Short communih cation

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 4 (September - October)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Evaluation of the sensitivity of the PCR technique in detecting genes omp31, omp25 and bcsp31 in patients with brucellosis

Farzad Alizadeh Mofrad[1], Farid Dolatshahi[2], Sara Alizadeh Mofrad[3], Mustafa Kolahi [4], Saber Agha Mohammadi[1]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Urmia, Urmia, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Khorramabad, Kkorramabad, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Damghan, Damghan, Iran
4. Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Saveh, Saveh, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2016/04/13
Accepted: 2016/04/17
Available online: 2016/10/17

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2016; 10(4): 63-68

Corresponding author at:

Mr. Farzad Alizadeh mofrad

Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Urmia, Urmia,Iran

Tel: 0989167091075

Email:
Khashayarsha2500@gmail.com

Abstract

Background and Aim: Brucellosis is still one of the common infections in developing countries and some developed countries. Diagnosis of the human brucellosis is mainly based on blood culture and serological tests.also in addition to determine the root cause of brucellosis, the aim of this paper is susceptibility assessment of three bcsp31, omp31 and omp25 in the diagnosis of brucellosis using PCR method among people with brucellosis.

Materials and Methods: In this study, All the patients were diagnosed with positive immunological tests such as Wright and ELISA. samples of blood were cultured (BACTEC) and incubated at 37°C for 5 days and then they were cultured for 3 days on Brucella agar. DNA was extracted from the colonies by Kit. The extracted DNA was used as template for accurate diagnosis of bacterial strains with gene-specific primers in PCR reactions bcsp31, omp31 and omp25.

Results and Conclusions: After the PCR reaction, results show that there is 100% PCR power for diagnosis of bscp31, 90.47% sensitivity for omp31 and 85.7% sensitivity for omp25 genes. Due to the high power and specificity and existence of bcsp31 in human pathogenic species, bcsp31 gene can be considered as more appropriate and confident target gene than omp31 and omp25 genes in the diagnosis of brucellosis in clinical samples using PCR method.

KeyWords: Brucellosis ,PCR ,Detection Power.omp25.omp31.bcsp31

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Alizadeh Mofrad F, Dolatshahi F, Alizadeh Mofrad S, Kolahi M, saber Mohammadi S. Evaluation of the sensitivity of the PCR technique in detecting genes omp31, omp25 and bcsp31 in patients with brucellosis. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (4) :63-68

مقاله کوتاه

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۴ – مهر و آبان ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی حساسیت PCR در تشخیص باکتری مولد بروسلوزیس توسط ژن‌های omp25،omp31 و bcsp31 در مبتلایان به تب مالت

فرزاد عالی زاده مفرد[۱]، سارا عالی زاده مفرد[۲]، فریددولتشاهی[۳]، مصطفی کلاهی[۴]، صابر آقا محمدی[۱]

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
۲. گروه زیست شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد، خرم آباد، ایران
۳. گروه زیست شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران
۴. گروه زیست شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات ساوه، ساوه، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۲۵

پذیرش:۱۳۲۹۵/۰۱/۲۹

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۷/۲۶

موضوع:

باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1395; 10(4): 63-68

نویسنده مسئول:

آقای فرزاد عالی زاده مفرد

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۶۷۰۹۱۰۷۵

پست الکترونیک:

Khashayarsha2500@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: تب مالت هنوز از جمله عفونت‌های شایع درکشورهای درحال‌توسعه و حتی برخی کشورهای پیشرفته بشمار می‌آید. تشخیص بیماری به وسیله کشت خون و روش‌های سرولوژیک انجام می‌شود که برای تشخیص با حساسیت و ویژگی بالاتر روش PCR پیشنهاد شده ، بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی میزان حساسیت تکنیک PCR در تشخیص ژن‌های omp31، omp25 و bcsp31 در مبتلایان به تب مالت می‌باشد.

مواد و روش کار: در مطالعه حاضر از ۲۱ فرد مبتلا به تب مالت که دارای تست‌های مثبت الیزا و رایت بودند نمونه گیری خون انجام و سپس نمونه‌ها در محیط کشت خونBACTEC و در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۵ روز انکوبه و پس از آن هر نمونه روی یک پلیت حاوی بروسلا آگار کشت داده شدند. DNA استخراج شده به عنوان الگو برای تشخیص دقیق ژن‌های omp25،omp31 و bcsp31 توسط PCR به کارگرفته شدند.

