Review Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Looking Again at the Diagnosis of Brucellosis Difficulties in Iran

Massoud Hajia[1], Faramarz Masjedian Jazi[2]

1. Department of Molecular Biology, Research Center of Health Reference Laboratory, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Science, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2018/06/11
Accepted: 2018/06/30
Available online: 2018/06/30

Article Subject:
Clinical Microbiology

IJMM 2018; 12(2):68-77

Corresponding author:

Faramarz Masjedian Jazi
Asistant Professor of Medical Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Science, Tehran, Iran
Tel: 021-88058649
Email:
fmasjedian@yahoo.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Based on the frequently reports, final diagnosis of brucellosis is facing delay problem. Significant percentage of hospitalized patients has been under unspecified and mostly single treatment. Therefore laboratory evidence and use of highly sensitive methods have an important role in final diagnosis.

The increasing of brucellosis in recent years is due to increasing livestock infections and insufficient coverage of vaccination; we should also consider absence of active supervision on the distribution of livestock products specifically in local manufacturers and inefficient diagnostic procedures. Lack of coordination between responsible and decision-making centers such as subsidiaries of Ministry of Health and Agriculture has an important role. Unfortunately, despite the publication of numerous scientific papers, especially in the field of epidemiology, no clear picture of the status of brucellosis has been presented by the responsible authorities in Iran.

In this study, we tried to look at the situation of brucellosis in Iran and to find out more about the limitations and advantages of each method by describing the diagnostic properties of each method. The aim of this study is to provide routine diagnosis limitations and errors to undertake necessary revision in diagnostic measures, in particular at the health labs level.

Keywords: Brucellosis, Epidemiology, Laboratory Diagnosis

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Hajia M, Masjedian Jazi F. Looking Again at the Diagnosis of Brucellosis Difficulties in Iran. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (2) : 68-77

مقاله مروری

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۲ – خرداد-تیر ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

نگاهی مجدد به مشکلات تشخیصی بروسلوزیس در ایران

مسعود حاجیا[۱]، فرامرز مسجدیان جزی[۲]

۱. گروه زیست شناسی مولکولی، مرکز تحقیقات آزمایشگاه مرجع بهداشت و درمان، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۲. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۱

پذیرش:۱۳۹۷/۰۴/۰۹

انتشارآنلاین: ۱۳۹۷/۰۴/۰۹

موضوع:

میکروب شناسی بالینی

IJMM1397;12(2): 68-77

نویسنده مسئول:

فرامرز مسجدیان جزی

استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تلفن: ۸۸۰۵۸۶۴۹-۰۲۱

پست الکترونیک:

fmasjedian@yahoo.com

چکیده

براساس گزارش‌های متعدد، تشخیص بروسلوزیس در ایران با تأخیر همراه است. درصد بسیاری از بیماران بستری در بیمارستان‌ها پیش از درمان با آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی عمدتا بر اثر تشخیص‌های نادرست با داروهای متفرقه و اغلب تک‌دارویی بر اثر تشخیص ناصحیح درمان شده‌اند. چون در بروسلوزیس، درمان‌های مبتنی بر شواهد آزمایشگاهی و به‌کارگیری روش‌های تشخیصی با حساسیت قابل‌قبول اهمیت ویژه‌ای در تشخیص نهایی دارد.

مطالعات نشان داده است که افزایش جالب‌توجه بروسلوزیس در سال‌های اخیر مسلما با گسترش عفونت‌های دامی و نبود پوشش کافی واکسیناسیون دام‌ها مربوط است. اگرچه در کنار این موضوع نبودن نظارت کافی بر کارگاه‌های کوچک توزیع‌کنندهٔ محصولات دامی و لبنی آلوده و همچنین ناکارآمدی روش‌های تشخیصی نیز نقشی تعیین‌کننده دارند. البته ناهماهنگی بین مراکز مسئول و تصمیم‌گیرنده مثل واحدهای تابعه در وزارت بهداشت و جهاد کشاورزی نیز در این خصوص بی‌تأثیر نیست. متأسفانه با وجود انتشار مقالات علمی متعدد به‌ویژه دربارهٔ اپیدمیولوژی، نهادهای مسئول در ایران تصویر روشنی از موقعیت بروسلوزیس عرضه نکرده‌اند.

در این مطالعه سعی شده با نگاهی به وضعیت بیماری بروسلوزیس و شیوهٔ تشخیص آن در ایران، جدیدترین گزارش‌های انتشاریافته بررسی شده و با تشریح خصوصیات تشخیصی هریک از روش‌ها، با شناخت بهتر محدودیت‌ها و مزایای آنها شناخت بهتری پیدا کنیم. بر این اساس، هدف از این مطالعه آگاهی از محدودیت‌ها و مزایای روش‌های تشخیص آزمایشگاهی بروسلوزیس است تا این شناخت منجر به اتخاذ تصمیم‌های صحیح در آزمایشگاه‌ها برای انتخاب بهترین روش تشخیصی شود.

