شدن بیماری و جایگزین شدن باکتری بروسلا در ماکروفاژها و نیز مصرف قبلی آنتی بیوتیک‌ها نسبت داد. در تمام این موارد جواب آزمایش PCR می‌تواند منفی کاذب شود.

عامل دیگری که می‌تواند در نتایج PCR موثر باشد روش استخراج DNA از نمونه بالینی است که ما در این مطالعه از کیت شرکت سیناژن استفاده کردیم. با توجه به این که در این مطالعه حاضر از نمونه سرم استفاده شده است و به طور طبیعی میزان DNA باکتری بروسلا در سرم بسیار کم است، به این دلیل این مرحله در نتایج مطالعه بسیار تاثیر گذار است. اولین بار زروا(15) برای تشخیص بروسلوز از سرم بیماران استفاده کرد. او و همکاران در مطالعه خود به مقایسه نتایج PCR نمونه‌های خون تام و سرم بیماران پرداختند. آنها اعلام کردند که سرم نمونه بهتری در مقایسه با خون کامل جهت تشخیص بروسلوز می‌باشد و دلیل این امر را فقدان مهار کننده‌های PCR در سرم دانستند. حساسیت و ویژگی مطالعه زروا به ترتیب 94 و 100 درصد بود در حالی که حساسیت و ویژگی مطالعه ما به ترتیب 50 و 86/6 درصد بود. در مطالعه دیگری که توسط اورتنو و همکاران(17) در اسپانیا انجام شد حساسیت و ویژگی آن به ترتیب 93 و 95 درصد بود. ویژگی این مطالعه تقریباً برابر مطالعه حاضر بود، در حالی که حساسیت این مطالعه بسیار بیشتر از مطالعه حاضر بود. علت تفاوت نتایج این دو مطالعه را در مقایسه با مطالعه حاضر می‌توان به تفاوت پرایمرهای استفاده شده (در مطالعه زروا از پرایمر B4 و B5 و در مطالعه حاضر از پرایمر R2 و F4 استفاده شده است) و تفاوت در مرحله بیماری (بیماران زروا و اورتنو در مرحله حاد بیماری بودند در حالی که در این مطالعه اطلاع دقیقی از مرحله بیماری بیماران در دسترس نبود) و هم‌چنین تفاوت در روش استخراج DNA از سرم بیماران نسبت داد(15، 17).

چنانچه ما در مطالعه خود از سرم افرادی که از نظر کشت خون مثبت بودند، استفاده کرده بودیم دقت آزمایش ما افزایش می‌یافت و نتایج حاصل بسیار دقیق‌تر و قابل اطمینان‌تر می‌شد که این یکی از محدودیت‌های مطالعه بود. هم‌چنین می‌توانستیم علاوه بر سرم از نمونه خون تام بیماران نیز استفاده نمائیم در حالی که از این نمونه نیز استفاده نشد زیرا بر اساس نتایج حاصل از مطالعه "زروا" و "اورتنو" تصور ما بر ارجح بودن نمونه سرم در مقایسه با خون تام در تشخیص بروسلوز انسانی بود.

بر اساس نتایج این مطالعه که هر چه تیتر آنتی بادی ضد بروسلا بالاتر باشد میزان موارد مثبت بیشتر می‌شد، چنانچه نمونه‌های سرم از افرادی که تیتر بالاتر آنتی بادی

علیه بروسلا داشتند تهیه می‌شد تعداد موارد مثبت مطالعه ما بیشتر و در نتیجه حساسیت آن بالاتر می‌رفت.

هم‌چنین عوامل دیگری که می‌توانست باعث افزایش حساسیت مطالعه شود شامل افزایش تعداد سیکل‌های PCR، استفاده از مقدار بیشتری از سرم جهت استخراج DNA بروسلا و به کار بردن مقدار بیشتری از DNA استخراج شده در هر واکنش را می‌توان نام برد.

نتیجه گیری

هر چند در تعدادی از مطالعات نشان داده شده است که نمونه ارجح برای تشخیص بروسلوز سرم می‌باشد مطالعه حاضر به حساسیت و اختصاصیت بالایی با استفاده از نمونه سرم جهت تشخیص بروسلوز به روش PCR دست نیافت. بدین منظور، استفاده از ترکیبی از روش‌های آزمایشگاهی را برای تشخیص بروسلوز انسانی پیشنهاد می‌کنیم.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه دکتری پزشکی عمومی خانم ندا حبیبی که با شماره 0352 در دفتر پایان‌نامه‌های دانشکده پزشکی اردبیل ثبت شده، استخراج شده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به دلیل حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

منابع

1. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis. 1997 1997 Apr-Jun;3(2):213-21.
2. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet Microbiol. 2002 Dec; 90(1-4): 81-110.
3. Maleknejad P, Hashemi F, Fatollahzadeh B, Jafari S, Peeri Dogaheh H. Direct urease test and Acridine Orange staining on Bactec blood culture for rapid presumptive diagnosis of Brucellosis. Iranian J Publ Health. 2005; 34(3): 52-55.
4. Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, Sánchez-De-Mora D, Delgado M, Causse M, et al. Complications associated with Brucella melitensis infection: a study of 530 cases. Medicine (Baltimore). 1996 Jul; 75(4):195-211.
5. Doganay M, Aygen B. Human brucellosis: an overview. International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2003; 7(3):173-82.
6. Yagupsky P. Detection of Brucellae in blood cultures. J Clin Microbiol. 1999 Nov; 37(11): 3437-42.
7. Richmond JY, McKinney RW, Control CfD, Health NIo. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: U.S. Government Printing Office; 1993.
8. Ariza J, Pellicer T, Pallarés R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. Clin Infect Dis. 1992 Jan; 14(1): 131-40.
9. Moyer NP, Evins GM, Pigott NE, Hudson JD, Farshy CE, Feeley JC, et al. Comparison of serologic screening tests for brucellosis. J Clin Microbiol. 1987 Oct;25(10):1969-72.
10. Mandell G, Bennett J, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1995.
11. Matar GM, Khneisser IA, 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 Feb; 34(2): 477-8.
12. Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Pichardo C, Colmenero JD. Posttreatment follow-Up of brucellosis by PCR assay. J Clin Microbiol. 1999 Dec; 37(12): 4163-6.
13. Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, et al. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. J Clin Microbiol. 1999 Apr;37(4):925-30.
14. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. J Med Microbiol. 1995 Aug; 43(2): 110-4.
15. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum is the

preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. J Clin Microbiol. 2001 Apr;39(4):1661-4.
16. Navarro E, Escribano J, Fernández J, Solera J. Comparison of three different PCR methods for detection of Brucella spp in human blood samples. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002 Oct; 34(2): 147-51.
17. Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P. Comparison between LightCycler Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. Clin Infect Dis. 2005 Jan;40(2):260-4.