یافته‌ها و بحث: پس از انجام واکنش *PCR* نتایج بیانگر قدرت ۱۰۰ درصدی *PCR* در تشخیص ژن *bcsp31* ۹۰/۴۷ درصدی برای ژن *omp31* و ۸۵/۷ درصدی برای ژن *omp25* بود. با توجه به قدرت ۱۰۰ درصدی و وجود قطعه ۲۲۳ جفت بازی *bcsP31* در سه گونه‌ای بروسلا های بیماری‌زای انسانی، ژن*bcsP31* می‌تواند به عنوان یک ژن هدف مناسب و مطمئن‌تری نسبت به ژنهای *OMP31* و *Omp25* در تشخیص بروسلوز در نمونه‌های بالینی توسط روش ***PCR*** مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بروسلوزیس،PCR، قدرت جداسازی، omp31، omp25 و bcsp31

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

بیماری تب مالت یا Brucellosis به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک میان انسان و دام به شمار می‌آید. تشخیص گونه‌های بیماری‌زا در کشورهای گوناگون حائز اهمیت است. شیوع جغرافیایی بروسلوزیس وسیع بوده و تقریباً در تمام نقاط دنیا مشاهده می‌شود و به عنوان یک مشکلات جدی بهداشتی در کشورهای درحال‌توسعه به شمار می‌آید(۳-۱). با توجه به اینکه در روش‌های کشت باکتریولوژیکی و تست‌های سرولوژیکی که شایع‌ترین آزمون‌ها در تشخیص عفونت بروسلا هستند، 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 دیگر بلکه در اغلب موارد روش‌های تشخیصی قادر به جداسازی ارگانیسم نیستند (۴). معایب برجسته‌ای روش کشت از جمله زمان طولانی، نیاز به پرسنل مجرب، محیط‌های انتخابی، حساسیت و ویژگی پایین و از سوی دیگر استفاده از