کلمات کلیدی: بروسلوزیس، اپیدمیولوژی، تشخیص آزمایشگاهی، مزایا، محدودیت‌ها

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

مقدمه

بین بیماری‌های عفونی, بروسلوزیس یکی از شایع‌ترین بیماری‌های زئونوز بوده که محدود به انسان نیست. در انتشار این بیماری که از نظر اقتصادی نیز اهمیت فراوانی دارد، عوامل متعددی از جمله نبودن پوشش مناسب واکسیناسیون دام‌ها درگیر هستند. بی‌تردید تردد آزاد دام‌ها در مناطق مرزی نقش بالایی در نبود پوشش برنامهٔ واکسیناسیون دامی دارد. مشکل مهم دیگر نظارت نداشتن مؤثر بر مواد لبنی محلی است که در انتشار بیماری در مناطق روستایی و شهری نقش اساسی را ایفا می‌کند؛ البته در اختیار نبودن آمار دقیق از میزان فراوانی و پراکندگی بیماری و انواع گونه‌ها در مناطق آندمیک، همچنین نبود بررسی‌های دقیق متمرکز نسبت به میزان حساسیت روش‌های تشخیصی سبب شده است که مراکز تشخیصی بهداشتی اهتمام لازم در ارتقای پروتکل‌های تشخیصی خود نداشته باشند و پیوسته از روش‌های تشخیص سنتی به‌ویژه در مناطق روستایی و شهرهای کوچک که دسترسی به خدمات بهتر آزمایشگاهی در آنها محدود است، استفاده کنند. بی‌شک وجود اطلاعات اپیدمیولوژیکی در تشخیص بالینی و آزمایشگاهی بیماری نقش مهمی دارد. همچنین نداشتن آگاهی مناسب دربارهٔ میزان مقاومت دارویی سبب طولانی شدن و پیشرفت

بیماری و در بسیاری از موارد منجر به عود بروسلوزیس می‌شود (۱). کنترل بیماری در این وضعیت، به هماهنگی سازمان‌های مختلف که هریک به‌نوعی در افزایش آن سهیم هستند، نیاز دارد.

گزارش‌های موجود نشان می‌دهند که در سال‌های اخیر، حداقل در برخی از مناطق کشور ما، میزان بروسلوزیس افزایش یافته است. بی‌شک یکی از مهم‌ترین علل آن مشکلات تشخیص آزمایشگاهی است که به‌دلایل متعددی از شیوهٔ رضایتمندی برخوردار نیست. وجود موارد منفی کاذب در روش کشت و همچنین آگلوتیناسیون لوله‌ای، بالاتر بودن تیتر آنتی‌بادی در افراد عادی مناطق آندمیک سبب شده که این روش‌ها کارایی لازم را نداشته باشند. همچنین استفاده نکردن از روش‌های مولکولی یا حتی سایر روش‌های تشخیصی در بسیاری از آزمایشگاه‌های مراکز بهداشتی بر پیچیدگی‌های تشخیصی این بیماری افزوده است. علاوه بر استفاده نکردن از روش‌های تأییدی مناسب و جایگزین، می‌توان به عوامل محدودکنندهٔ تشخیصی مثل پایین بودن کیفیت کیت‌های موجود در بازار و نبود مطالعهٔ جامع سرواپیدمیولوژیک دربارهٔ تعیین سطح تشخیص آنتی‌بادی‌های اختصاصی در روش‌های سرولوژیکی نیز اشاره کرد (۵-۲).

برخی نکات مرتبط با اپیدمیولوژی بروسلوزیس در ایران

بروسلوزیس یک بیماری ژئونوز است که مخزن آن دام‌هایی هستند که در زنجیرهٔ غذایی انسان نقشی اصلی دارند. اگرچه سایر چهارپایان نیز ممکن است آلوده شوند ولی نقش آنها می‌تواند فقط در انتقال بیماری بین دام‌ها یا به انسان باشد. مدتی است که احتمال وجود بیماری در برخی از گونه‌های دریایی مثل دلفین‌ها نیز مطرح شده است که در حال حاضر بدلیل عدم وجود گزارش و دسترسی به میزبان آن، از این نظر نگرانی جدی وجود ندارد (۶). بین گونه‌های بروسلا بیماری‌زایی ناشی از بروسلا سوئیس در ایران از شیوع پایین و محدودی برخوردار است زیرا میزبان عمدهٔ آن گراز و خوک است که گوشت آن در ایران مصرف نمی‌شود؛ اگرچه گزارش‌های پراکندهٔ ناشی از آن به‌ویژه در نواحی شمالی وجود دارد (۴).

