طراحی فرایندی حساس به منظور تشخیص سریع بروسلوز انسانی در سرم آلوده بر پایه واکنش زنجیره ای پلیمراز

اسلام قزل سفلی[1]، حسین آقاملایی [2*]، بهمن تبرایی [3] ، ناصر هرزندی[4]، آذر سبکبار[5]، مرضیه زمانی[6]، ایوب خسروی[7]، محمد هیئت[2]، عاطفه یاعلی[8]

1 .کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاداسلامی واحد کرج
2.کارشناس ارشد سلولی و مولکولی- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تهران
3. دکترای تخصصی میکروبیولوژی صنعتی ، موسسه تولیدی تحقیقاتی پاستور کرج
4.دکترای تخصصی میکروبیولوژی دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاداسلامی واحد کرج
5. دکترای تخصصی قارچ شناسی پزشکی، گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاداسلامی واحد کرج
6.کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاداسلامی واحد شاهرود،
7.دکترای تخصصی پزشکی مولکولی، دانشکده فن آوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان
8.دانشجوی پزشکی عمومی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم

*** نشانی برای مکاتبه:** تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، تلفکس: aghamolaei22@gmail.com.02182482549

دریافت مقاله: فروردین نود و دو پذیرش برای چاپ: تیر نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: *بروسلوز یک بیماری مشترک انسان و دام و قابل انتقال به انسان می باشد و به عنوان یک مشکل بهداشتی جدی در بسیاری از کشورهای درحال توسعه مطرح است. لذا نیازمند یک روش سریع و در حین حال دقیق جهت تشخیص می باشد. هدف این مطالعه توسعه روش PCR در نمونه های سرم آلوده شده مصنوعی به عنوان یک مدل جهت تشخیص آزمایشگاهی سریع و دقیق بروسلوز انسانی بود.*

روش کار: *ابتدا سویه استاندارد بروسلا آبورتوس (2308) در محیط بروسلا آگارکشت داده شد و سپس کلونی های باکتری، به وسیله فرمالین10% غیرفعال گردیدند. سپس DNA ژنومی از کلونی های باکتریایی غیرفعال استخراج گردید. رقت های سریالی از DNA باکتریایی به وسیله سرم گوساله جوان (FBS) و آب دوبار تقطیر تهیه شد و DNA این نمونه های آلوده شده تخلیص گردید. با استفاده از دو جفت پرایمر مورد استفاده، دو قطعه ژن مختلف شامل:یک ژن کدکننده پروتئین غشای خارجی(omp-2) (پرایمرهای JPF/JPR) و یک توالی 16SrRNA در بروسلا آبورتوس (پرایمرهای F4/R2) تکثیر گردیدند.*

یافته ها: *تفاوت حساسیتی که دو پرایمر مورد استفاده در تشخیص DNA بروسلا نشان دادند، بین 5 پیکوگرم تا 50 پیکوگرم در نمونه های سرم مصنوعی آلوده شده و 50 فمتوگرم تا 5 پیکو گرم در نمونه های کنترل بود. لذا، حساسیت PCR با استفاده از پرایمرهای F4/R2 بیشتر از PCR با پرایمرهای JPF/JPR بود.*

نتیجه گیری: *هرچند حساسیت روش PCR با این پرایمرها تحت تاثیر مهارکننده های سرمی بود ولی هنوز آنها می توانند ابزار مفیدی برای تشخیص بروسلوز انسانی باشند .*

واژگان کلیدی: *بروسلوز، بهینه سازی، پی سی آر، Omp2*

مقدمه

بیماری بروسلوز جزء شایع ترین بیماری های باکتریایی مشترک انسان و دام است که در انسان ایجاد تب مالت نموده و خسارات اقتصادی بالایی را در حیوانات اهلی به بار می آورد(3-1). این بیماری یکی از مشکلات بهداشتی در سطح جهان خصوصا" کشورهای در حال توسعه محسوب می شود(4). هر ساله حدود نیم میلیون نفر به این بیماری مبتلا می شوند و بروز سالیانه آن در برخی کشورها به ده مورد در هر 100 هزار نفر می رسد(1). بروسلوز در بخش های خاصی از ایران آندمیک است و شیوع آن بین 0.5% تا 10.9% در استانهای مختلف متغییر است(5). مطالعه ای که در شمال ایران انجام شده نشان می دهد مهمترین عوامل خطرزای بروسلوز در ایران شامل: مصرف پنیر تازه (22.4%)، دام پروری (11.3%)، کار در آزمایشگاه (8.1%) و دامپزشکان (1.5%) (6) است.