روش‌های سرولوژیکی نیز با اختصاصت کم، وجود نتایج کاذب، وقت‌گیر بودن، خطر بالای آلودگی کادر آزمایشگاه (۵،۶) باعث شده که کار مداوم با این ارگانیسم در آزمایشگاه مخاطره‌آمیز و نامطمئن باشد. درنتیجه پژوهش‌های زیادی برای بهره بردن از روش‌های مولکولی به ویژه PCR به عنوان روشی سریع و مناسب برای تشخیص بروسلوزیس مدنظر قرارگرفته است. آنچه باعث برتری روش PCR نسبت به روش‌های سرولوژی رایج و کشت‌شده، می‌توان به کاهش چشمگیر زمان، کاهش احتمال آلودگی کادر آزمایش گاهی و از همه مهم‌تر ویژگی و حساسیت بالا (۹-۷) اشاره کرد. از جمله فاکتورهای مهم در تشخیص جنس بروسلا OMP یا پروتئین‌های خارجی می‌باشند که به دلیل ویژگی بارز و منحصربه‌فرد در جنس‌های بروسلا به عنوان فاکتورهای مهمی در تشخیص بروسلوزیس موردتوجه ویژه پژوهشگران قرارگرفته‌اند. OMP های بروسلا در سه دسته تقسیم می‌شوند (۱۰،۱۱) گروه یک (88-94KDa) و گروه دوم (36-38KDa) و گروه سوم (25-27KDa) و (31-34KDa) تقسیم می‌شوند. دو ژن omp25 و omp31 در OMP ها گروه سوم را کد می‌کنند. پروتئین‌های غشای خارجی بروسلا در ایجاد پاسخ ایمنی سلولی در باکتری‌های جنس بروسلا نقش کلیدی دارند. omp31 برای نخستین بار در بروسلا ملی تئسیس گزارش و پس از ارزیابی‌های پژوهشگران آشکار شد که در همه گونه‌های بروسلا به‌جز بروسلا آبورتوس وجود دارد (۱۲،۶). Omp25 یکی دیگر از پروتیین های غشای خارجی با وزن 25KDa است که در طبقه‌بندی گونه‌های بروسلا بسیار حائز اهمیت و در تمایز میان گونه‌های بروسلا توسط روش‌های مولکولی و هیبریدیزاسیون DNA-DNA به کار می‌رود (۱۴،۱۳) از دیگر پروتیین های غشایی که اختصاص به جنس بروسلا دارد پروتیین های غشایی bcsp31 31KDa است که در تمام بیووارهای بروسلا وجود دارد (۱۵). بنابراین با توجه به حساسیت و ویژگی بالای تکنیک PCR هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه قدرت تکنیک PCR در تشخیص بروسلوز توسط ژن‌های omp25،omp31 و bcsp31 و همچنین تشخیص گونه‌های اصلی مولد بروسلوزیس در مبتلایان به بروسلوزیس در شهرستان خرم‌آباد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع توصیفی _ تحلیلی می‌باشد که در سال ۱۳۹۴ بر روی ۲۱ فرد مبتلا به تب مالت انجام شد. بیمارانی که دارای تست رایت بیش‌تر یا مساوی ۱/۸۰ و تست الیزا(IgG,IgM) با تیتر بیش‌تر یا مساوی ۱۲ بودند، پس از کسب رضایت ۱۰ میلی‌لیتر خون‌گرفته شد. ۵ میلی‌لیتر آن برای سیستم محیط کشت BACTEC (merck آلمان) و ۵ میلی‌لیتر دیگر پس از افزودن EDTA برای استخراج DNA در فریزر نگه‌داری شد. محیط‌های BACTEC پس از مدت ۷ تا ۳۰ روز در دمای $36^{O}C$ انکوبه و پس‌ازآن هر نمونه روی یک پلیت حاوی بروسلا آگار کشت داده شدند. در ادامه یک سری از پیلت ها در شرایط بی هوازی و یک سری دیگر در شرایط هوازی انکوبه و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ^{O}C ۳۷ قرار گرفتند. پس از بررسی کلنی‌ها ازلحاظ شکل، رنگ‌آمیزی، کاتالاز و اکسیداز برای استخراج DNA از کلنی‌ها از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد (۱۵،۱۶). طی این روش پس از جمع‌آوری کلیه نمونه‌ها آن‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در ^{O}C ۳۷ قرار داده و سپس ۱/۵ سی‌سی از محیط کشت را به میکروتیوب‌های منتقل و در ادامه با سانتریفوژ رسوب حاوی باکتری‌ها در آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری در^{O}C ۱۰۰قرار داده شدند. سپس میکروتیوب ها در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع رویی که حاوی DNA باکتریایی بود جدا شد. همچنین DNA استخراج شده از نمونه‌های خون بیماران با استفاده از کیت استخراج DNA (ساخت تکاپوزیست) انجام و بر اساس دستورالعمل مربوط استخراج انجام گرفت (DNA استخراج شده تا آغاز کار در دمای $20^{O}C$ - نگهداری شدند). میزان غلظت DNA استخراج شده با دستگاه اسپیکروفوتومتر(UNICO, آمریکا) با جذب اشعه ماورای بنفش به طور دقیق انجام گرفت. به طوری که میزان جذب پرتوهای ماورای بنفش توسط محلول DNA در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (A260/A280) برابر با ۱/۸ بود که بیانگر خلوص مناسب DNA استخراج شده بود. پرایمرهای مورد استفاده پس از بررسی کلیه مقاله‌های در دسترس و اطمینان از حساسیت و ویژگی بالا انتخاب و سپس با آنالیز نرم‌افزاری (بلاست وان- ژن ژانر- الیگو) روی سکانس‌های تعیین‌شده اطمینان لازم از صحت این ترادف ها و اینکه تنها در گونه‌های جنس بروسلا وجود دارند حاصل شد. پرایمرها بر اساس سکانس‌های نوکلئوتیدی ژن‌های omp25،omp31 وbcsp31 بروسلا آبورتوس و ملی تنسیس (جدول ۱) تهیه و واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل ۱/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمر های پیشرو و پیرو (با غلظت ۲۰ پیکومول)،۳ میکرو لیتر DNA (10 ng/µl)، ۶ میکرولیتر H_2O و ۱۳ میکرولیتر Ampliqon) Master Mix دانمارک) بود. برای کنترل