شدت بیماری بروسلوزیس به میزان در معرض بودن و نوع گونهٔ آن بستگی دارد. بروسلا سوئیس شدت بیماری‌زایی بالایی دارد و پس از آن، بروسلا ملیتنسیس مطرح است. آلودگی به گونه‌های سوئیس، ملیتنسیس، آبورتوس و کانیس معمولا به‌ترتیب بیشتر در خوک، گوسفند، گاو و سگ گزارش شده است؛ اما باید توجه داشت که در یک مزرعه، در صورت وجود بیماری با هریک از گونه‌ها تمامی چهارپایان در معرض خطر ابتلا به بیماری هستند.

براساس گزارش‌های متعدد، راه غالب انتقال بروسلا به انسان انتقال از راه گوارشی با مصرف محصولات لبنی غیرپاستوریزه مثل شیر تازه و یا سایر محصولات تهیه‌شده از شیر غیرپاستوریزه است؛ به‌ویژه خامه و بستنی که سطح بالایی از ارگانیسم دارند. اگرچه در برخی از موارد انتقال از طریق تماس‌های مستقیم با احشاء دام آلوده در مناطق دامپروری، کشتارگاه‌ها و سایر مشاغلی که با دام سروکار دارند گزارش می‌شود. همچنین امکان انتقال از طریق ائروسل‌های محیطی نیز گزارش می‌شود (۸، ۷). بر این اساس به‌همین سبب این بیماری در مناطق روستایی نسبت به مناطق شهری فراوانی بیشتری دارد و ۶۸/۴٪ از روستاییان سابقهٔ تماس با حیوانات آلوده را دارند. بیماری در مناطق روستایی در مقایسه با مناطق شهری به‌مراتب بالاتر است (۱۲-۹).

بسیاری از کشورها اعلام کرده‌اند که قادر به ریشه‌کن کردن بیماری هستند؛ اما متأسفانه بیماری بروسلوزیس در بسیاری از کشورهای افریقایی و نواحی شرق مدیترانه تا هندوستان مشاهده می‌شود (۵). شیوع بیماری نیز از کشوری به کشور دیگر متفاوت است. در بسیاری از کشورها و از جمله ایران بروسلوزیس گاوی هنوز غالب‌ترین گونهٔ بروسلا است که براساس گزارش‌ها، در دههٔ اخیر در استان‌های شمال شرقی و شمال غربی ایران شیوع وسیعی داشته است. گزارش‌های مربوط به بررسی فراوانی بیماری در ایران بسیار زیاد است که متأسفانه هریک به ناحیهٔ خاصی از ایران محدود شده‌اند (۲۰-۱۶). طبق این گزارش‌ها فراوانی بروسلوزیس در مناطق گوناگون، متفاوت بوده و از تنوع بسیاری برخوردار است. بنا بر گزارش‌های منتشرشده فراوانی بروسلوزیس در مناطق مختلف تنوع بسیاری دارد.

بر این اساس Golshani و Buozari مناطق ایران را از نظر میزان آلودگی به ۴ دسته تقسیم کرده‌اند (۴). بررسی جامع‌تر دیگری نیز انجام شده است که Pakzad و همکاران میزان بروسلوزیس را براساس نمونه‌ها ثبت‌شده در ایران در فاصلهٔ سال‌های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۴ تعیین کرده‌اند (۳). علاوه بر آن یک بررسی فشردهٔ دیگری از سوی Mirnejad و همکاران مبنی بر گزارش‌های انتشاریافته انجام شده است که تا حدودی با گزارش Pakzad مطابقت و در برخی موارد با این گزارش منافات دارد (۳،۲۱). وقوع کلی در بررسی Pakzad و همکاران برای ایران ۳۸/۶۷ در ۱۰۰هزار نمونه گزارش شده است. Moosazadeh و

همکاران نیز براساس گزارش‌های منتشرشده، نزدیک به همین میزان را گزارش کرده‌اند که در طول فصول متفاوت سال متغیر است (۹). در مطالعهٔ Pakzad و همکاران بیشترین فراوانی مربوط به استان‌های نواحی زاگرس است که از ۳۱۷ در ۱۰۰هزار در ۲۰۱۱ به ۳۸۳ در صد هزار در سال ۲۰۱۴ افزایش یافته است (۳).

متأسفانه به‌دلایل متعدد، آماری که نشان‌دهندهٔ میزان بروسلوزیس بین کارکنان آزمایشگاه باشد، در دسترس نیست. با توجه به اینکه در بسیاری از آزمایشگاه‌ها نمونهٔ جمع‌آوری‌شده برای تشخیص بروسلوزیس نمونهٔ خون است و معمولا برای جداسازی و شناسایی فقط به کشت در محیط دی‌فازیک اکتفا شده و بواسطه عدم وجود سطح ایمنی زیستی مورد نیاز از انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت خودداری می‌شود، لذا احتمالا یکی از دلایل نبودن گزارش در این حوزه، جداسازی نشدن باکتری مولد در محیط کشت است. در شرایط موجود ریسک زیادیه به‌دنبال خواهد داشت؛ به‌نظر میرسد نبودن دستورالعمل مناسب در این موارد نیاز مند رسیدگی سازمان‌های مسئول میباشد.