اهمیت بهداشتی و اقتصادی بیماری بروسلوز روش های تشخیصی سریع را می طلبد. تشخیص بروسلوز عمدتا"مبتنی بر روش های آزمایشگاهی میکروبیولوژیک و سرولوژیک است(7). ارزش تشخیصی سنجش های آنتی بادی در مراحل اولیه بیماری بخاطر حساسیت پائین، واکنش های متقاطع سرولوژیک و عدم تمایز بین عفونت فعال و غیر فعال رضایت بخش نیست(8). باکتری را می توان با کشت خون در آزمایشگاه تشخیص داد که استاندارد طلایی تشخیص آزمایشگاهی نیز محسوب می شود، هرچند حساسیت این روش پائین بوده و بین 15 تا 70 درصد متغییر است(9). از طرفی روش کشت روش سریعی نیست و تماس مستقیم باکتری زنده با کارکنان آزمایشگاه خطرناک می باشد(10).

تکنیک های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک (نظیر PCR) که توالی های 16Sr RNA(8) و ژنهای کد کننده پروتئین های مختلف غشای بیرونی(11) را هدف قرار می دهند، بخاطر حساسیت و اختصاصیت بالا و زمان تشخیصی نسبتا" کوتاه با هدف غلبه بر محدودیت های روش های فوق توسعه یافتند(۴،۳). تمامی این سیستم های PCR محصول DNA مجزایی تولید می کنند که طول این محصولات برای تمام گونه های بروسلا اختصاصی و یک سان است(3). در اکثر این مطالعات از DNA استخراج شده از کشت های خالص استفاده شده(14-11). اما تعداد کمتری از این مطالعات بر روی خون حیوانات (8, 11, 15) و انسان صورت پذیرفته است(4, 11, 16). در این مطالعه با آلوده ساختن سرم، به عنوان جای گزین خون، و آب مقطر، به عنوان کنترل، با DNA بروسلا، به عنوان مدل، توسعه روش PCR جهت تشخیص آزمایشگاهی سریع و دقیق بروسلوز انجام شد.

روش کار

سویه استاندارد بروسلا آبورتوس(2308) از بخش باکتریولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهیه و تحت شرایطc. 37 ، 5% دی اکسیدکربن و مدت زمان 48 ساعت برروی محیط بروسلا-آگار کشت داده شد. سپس کلونی ها از سطح محیط کشت جداسازی شده و با استفاده از فرمالین 10% غیرفعال گردیدند. باکتری های کشته شده تا زمان تخلیص DNA در دمای 4ċ نگه داری شدند. هم چنین 20 نمونه سرمی آلوده به بروسلوز نیز از آزمایشگاه تحقیقاتی باکتریولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تهیه و تا زمان تخلیص DNA در دمای 4ċ نگهداری شدند.

برای استخراجDNA از باکتری و سرم FBS آلوده شده در مرحله اول، استخراج DNA از باکتری بروسلا با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت کیاژن، ساخت کشور آلمان و بر طبق دستورالعمل مربوطه انجام شد. در مرحله دوم، طی فرآیند آلوده سازی مصنوعی رقت های مختلفی (از 5 ng تا 5 fg) از DNA باکتری درون سرم FBS تهیه گردید و مجددا" استخراج DNA از نمونه های سرمی آلوده شده به روش گفته شده انجام شد. تمامیDNA های استخراج شده جهت استفاده های بعدی در دمای 20ċ- نگهداری شدند.

برای تکثیر اسید نوکلئیک با روش PCR از دو جفت پرایمر برای تکثیر اختصاصی دو ناحیه از ژنوم بروسلا استفاده شد: (1) پرایمرهای اختصاصی (F4/R2) توالی 16S rRNA بروسلا آبورتوس که قطعه ای به طول 905 bp را تکثیر می کردند و (2) پرایمرهای اختصاصی (JPR/JPF) توالی ژن کدکننده پروتئین غشاء خارجی (omp-2) که قطعه ای به طول 193 bp را تکثیر می کردند(جدول 1). توالی قطعات تکثیر شده در تمامی گونه های بروسلا مشترک بوده و در تمام بیووارهای این جنس یافت می شوند.