مثبت از DNA بروسلا ملی تنسیس (ATCC 23456) 16M برای ژن omp31، (BCCN) Rev.1 برای ژن omp25 و بروسلا آبورتوس (BCCN R19) S19 برای ژن bcsp31 تهیه و واکنش PCR در ۳۵ سیکل به قرار زیر انجام شد: یک سیکل در ۹۵ ^{O}c به مدت ۳ دقیقه، آنیلینگ در ۱ دقیقه به مدت ۶۳ ^{O}c ، گسترش به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ ^{O}c و گسترش نهایی در ۷۲^{O}c به مدت ۱۰ دقیقه. همچنین با توجه به عدم وجود ژن omp31 در بروسلا آبورتوس و احتمال وجود گونه بروسلا آبورتوس در نمونه‌ها مورد ارزیابی و عدم تاثیرگذاری در نتایج، واکنش PCR2 با به کار گیری پرایمرهای اختصاصی برای گونه بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس (جدول۱) با همان پروتکل PCR1 در ۳۵ سیکل به صورت جداگانه برای شناسایی نوع گونه ها به عنوان مولد عفونت در بیماران انجام شد. کنترل منفی شامل همه موارد واکنش PCR به‌جز DNA بود و برای کنترل مثبت از DNA بروسلا ملی تنسیس (ATCC 23456) 16M و بروسلا آبورتوس (BCCN R19) S19 تهیه شده از بانک میکروبی انیستیتو پاستور ایران استفاده شد. سپس محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

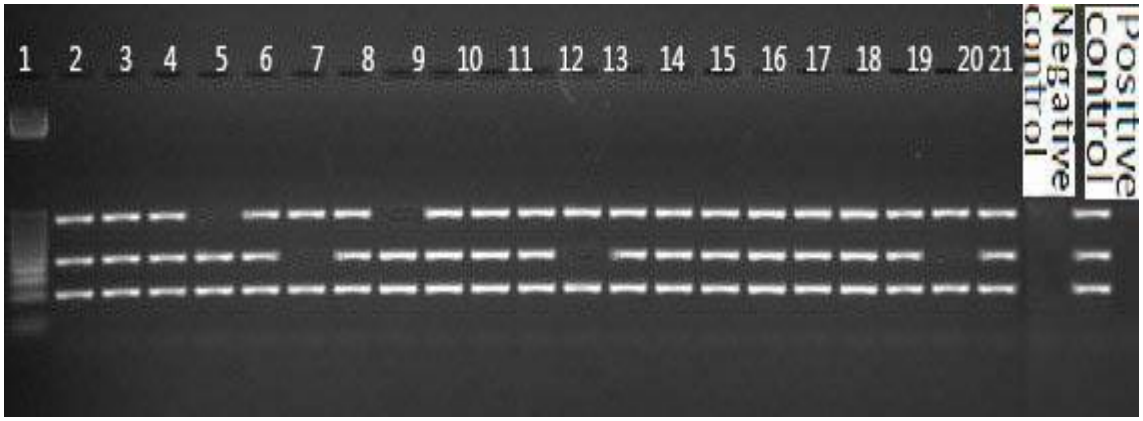
جدول1 – پرایمر های اختصاصی به کار رفته در این مطالعه

منابع	ردیف پرایمر	نام پرایمر
۴	GGATCCATGAAGTCCGTAATTTTG AAGCTTTTAGAACTTGTAGTTCAG	***Omp31***
۲۱	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG	***bcsp31***
۲۵	ATGCGCGCACTCTTAAGTCTC GCCCAGGATGTTGTCCGT	***Omp25***
۲۶	GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	***B.abortus***
۲۷	CCCGGATATGAATCTAACC TGTACAAGGAACGCCATCA	***B.melitensis***