باید یادآور شویم که انتشار سالانهٔ بیماری به تفکیک مناطق ضرورتی انکارناپذیر است که باید ادارات مسئول به آن توجه جدی کنند. نبودن برنامهٔ فراگیر واکسیناسون دامی، نظارت نداشتن بر پخش محلی محصولات دامی آلوده و در نهایت نداشتن دستورالعمل‌های تشخیصی مناسب برای تشخیص گروه‌های متفاوت بیماران همه سبب شده که کماکان این بیماری در ایران وقوع رو به افزایش باشد. لذا پیشگیری، کنترل و نهایتا ریشه‌کنی بروسلوزیس نیازمند اتخاذ سیاست‌های صحیح ادامه‌دار و فراگیر کشوری است. شاید زمان آن باشد با تشکیل کمیتهٔ کشوری با مسئولیت کامل از هدر رفتن بیش‌ازپیش منابع و افزایش وقوع بیماری جلوگیری شود.

تشخیص آزمایشگاهی

تشخیص آزمایشگاهی بروسلوزیس و تأیید قابل‌اطمینان بودن آن همواره برای پزشکان جایگاه مهمی دارد؛ اما هیچ‌گاه رضایتمندی کامل را جلب نکرده است. در بسیاری از بررسی‌های انجام‌شده در ایران، تأخیر در تشخیص بروسلوزیس یکی از مهم‌ترین عوامل افزایش بیماری و نیز منابع آلوده‌کننده ذکر شده است (۲۵،۲۶). بی‌شک مسئولیت این تأخیر در شناسایی متوجه پزشکان و آزمایشگاه است. به‌طور کلی، طی فرایند تشخیص آزمایشگاهی آنچه سبب کاهش حساسیت و افزایش موارد منفی کاذب می‌شود، می‌تواند دربارهٔ ویژگی‌های بیماری و طبیعت ارگانیسم، کیفیت کیت‌های تشخیصی و همچنین نحوهٔ به‌کارگیری آنها در حالت‌های گوناگون بیماری باشد. با وجود تمامی کوشش‌های محققین در طول این سال‌ها برای ارتقای پروتکل‌های تشخیصی در هر سه حیطه جداسازی، سرولوژی و مولکولی، هنوز هیچ‌یک از روش‌ها حساسیت مطلوبی ندارند و همان‌طور که اشاره شد این امر منجر به تأخیر در تشخیص یا گزارش منفی کاذب می‌شود. در بسیاری از بررسی‌های انجام‌شده در ایران گزارش شده که تأخیر در تشخیص بروسلوزیس یکی از عوامل مهم افزایش بیماری و شناسایی منابع آلوده‌کننده بوده است. در نمونه‌های بسیاری، نداشتن کیت‌های تشخیصی تأییدشده و استاندارد، بهره نبردن از پروتکل‌های تشخیصی متنوع، ناآگاهی از موارد خطا و منفی کاذب و آزمون‌های تشخیصی از مهم‌ترین دلایل این تأخیر است؛ لذا در ادامه سعی بر آن است که ویژگی‌های لازم برای انجام یک تشخیص قابل‌اطمینان و نیز عوامل منفی تأثیرگذار در سه حوزهٔ تشخیص کشت و جداسازی، روش‌های سرولوژیک و در نهایت تشخیص مولکولی بررسی شود.

سطح لازم ایمنی زیستی

در ابتدا مهم‌ترین موضوعی که باید به آن توجه کرد، جداسازی بروسلا از نمونه‌های کلینیکی با رعایت و تأمین سطح ایمنی زیستی مرتبط با میکروارگانیسم است. اگرچه این میکروارگانیسم در بسیاری از طبقه‌بندی‌ها در گروه خطر ۲ قرار دارد، اما در صورت نیاز به جداسازی و تعیین هویت در محیط‌های افتراقی نیازمند به‌کارگیری شرایط ایمنی زیستی بالاتری است (۱۹،۲۷،۲۸). البته در برخی کشورها حداقل دو گونه ملی تنسیس و سوئیس را در گروه خطر ۳ قرار می‌دهند که به‌معنی ضرورت تأمین شرایط ایمنی زیستی سطح ۳ است. این شرایط به‌واسطهٔ پایین بودن دوز لازم میکروارگانیسم برای ایجاد بیماری و همچنین قابلیت انتقال تنفسی آن از طریق آئروسل شدن است (۲۰). در بازدیدهایی که از آزمایشگاه‌های تشخیصی ایران انجام گرفت، مشاهده شده که در بیشتر آزمایشگاه‌ها شرایط ایمنی زیستی برای کشت نمونه‌های غیرخونی بروسلا و انجام آزمایش‌های لازم، حداقل استاندارد لازم را برای تعیین هویت ندارند. افزون بر آن نبود یک سیستم نظارتی ملی برای ارزیابی موارد اکتسابی در آزمایشگاه، اهمیت این ضعف را دوچندان می‌کند. اهمیت این ضعف و خطر ابتلای اکتسابی به بروسلا در آزمایشگاه‌های تشخیصی زمانی مشخص می‌شود که در نظر بگیریم میزان ابتلای عمومی به گونهٔ بروسلا ملیتنسیس که سبب