جدول 1 . مشخصات پرایمرهای اختصاصی جهت تشخیص DNA بروسلا به روش PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر	ژن هدف	طول قطعه	منبع
F4/R2	5´- TCG AGC GCC AAG GGC- 3´ 5´- AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA- 3´	16S rRNA *بروسلا آبورتوس*	905 bp	(8)
JPF/JPR	5´-GCG CTA AGG CTG CCG ACG CAA-3´ 5´-ACC AGC CAT TGC GGT CGG TA-3´	ژن کدکننده پروتئین غشاء خارجی (omp-2)	193 bp	(11)

واکنش اولیه PCR برای هردو ژن با حجم نهایی 25 µl، بدون روغن معدنی و با محتویات: انجام پذیرفت : 2.5 µl بافر 10x دارای یون منیزیم با غلظت نهایی 1.5 mM، 100ng از هر پرایمر (F/R)، 100Mm از مخلوط dNTPs، 2.5 واحد آنزیم SmarTaq DNA Polymerase ، 200ng از DNA الگو و مابقی آب مقطر تزریقی انجام پذیرفت.
برنامه PCR برای ژن omp-2 برای دستگاه ترموسایکلر به صورت: (1) دناتوراسیون اولیه (95 ċ, 5 min) یکبار (2) تکرار 30 مرحله ای دناتوراسیون (94 ċ, 30 sec)، اتصال (63.8 ċ, 30 sec) و گسترش (72 ċ, 30 sec). و نهایتا" گسترش نهایی (72 ċ, 5 min) یکبار. برنامه PCR برای ژن 16S rRNA بدین صورت برای دستگاه ترموسایکلر تعریف شد: (1) دناتوراسیون اولیه (95 ċ, 5 min) یکبار (2) تکرار 30 مرحله ای دناتوراسیون (94 ċ, 30 sec)، اتصال (48.3 ċ, 45 sec) و گسترش (72 ċ, 60 sec). و گسترش نهایی (72 ċ, 5 min) یکبار تعریف شد.

در راستای بهینه سازی روشPCR برای تکثیر ژن های omp-2و 16SrRNAغلظت MgCl2، میزان آنزیم SmarTaq پلیمراز، غلظت DNA الگو، غلظت نوکلئوتیدها و دمای اتصال بهینه سازی گردید. جهت تعیین ویژگی از DNA استخراج شده سویه های استانداردی شامل: ای. کولای، یرسینیا انتروکولیتیکا، لیستریا منوسایتوژنز، شیگلا دیسنتریا، فرانسیسلا تولارنسیس و سالمونلا تیفی، استفاده شد که تظاهرات بالینی آنها مشابه تظاهرات بالینی بروسلوز است. جهت تعیین حساسیت روش PCR برای هر دو ژن omp-2 و 16SrRNA از رقت 5 ng تا 5 fg DNAی الگو استفاده گردید.

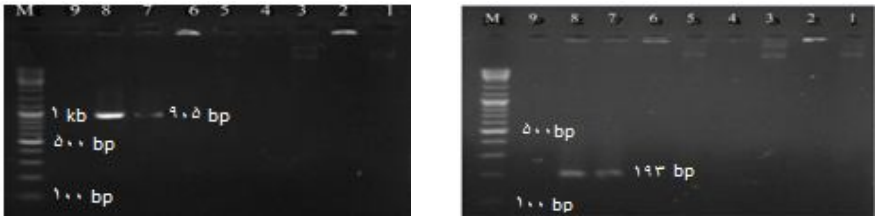
یافته ها

بهینه سازی عوامل مهم و موثر بر واکنش PCR از جمله غلظت MgCl2 ، میزان آنزیم SmarTaq پلیمراز، غلظت DNA الگو، غلظت نوکلئوتیدها و دمای اتصال صورت پذیرفت و بهترین شرایط بدست آمد (جدول 2).