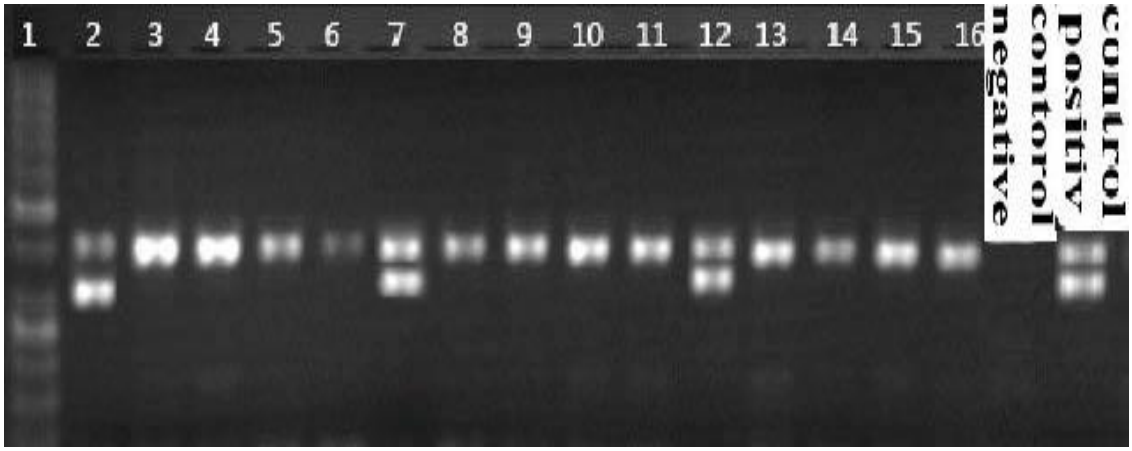
یافته‌ها و بحث

DNA استخراج شده در واکنش PCR به عنوان الگو مورداستفاده قرار گرفت. ایجاد باندها با وزن مولکولی درست نشان‌دهنده صحت واکنش زنجیره پلی مراز بود. مطابق انتظار در شکل ۱، محصول PCR با استفاده از ژن bcsp31 با طول ۲۲۳ جفت باز در ۲۱ نمونه آزمایش مشاهده می‌شود که بیانگر تشخیص تمامی ۲۱ نمونه مثبت (۱۰۰ درصد) توسط PCR با استفاده از ژن bcsp31 به عنوان ژن هدف بود. همچنین محصول PCR با استفاده از ژن omp31 با طول ۷۲۳ جفت باز در ۱۹ نمونه (۹۰/۴۷درصد) و محصول ۴۹۰ جفت بازی با استفاده از ژن omp25 در ۱۸ نمونه (۸۵/۷ درصد) روی ژل ایجاد گردید (شکل ۱). نتایج تعیین نوع گونه در مبتلایان بیانگر ۱۹ نمونه (۹۵ درصد) آلوده به گونه بروسلا ملی تنسیس و ۲ نمونه (۵ درصد) آلوده به گونه بروسلا آبورتوس بود (شکل ۲). عدم‌تشخیص بروسلوزیس به دلیل نشانه‌های بالین یکسانی که با بیماری‌های دیگری چون آنفولانزا، لیپوسیپروزیس، مالاریا، تیفوییید و همچنین به‌جای گذاشتن عوارض شدید در فرد مبتلا و حتی ایجاد ضایعات قبلی که شایع‌ترین علت مرگ‌ومیر در بیماران مبتلابه تب مالت است که اغلب در مردان رخ می‌دهد و بیشتر دریچه‌های قلبی درگیر می‌کند (۱۶،۱۷). بنابراین تشخیص سریع این میکروارگانیسم در مبتلایان بسیار حائز اهمیت است. حساسیت متفاوت PCR در تشخیص سه ژن omp25,omp31 و bcsp31 در این مطالعه بیانگر قدرت متفاوت PCR در روند شناسایی این ژن‌ها به عنوان فاکتورهای تشخیصی تب مالت در نمونه‌های بالینی می‌باشد. در این مطالعه از ۲۱ نمونه کشت داده‌شده، PCR توانست هر ۲۱ نمونه بروسلوزیس مثبت را با توجه به پرایمرهای ژن bcsp31 که معادل ۱۰۰ درصد نمونه‌ها بود را تشخیص دهد. در تأیید این یافت ها می‌توان به یافته‌ای Al-Mariri و همکارانش در سال ۲۰۱۵ و هدایتی و همکارانش در سال ۲۰۰۶ که حساسیت PCR را در تشخیص جنس بروسلا را توسط ژن bcsp31 ۱۰۰ درصد گزارش کردند (۱۷،۱۸) اشاره کرد. همچنین تشخیص ۹۰/۴۷ درصدی (۱۹ نمونه) PCR با استفاده از ژن omp31 به عنوان ژن هدف در این مطالعه به دلیل وجود دو نمونه آلوده توسط گونه بروسلا آبورتوس بود (عدم وجود ژن omp31 گونه‌های آبورتوس (۶) که می‌تواند بیانگر ایجاد نتایج کاذب در امر تشخیص فرد مبتلا در صورت ابتلا به گونه بروسلا آبورتوس می‌باشد. Habtamu و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۳ قدرت PCR را در تشخیص ژن omp31 در حدود ۹۶ درصد عنوان کردند (۹). در پژوهشی که توسط Arjmand Zadeghan و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام شد آن‌ها قدرت PCR را در تشخیص ژن omp25 را در حدود ۹۵ درصد گزارش کردند (۱۹) کاهش محسوس (۸۵/۷ درصد) قدرت تشخیص PCR در تشخیص ژن omp25 در این مطالعه به فرض صحت یافته Arjmand zadganو همکارانش را می‌توان به دلیل حساسیت پایین پرایمرها، نوع مواد و یا روش انجام واکنش در مطالعه حاضر دانست. یافته های این مطالعه بیانگر قدرت متفاوت ، ولی مطمئن