ایجاد فرم حاد بیماری می‌شود نسبت به گونه‌های دیگر شیوع بیشتری دارد (۳۱-۲۹).

کشت و جداسازی

در ایران درصد بالایی از نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه نمونهٔ خون هستند؛ البته علاوه بر نمونهٔ خون، نمونه‌هایی مثل آسپیره مغز استخوان، بافت، چرک، مایع مغزی نخاعی، پلور، مفصل و آسیت، پروستات و غیره می‌توانند بررسی شوند. معتبرترین و دقیق‌ترین روش تشخیص بروسلا جداسازی و تعیین هویت میکروارگانیسم است؛ اما وجود مشکلات متعدد سبب کاهش چشمگیر حساسیت این روش شده است؛ به‌گونه‌ای که در بیشتر آزمایشگاه‌ها کاربرد ندارد. بین نمونه‌های گوناگون یادشده، انتظار می‌رود که کشت خون در فاز حاد بیماری مؤثر باشد؛ البته باید زمان مناسب برای رشد میکروارگانیسم را که کند رشد است، در نظر گرفت. تشخیص احتمالی براساس مورفولوژی، خصوصیات بیوشیمیایی و ویژگی‌های سرولوژیکی به‌دست می‌آید. نباید کیت های تشخیصی تجاری کاملا اعتماد و تکیه کرد؛ زیرا ممکن است بروسلا را درست تشخیص ندهند و سهوا بروسلا را به‌عنوان موراکسلا فنیل پیرورویکا تعیین هویت کنند. با توجه به علائم بروسلوزیس، تشخیص صحیح بیماری مبتنی بر جداسازی ارگانیسم از نمونه‌ای متفاوت به‌ویژه خون قرار دارد. مثبت شدن کشت خون به فاکتورهای بسیاری مثل نوع میکروارگانیسم، چگونگی پیشرفت بیماری، تهیهٔ نمونهٔ قبل از درمان آنتی‌بیوتیکی، نوع محیط، حجم نمونهٔ برداشت‌شده و همچنین زمان نمونه‌گیری بستگی دارد (۵). البته باید توجه داشت میزان موفقیت در جداسازی میکروارگانیسم از نمونهٔ بالینی علاوه بر مباحث یادشده، می‌تواند به حالت بیماری نیز بستگی داشته باشد. شانس جداسازی میکروارگانیسم در شکل حاد بیماری به‌مراتب بیشتر از سایر اشکال مثل تحت حاد و مزمن است (۳۲). البته در مقایسه با خون نمونه‌برداری از مغز استخوان و کبد شانس بیشتری را برای جداسازی باکتری مولد به همراه خواهد داشت؛ ولی تهاجمی بودن روش‌های تهیهٔ این نمونه‌ها، سبب شده که آسپیرهٔ مغز استخوان و بیوپسی کبد کمتر به آزمایشگاه ارسال شود (۵).