جدول 2 . بهینه سازی عوامل موثر بر واکنش PCR

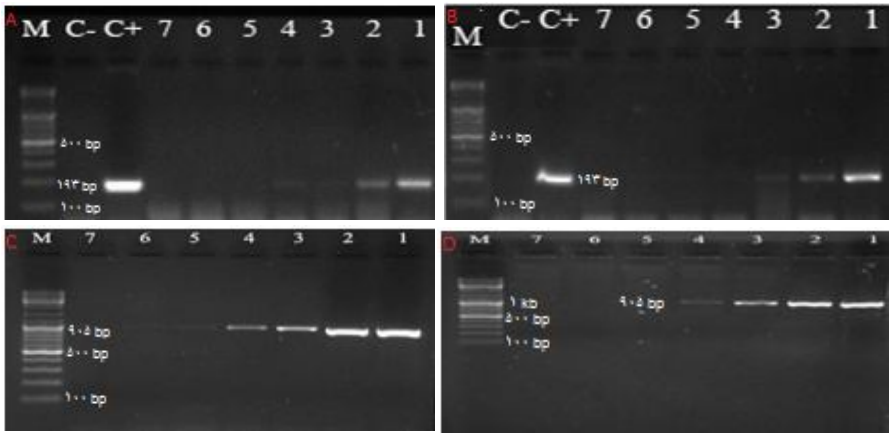
عوامل بهینه شده	غلظت $MgCl_2$	میزان آنزیم SmarTaq	غلظت مخلوط نوکلئوتیدها	دمای اتصال
بازه مورد بررسی	0.25 mM-2 mM	0.5 U-10 U	100-500 µM	برای قطعه 193 bp : 55-65ċ برای قطعه 905 bp : 45-55ċ
مقدار (غلظت) بهینه شده	0. 5 mM	1.25 U	200 µM	برای قطعه 193 bp : 63.9ċ برای قطعه 905 bp : 48.3ċ

جهت ارزیابی ویژگی روش PCR از DNA شش سویه باکتریایی استاندارد استفاده شد ولی در هیچ یک از آنها واکنشی صورت نگرفت که نشان دهنده ویژگی بالای پرایمرها و روش PCR درتشخیص اختصاصی جنس بروسلاست (تصویر 1).



تصویر 1. ارزیابی ویژگی روش PCR با استفاده از DNA شش سویه باکتریایی استاندارد. تصویر سمت راست (ژن omp-2 ، به طول 193 bp). تصویر سمت چپ (ژن 16S rRNA ، به طول 905 bp). در هر دو تصویر چاهک شماره 7 بروسلا آبورتوس، چاهک شماره 8 کنترل مثبت استاندارد و چاهک شماره 9 کنترل منفی است. چاهک های 1 تا 6 بترتیب عبارتند از: ای. کولای (1)، یرسینیا انتروکولیتیکا (2)، لیستریا منوسایتوژنز (3)، شیگلا دیسنتریا (4)، فرانسیسلا تولارنسیس (5)، سالمونلا تیفی (6). مارکر (M) مورد استفاده (مارکر 100 bp، شرکت فرمنتاز).

جهت تعیین حساسیت روش PCR از رقت های مختلفDNA الگو استفاده گردید. نتایج حاصل از رقت های سریالی تهیه شده با آب و سرم نشان داد باند 193 bp ی ژن omp-2 در سرم تا رقت 3 (50Pg) و در آب تا رقت 4 (5Pg) قابل مشاهده ه است (تصویر 2). اما باند 905 bpی ژن 16S rRNA در سرم تا رقت 4 (5Pg) و در آب تا رقت 6 (50Fg) قابل مشاهده است (تصویر 2).



تصویر 2. ارزیابی حساسیت واکنش PCR با استفاده از تاثیر رقت های مختلف DNA الگو. رقت های سمت راست (B و D) با سرم FBS و رقت های سمت چپ (A و C) با آب مقطر تهیه شده است.تصاویر بالا (A و B) (ژن omp-2 به طول 193 bp). تصاویر پائین (C و D) (ژن 16S rRNAبه طول 905 bp). در هر 4 تصویر رقت شماره 1 (5 ng) ، رقت شماره 2 (500 pg)، رقت شماره 3 (50Pg)، رقت شماره 4 (5Pg)، رقت شماره 5 (500 fg)، رقت شماره 6 (50Fg)، رقت شماره 7 (5 fg). مارکر (M) مورد استفاده (مارکر 100 bp، شرکت فرمنتاز).

بحث

سنجش های مبتنی بر PCR نسبت به روش های سرولوژیک و کشت سریع تر و حساس تر هستند. با این حال حساسیت و ویژگی PCR برای تشخیص بروسلا بسته به آزمایشگاه متغییر است و هنوز استانداردسازی در خصوص تهیه نمونه، ژنهای هدف و روش های تشخیصی انجام نشده است(17). از طرفی در برخی روش های مرسوم مثل کشت تماس مستقیم با باکتری زنده ممکن است باعث آلودگی کارکنان آزمایشگاه شود. مطالعه "حسنجانی و همکاران" در شمال ایران گویای این مطلب است و نشان می دهد 8.1% موارد بروسلوز در ایران از طریق کار در آزمایشگاه بوده است(6). در این مطالعه دو سری از پرایمرهایی را که برای تشخیص بروسلا در حیوانات و نمونه های انسانی بکار می رود، برای بهینه سازی حساسیت و ویژگی روش PCR استفاده شد.