PCR در تشخیص جنس بروسلا در مبتلایان به بروسلوزیس توسط هر سه ژن omp25,omp31 و bcsp31 بود.



شکل ۱- نتایج حاصله از باندهای ایجاد شده روی ژل الکتروفورز: ستون ۱ مارکر (gene ruller100bp dna ladder) وستونهای ۲ تا ۲۱ وجود باندهای 223 bp متعلق به پرایمر تکثیر شده ژن bcsp31. ستون 2،3،4،5،7،8،9،10،11،13، 14، 15،16،17،18،19،21 بیانگر باندهای ۴۹۰bp پرایمر تکثیرشده ژن omp25 و ستونهای ۲،۳،۴،۶،۷،۸،۱۰،۱۱، ۱۲،۱۳،۱۴،۱۵،۱۶،۱۷،۱۸،۱۹،۲۰، ۲۱ بیانگر باندهای ۷۲۳bp پرایمر تکثیر شده ژن omp31 است.



شکل ۲- ستون ۱ مارکر (gene ruller100bp dna ladder) – باندهای ۴۹۸bp متعلق به پرایمر تکثیر شده گونه بروسلا آبورتوس و باندهای 558bp بیانگر پرایمرهای تکثیر شده متعلق به بروسلا ملی تنسیس می‌باشد.

همچنین با توجه به ابتلای ۱۹ فرد به تب مالت توسط گونه بروسلا ملی تنسیس و ۲ فرد به بروسلا آبورتوس می‌توان نتیجه گرفت که عامل اصلی عفونت در مبتلایان به تب مالت در لرستان گونه‌ای بروسلا ملی تنسیس می‌باشد. Rahmani و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۱ عامل اصلی عفونت در مبتلایان به تب مالت در استان کردستان را بروسلا ملی تنسیس گزارش کردند (۲۰). در نتیجه وجود قطعه ۲۲۳ جفت بازی bcsP31 در گونه‌های بروسلا های بیماری‌زای انسانی و همچنین تشخیص ۱۰۰ درصدی ژن bcsP31 در این مطالعه بیانگر مناسب و مطمئن‌تر بودن ژن bcsP31 نسبت به ژنهای omp31 و omp25 در تشخیص تب مالت در نمونه‌های بالینی توسط روش PCR می‌باشد.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارض وجود ندارد.