برای افزایش میزان حساسیت محیط کشت، کوشش‌های بسیاری انجام شده است و شرکت‌های گوناگون محیط‌های دی فازیک با ترکیبات متفاوت را معرفی کرده‌اند. گزارش‌های عرضه شده حاکی از افزایش نسبی حساسیت در سیستم‌های جدیدتر است (۳۳). علاوه بر این، معرفی سیستم‌های اتوماتیک نه‌فقط نتایج رضایت‌بخش‌تری دارد، بلکه گزارش شده است رشد میکروارگانیسم در این سیستم‌ها سریع‌تر بوده و در نتیجه، در زمان کوتاه‌تری آماده می‌شود. به‌کارگیری این سیستم‌های جدید، به‌ویژه در مناطقی که موارد عفونت بالا نیست، با موفقیت بیشتری همراه بوده است. بررسی‌های متعدد انجام‌شده تأکید می‌کند که گرچه میزان شناسایی موارد مثبت از روش روتین بیشتر است، با وجود این، از روش سرولوژی و مولکولی کمتر است (۵)؛ البته با وجود کارایی مطلوب، به‌دلایل متفاوت استفاده از این سیستم‌ها در ایران گسترش نیافته است. برای آزادسازی ارگانیسم‌های درون سلولی، کوشش‌هایی انجام شده است تا حساسیت کشت را از طریق شست‌وشوی خون با آب مقطر و افزودن نمونهٔ سانتریفوژشده، افزایش دهند. دیگر روش استفاده‌شده، روش کشت خون لخته‌شده است. در این روش، خون لخته‌شده در یک لولهٔ درپیچ‌دار حاوی دانه‌های شیشه‌ای قرار می‌گیرد، سپس روی شیکر به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و پس از تخریب سلول به محیط کاستاندا منتقل می‌شود. مزیت این روش علاوه بر آزاد شدن باکتری، حذف مواد آنتی‌بیوتیکی موجود در جریان خون است تا امکان رشد بهتر ارگانیسم را فراهم کند. با این همه، نتایج به‌دست آمده از مقایسهٔ روش معمول با شست‌وشوی گلبول قرمز نشان داده است که این روش در نمونه‌های بررسی‌شده ارجحیتی در جداسازی بروسلا ندارد. به‌نظر می‌رسد تنها امتیاز مهم این روش سرعت جداسازی باکتری باشد؛ البته در کنار این مزیت باید توجه داشت که خطر انتشار بروسلا در محل کار و احتمال آلودگی محیط کشت با باکتری‌های موجود در فضای آزمایشگاه نیز افزایش می‌یابد. در مجموع، عملا کشت بروسلا در آزمایشگاه‌ها کارایی مطلوبی ندارد. بررسی‌های دقیق در این ارتباط انجام نشده است؛ اما بیشتر گزارش‌های محیطی حاکی از حساسیت بسیار پایین در حد ۳ درصد در ایران هستند (۱).

روش‌های تشخیص سرولوژیکی

آزمایش آگلوتیناسیون لوله‌ای: روش آگلوتیناسیون لوله‌ای مبتنی بر استفاده از آنتی‌ژن‌های LPS است که با برخی از باکتری‌ها مثل سویه‌هایی از اشرشیاکلی، سالمونلا، ویبریوکلرا (یا در افراد واکسینه‌شده با واکسن وبا)، یرسینیا آنتروکولیتیکا (سروتیپ ۹) و عامل تولارمی واکنش متقاطع دارد. نبودن امکان تشخیص قاطع حالت حاد از مزمن، بالا بودن تیتر آنتی‌بادی در افراد عادی مناطق آندمیک، از سوی این تست‌ها از این موارد است (۳۷-۳۴). آنتی‌بادی بروسلاکانیس به‌سبب نداشتن آنتی‌ژن مشترک با این

آنتی‌ژن قابل‌تشخیص نیست. علاوه بر این، برخی نمونه‌هایی که در آنها بروسلا ملی تنسیس نیز واکنش ضعیفی از خود نشان می‌دهند، گزارش شده است. البته که اتخاذ برخی اقدامات اصلاحی مثل انجام تست در شرایط pH نزدیک به نرمال (طبیعی) و یا به‌کارگیری EDTA سبب افزایش ویژگی و حساسیت تست می‌شود (۴۰-۳۸). روش‌های رایت، کومبس رایت و دو مرکاپتو اتانل در سطح آزمایشگاه‌ها به‌ویژه آزمایشگاه‌های بهداشتی به‌ویژه آزمایشگاه‌های بهداشتی بسیار متداول است. شرایط به‌کارگیری هریک از این روش‌های مربوط به چگونگی حضور آنتی‌بادی‌ها پس از تحریک سیستم ایمنی و همچنین تظاهرات بالینی بیمار کارایی خاص خود را دارند (۵).

دربارهٔ تیتر تشخیصی که به‌معنی وجود بیماری باشد، چندین سال است که در ایران مبنای تشخیصی از تیتر ۱/۱۶۰ به ۱/۸۰ کاهش یافته است. شاید حساسیت تست افزایش یابد؛ گرچه این حد تشخیصی قادر نخواهد بود وجود بیماری را در افرادی که در مناطق آندمیک زندگی می‌کنند یا آن دسته که به‌واسطهٔ تماس‌های شغلی با دام و محصولات دامی تیتر بالاتری دارند، تعیین کند (۴۱). متأسفانه با وجود ملاک قرار دادن حد تشخیصی ۱/۸۰ در عدهٔ بسیاری از بیماران که شواهد کلینیکی آنها حکایت از ابتلا به بروسلوزیس دارد، تیتر آنتی‌بادی افزایش جالب‌توجهی ندارد (۴۲،۴۶، ۵). در یک بررسی انجام‌شده، فراوانی آنتی‌بادی‌ها در تست‌های رایت، کومبس و 2ME به‌ترتیب ۲۹/۵٪، ۲۹/۹٪ و ۲۱/۱٪ گزارش شده است (۳۶)؛ لذا در این موارد ضروری است که از سایر روش‌های تشخیصی آلترناتیو استفاده شود.