در مطالعات مختلف معمولا" برای بررسی و بهینه سازی PCR یا مستقیما" از سرم یا خون استفاده می کنند(7)، یا باکتری بروسلا را به سرم اضافه می کنند(18) و یا DNA بروسلا را به سرم اضافه می کنند(19). استفاده از سرم به جای خون کامل از مزایای متعددی در روش های تکثیر اسید های نوکلئیک برخوردار می باشد. به عنوان مثال اثر ممانعتی ناشی از مواد ضد انعقاد، هموگلوبین، DNA انسانی و یا سایر ترکیبات مهارکننده خون حذف می شود و نیاز به انجام مراحل لیز گلبول های قرمز، شستشو، سانتریفیوژ و نیز اندازه گیری و تنظیم غلظت DNA استخراج شده نیست(20). لذا در این مطالعه پس از جداسازی DNA بروسلا رقت های مختلفی از آن را به سرم FBS اضافه نموده و با تولید سرم مصنوعی آلوده مشابه سرم افراد آلوده، مجددا" DNA از سرم مصنوعی استخراج گردید. از طرفی رقت های مشابهی از DNA با آب مقطر ساخته شد تا اثرات احتمالی مهار کننده های موجود در سرم با آب مقطر مورد مقایسه قرار گیرد. هدف از این مطالعه ایجاد مدل مناسبی برای توسعه روش PCR و افزایش حساسیت و ویژگی آن برای استفاده در تشخیص سریع بروسلوز انسانی بود. از آنجائیکه اجزاء واکنش نظیر غلظت MgCl2، میزان آنزیم SmarTaq پلیمراز، غلظت DNA الگو، غلظت نوکلئوتیدها و دمای اتصال در حساسیت و ویژگی واکنش موثرند (17)، لذا این عوامل بهینه سازی شدند و بهترین شرایط گزارش گردید (جدول 2).

پرایمرهای F4/R2 که ناحیه ای از ژن 16SrRNA را تکثیر می نمایند نسبت به پرایمرهای JPF/JPR که ژن کدکننده پروتئین غشاء بیرونی (omp-2) را برعهده دارند، حساسیت بیشتری نشان دادند(تصویر 2). پرایمرهای F4/R2 توانستند تکثیر را تا رقت 4 (5 pg) در سرم و تا رقت 6 (50Fg) در آب مقطر نشان دهند در حالی که پرایمرهای JPF/JPR تکثیر را تا رقت 3 (50 pg) در سرم و تا رقت 4 (5 pg) در آب مقطر نشان دادند. حساسیت بالای پرایمرهای F4/R2 احتمالا" بخاطر آنست که در ژنوم باکتری چندین کپی از ژن 16SrRNA وجود دارد درصورتیکه از ژن omp-2 تنها دو نسخه موجود است (7). نتایج برخی گزارشات حاکی از آنست که وجود چند کپی نتوانسته تفاوتی در حساسیت پرایمرهای F4/R2 با پرایمرهای JPF/JPR نشان دهد (18) که البته بنظر می رسد باید این یافته مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

مقایسه نتایج آب مقطر آلوده و سرم مصنوعی آلوده، حاکی از آن بود که حساسیت هر دو پرایمر در نمونه های رقیق شده در آب مقطر نسبت به سرم مصنوعی آلوده شده، بالاتر بود (تصویر 2). حساسیت پرایمرهای F4/R2 برای آب مقطر 50Fg ولی برای نمونه های سرم مصنوعی آلوده 5 pg بود. از طرفی حساسیت پرایمرهای JPF/JPR برای آب مقطر 5 pg ولی برای نمونه های سرم مصنوعی آلوده 50 pg بود. حساسیت PCR می تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار گیرد، که برخی از این عوامل عبارتند از:کاهش میزان DNA حین جداسازی، حضور DNA خارجی و یا آلودگی با ترکیبات مهارکننده ی ناشی از ترکیبات سرم یا مواد شیمیایی مورد نیاز هنگام جداسازی DNA (17, 21). لذا کاهش حساسیت PCR در نمونه های سرم مصنوعی در مقایسه با آب ممکن است بخاطر وجود ممانعت کننده های PCR باشد. برخی از محققین برای افزایش حساسیت و ویژگی PCR از روش Nested-PCR استفاده کرده اند که از دو جفت پرایمر بهره می برد (22). البته این روش هم شانس آلودگی را افزایش می دهد و لازم است افراد خبره این تست را انجام دهند.