References

1. Baddour M. Diagnosis of Brucellosis in Humans:a Review. medwelljournals 2012; 2(4):149-156.

2. Pasquevich KA, Estein SM, Garcia Samartino C,Zwerdling A, Coria LM, Barrionuevo P, et al. Immunization with recombi-nant Brucella species outermembrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells as well as systemic and oral protection against Brucella abortus infection. Infect Immun 2009; 77(1): 436-45.

3. Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of Brucella species. Rev. Sci. Tech 2013; 32(1):149-62.

4. Cloeckaert R.Classification of Brucella Strains isolated fromarinema mmals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. MicrobesInfect 2013; 5(7): 593 - 602.

5. Silva A, Costa EA, Paixao TA, Tsolis RM, Santos RL. Laboratory Animal Models for Brucell osis Research. J. Biomed. Biotechnol 2011; 518323.1-9.

6. Ying Wang. Polymerase chain reaction-based assays for thediagnosis of human brucell os is. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2014; 13:11-31.

7. Weiner M, Iwaniak W, Szulowski K.Comparison of PCR-Based Amos, Bruce-Ladd er,and ML VA Assays for typing of Brucella species. Elsevier 2011; 55:625-630.

8. Rahmani MR, Motaharinia Y, Rezai M, Asadzadeh N, Hosseini V, Mohsenpor B ,et al. evaluation and diagnosis of species and strains of brucella bacteria by biochemisch.pcr and Serologiein Kurdistan. sjku.muk 2011; (16):1-8. [In Persian].

9. Habtamu T, Rathore T, Dhama RK, Karthik K. Serological and bacteriological identific ation of Brucella melitensis from naturally infected sheep. journalcra 2013; 5(11): 40-49.

10. Habtamu T, Rathore R, Dhama k, Karthik K. Isolation and molecular detection of Brucella melitensis from disease outbreak in sheep and Brucella abortus from cattle farm by IS711 and OMP2a gene based PCR. Journalcra 2013; (1):199-205.

11. Marei A, Boghdadi G, Abdel-Hamed N, Hessin R, Abdoel T, Smits H, et al. Laboratory diagnosis of human brucellosis in Egypt and persistence of the pathogen following treatment. jidc 2011;5(11):786-91.

12. Zowghi E, Bagheri Nejad R. Historical Process of Taxonomy of Genus Brucella. IJMM 2015; 9(2): 1-19. [In Persian].

13. Saberi M, Hamali H, Jafari Joozani R, Nofouzi K, Noorsaadat GH. A serological and molecular (PCR) survey on abortions caused by Brucella melitensis Rev-1 vaccine strain in sheep herds of Tabriz-Iran. jnasci 2013;19 (9): 340-343.

14. Beheshti N, Mohabati A, Tabaraie B, Harzandi N, Khoramabadi N,Aghababa H. Cloning and Ex pression of Brucella Outer Membrane Protein 36kDa (OMP2b) in E. coli. Fums 2011; 2(1):19-23. [In Persian].

15. Matrone M, Keid LB, Rocha M, Vejarano MP. Evaluation of DNA extrac tion protocols for Brucella abortus PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. Scielo 2009; 40: 480-489.

16. Aras Z, Taspinar M, Aydin I, Novel A. Polymerase Chain Reaction to Detect Br ucella canis in Dogs. Kafkas 2015; 21(2): 169-172.

17. Al-Mariri. A Isolation of Brucella melitensis strains from Syrian bovine milk samples. Bulg 2015; 1(18): 40-48.

18. Hadayati M, moghadam A, Norouzian D, Tabarraie B, Ahmadi H, Syadat D. Eine effiziente und genaue Diagnose der Brucellose in Serum unter Verwendung von. IJMM 2006; (3): 40-47. [In Persian].

19. Arjmandzadegan M, Naji T, Alikhani Y, Saberian M, Kamarbandi sharah A. Molecular diagnosis of brucellosis-causing bacteria isolated from patients with brucellosis with the help of trpE and omp25 genes by PCR. Scirp 2014;19(21):93-110. [In Persian].

20. Rahmani M, Motaharinia U, Rzaei M, Asadzadeh N, Hossanni V, Mohsanpour B, et al. Isolation and identification of Brucella Species from blood samples of the patients with brucellosis by biochemical, PCR and serological methods in Kurdistan Province. sjku.muk 2011; 16(3): 1-8.