در یک جمع‌بندی کوتاه دربارهٔ روش‌های مبتنی بر آگلوتیناسیون به‌نظر می‌رسد که صرف‌نظر از برخی محدودیت‌های تکنیکی و مواردی مرتبط با زمان ظهور و بقای انواع آنتی‌بادی‌ها که سبب واکنش منفی کاذب می‌شود، سایر نمونه‌های منفی کاذب می‌تواند به کیفیت کیت‌های تشخیصی در ایران مربوط باشد یا مرتبط با بیمارانی باشد که به‌واسطهٔ نبود تشخیص به‌موقع، درگیر شرایط پیچیدهٔ بالینی شده‌اند و بیماری آنان مزمن شده، کانون عفونت به سایر بافت‌ها انتشار یافته باشد.

آزمایش آلایزا: مدتی است که از روش آلایزا برای تشخیص بروسلوزیس، به‌منظور برطرف کردن ضعف‌های روش جداسازی و سرولوژی استفاده می‌شود. روش آلایزا که هم‌اکنون در آزمایشگاه استفاده می‌شود، براساس اندازه‌گیری آنتی‌بادی بروسلایی با آنتی‌ژن اختصاصی است. شناسایی و تخلیص آنتی‌ژن اختصاصی برای فائق آمدن بر مشکل واکنش متقاطع است و دارای که حساسیت گزارش‌شدهٔ آن ۷۵٪ است. به‌موازات به‌کارگیری روش آنزیم ایمونو اسی برای بررسی دقیق‌تر افزایش تیتر آنتی‌بادی، برخی از محققین تلاش کرده‌اند که با استفاده از منوکلونال آنتی بادی در روش آلایزا، علاوه بر تأمین ویژگی مطلوب حساسیت تست را برای تعیین تمامی موارد مثبت هرچه بیشتر افزایش دهند. گزارش‌های ارائه‌شده حاکی از ویژگی ۱۰۰٪ و حساسیت بالای ۸۵٪ در موارد حاد بیماری است؛ اما کماکان در موارد مزمن حساسیت پایینی دارد. در بررسی مقایسه‌ای که دکتر Amirzargar و همکاران در بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی انجام داده‌اند، گزارش شده که برخی از نمونه‌های آلایزای منفی با روش آگلوتیناسین مثبت بوده‌اند و بالعکس (۴۸)؛ البته گزارش شده است که نمونه‌های PCR و آگلوتیناسیون منفی می‌توانند در الیزا نتیجهٔ مثبت داشته باشند (۵۰).

سایر روش‌های تشخیصی: برای تشخیص مننژیت بروسلایی می‌توان با به‌کار بردن مایع نخاع، از تست کانتر ایمونوالکتروفورز کمک گرفت. در تشخیص این بیماری، جستجوی آنتی‌بادی‌های سرم با روش غیرمستقیم آنتی‌بادی فلورسنت نیز به‌کار می‌رود. به‌تازگی روش‌های ایمونوکپچر و روش کومبس ژل نیز معرفی شده‌اند. در روش ایمیونوکپچر که در پلیت‌های میکرووول انجام می‌شود، حضور هر سه کلاس آنتی‌بادی IgG ، IgA و IgM با آنتی‌سرم کومبس شناسایی می‌شود. اگرچه در گزارش‌های منتشرشده، این روش حساسیت بیشتری دارد؛ اما میزان حساسیت آن هنوز رضایتمندی مناسبی را ایجاد نکرده است. از میزان حساسیت روش کومبس ژل که اخیرا فقط در برخی آزمایشگاه‌ها استفاده شده، ارزیابی دقیقی ارائه نشده است (۲،۴۳).

روش‌های مولکولی: وجود درمان مشابه برای بیماری ناشی از همهٔ گونه‌های پاتوژن بروسلا سبب شده که محققین عمدتا در پی شناسایی ژنی باشند که قادر به تشخیص همهٔ بروسلاها باشد. لذا، وجود این گونه‌های متعدد تا حدودی انتخاب ژن مناسب برای انجام کارهای تشخیص مولکولی را مشکل ساخته است. ژن انتخاب‌شده باید همولوژی مطلوبی بین گونه‌ها و حتی سویه‌های هر ارگانیسم داشته باشد؛ البته در بررسی‌های اپیدمیولوژیکی یا سایر موارد که شناسایی نوع گونه اهمیت زیادی دارد، ضروری است طراحی آزمایش (پرایمر) به نحوی باشد که اختصاصا فقط گونهٔ مربوطه شناسایی شود. بدیهی است ژن و ناحیهٔ انتخاب‌شده نباید با سایر ارگانیسم‌ها همولوژی داشته باشد. ژن‌هایی که تابه‌حال استفاده شده‌اند عمدتا عبارتند از *16S rRNA*، ژن پروتئین‌های غشای بیرونی با وزن ملکولی ۳۶،۳۱ و ۲۵ کیلو