مطالعه حاضر نشان دادآزمون PCR با استفاده از استخراج DNA از سرم آلوده شده می تواند ابزار مفیدی جهت تشخیص آزمایشگاهی سریع بروسلوز انسانی باشد، البته مطالعات بیشتری در این زمینه لازم است و توسعه روش های دیگر مبتنی بر PCR می تواند به توسعه یک روش سریع، کارا و مورد اطمینان کمک نماید.

نتیجه گیری

هرچند حساسیت روش PCR با این پرایمرها تحت تاثیر مهارکننده های سرمی بود ولی هنوز آنها می توانند ابزار مفیدی برای تشخیص بروسلوز انسانی باشند .

تشکر و قدردانی

از هم کاری صمیمانه کارکنان بخش باکتری شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بخصوص آقای دکتر خرم آبادی و کارکنان محترم آزمایشگاه تحقیقاتی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) به ویژه آقای دکتر لطیفی کمال سپاس گذاری را داریم. این مقاله از نتایج پایان نامه دانشجویی مصوب گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاداسلامی واحد کرج استخراج شده است.

REFERENCES

1.Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. The Lancet infectious diseases. 2006 Feb;6(2):91-9.

2.Guerra H. The brucellae and their success as pathogens. Crit Rev Microbiol. 2007;33(4):325-31.

3.Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. The Lancet infectious diseases. 2007 Dec;7(12):775-86.

4.Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. Journal of clinical microbiology. 2001 Apr;39(4):1661-4.

5.Sofian M, Aghakhani A, Velayati AA, Banifazl M, Eslamifar A, Ramezani A. Risk factors for human brucellosis in Iran: a case-control study. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2008 Mar;12(2):157-61.

6.Hasanjani Roushan MR, Mohrez M, Smailnejad Gangi SM, Soleimani Amiri MJ, Hajiahmadi M. Epidemiological features and clinical manifestations in 469 adult patients with brucellosis in Babol, Northern Iran. Epidemiology and infection. 2004 Dec;132(6):1109-14.

7.Navarro E, Escribano J, Fernandez J, Solera J. Comparison of three different PCR methods for detection of Brucella spp in human blood samples. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002 Oct 11;34(2):147-51.

8.Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I. Specific detection of Brucella DNA by PCR. Journal of clinical microbiology. 1995 Mar;33(3):615-7.

9.Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A. Evaluation of Different PCR Assays for Early Detection of Acute and Relapsing Brucellosis in Humans in Comparison with Conventional Methods. Journal of clinical microbiology. 2007 April 2007;45(4):1211-8.

10.Hamdy ME, Amin AS. Detection of Brucella species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. Vet J. 2002 May;163(3):299-305.

11.Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP. Single-step PCR for detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals. Journal of clinical microbiology 1995; Dec; 33(12):3087-90.

12.Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for Brucella using polymerase chain reaction. J Appl Bacteriol. 1990 Aug;69(2):216-27.

13.Herman L, De Ridder H. Identification of Brucella spp. by using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol. 1992 Jun;58(6):2099-101.

14.Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification. J Trop Med Hyg. 1992 Aug;95(4):271-5.

15.Fekete A, Bantle JA, Halling SM. Detection of Brucella by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. J Vet Diagn Invest. 1992 Jan;4(1):79-83.

16.Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. Journal of clinical microbiology. 1997 Nov;35(11):2927-30.

17.Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. Expert Rev Mol Diagn. 2004 Jan;4(1):115-23.

18.Dogaheh HP, Valinejad Z, Pourfarzi F. [Evaluation of three DNA extraction methods for detection of brucella DNA in human serum samples.] Arak Medical University Journal (Rahavard Danesh) 2012;14(3):40-8.

19.Queipo-Ortuno MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. Clin Vaccine Immunol. 2008 Feb;15(2):293-6.

20.Romero C, Lopez-Goni I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of Brucella spp. by PCR. Appl Environ Microbiol. 1999 Aug;65(8):3735-7.

21.Bogdanovich T, Skurnik M, Lubeck PS, Ahrens P, Hoorfar J. Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus Brucella. Journal of clinical microbiology. 2004 May;42(5):2261-3.

22.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. Journal of clinical microbiology. 1996 Feb;34(2):477-8.