دالتون، به‌ویژه ژن *bcsp31* و *omp-2*، عناصر الحاقی (IS elements) و ناحیهٔ بین ژنی *16S-23S RNA* که برای هریک از سکانس‌های متفاوتی به‌کار رفته‌اند و پروتکل‌های گوناگونی طراحی شده است (۵۲-۴۹). متداول‌ترین پروتکل‌های استفاده‌شده براساس ژن *bcsp31* بود (۵۵). روش PCR پس از طراحی و اپتیمایز شدن، برای تعیین ژن مذکور در نمونه‌های کلینیکی در بررسی‌های گوناگون استفاده شده و در بروسلاها با موفقیت همراه بوده است؛ البته با توجه به اهداف تست، ممکن است از پرایمرهای خاصی استفاده شود (۲). معرفی روش‌های مبتنی بر سیگنال (Signal Based) توانسته حساسیت را اندکی بهبود دهد (۵۸-۵۶). به‌کارگیری این روش‌ها در مطالعات مقایسه‌ای مشخص کرده که متأسفانه هیچ‌یک از این گزارش‌ها حساسیت نسبتا کاملی در نمونه‌های استفاده‌شده، به‌ویژه در بیماران بستری در بیمارستان یا مواردی که بیمار مبتلا به بروسلوزیس مزمن است را تأیید نکرده‌اند (۵۷-۴۷). یکی از دلایل آن ماهیت درون سلولی بودن ارگانیسم و خود بیماری است که سبب کاهش حساسیت می‌شود. البته علت اصلی می‌تواند عمدتا وجود مشکلات تکنیکی نحوهٔ انجام کار هم باشد. مهم‌ترین مواردی که در به‌کارگیری آزمایش PCR برای افزایش حساسیت آزمایش در نمونه بیماران باید به آنها توجه داشت عبارتند از (۲):

- بهینه و استانداردسازی: ضروری است کلیهٔ کیت‌های تشخیصی به‌ویژه روش‌های خانگی، در صورت استفاده از نظر میزان حساسیت در تایپ‌های بروسلا، سطح تشخیصی و ویژگی آن دقیق ارزیابی شوند و پیش از به‌کارگیری آن به‌عنوان یک روش تشخیصی در ارزیابی بالینی بررسی شده باشند.

- استفاده از نمونهٔ مناسب: متأسفانه در بسیاری از بررسی‌ها دیده می‌شود که از نمونهٔ سرم به‌جای خون تام استفاده شده است. از آنجا که بروسلا ارگانیسم درون سلولی است، در صورت استفاده از این نمونه آن تعداد بروسلا که درون سلول وجود دارند با این نمونه از دست خواهیم داد.

- استفاده نکردن از نمونهٔ بیمارانی که پیش از نمونه‌گیری تحت درمان هستند. گزارش‌های بسیاری تأکید دارند که وجود آنتی بیوتیک در نمونهٔ خون باعث منفی شدن نتیجهٔ آزمایش می‌شود.

- استفاده از روش تشخیصی استاندارد: اصولا هیچ‌یک از روش‌های تشخیصی بازیافت صددرصدی ژنوم ارگانیسم را تأیید نمی‌کنند؛ اما در روش‌های تأییدشده بازیافت ژنوم، از سطح بالایی برخوردار می‌باشد.

- طراحی پرایمر و پروب برای کلیهٔ گونه‌های پاتوژن بروسلا. متأسفانه ما در ایران آمار صحیحی از میزان فراوانی و پراکنندگی گونه‌های بروسلا نداریم، مضافا آنکه در پروتکل‌های خانگی ضروری است طراحی به‌گونه‌ای انجام شود که قادر به شناسایی تمامی تایپ‌ها باشند.

نتیجه‌گیری

متأسفانه تشخیص بروسلوزیس در ایران با چالش‌های بسیاری روبه‌رو بوده که به حوزه‌های متفاوتی مرتبط است. در دسترس نبودن کیت‌های معتبر سرولوژیک در آزمایشگاه‌های بهداشتی و در دسترس نبودن دستورالعمل‌های کاری به‌روزشده، استفاده نکردن از روش‌های با حساسیت بالا به‌ویژه در آزمایشگاه‌های بهداشتی سبب شده تا تشخیص بیماری و کانون عفونت با تأخیر شناسایی شود و میزان موارد منفی کاذب بیش از حد انتظار باشد. مضافا آنکه در بیماران با شرایط پیچیده و بستری در بیمارستان، با توجه به ناکارآمدی روش‌های معمول نیازمند سایر روش‌های تشخیصی مناسب‌تر هستیم.

بی‌گمان انجام پژوهش‌های لازم برای نمایش تصویری روشن از پراکندگی گونهٔ بروسلایی و مقاومت‌های دارویی آن در مناطق ایران، نظارت فعال بر واکسیناسیون دامی و توزیع محصولات آن و بالاخره تعیین مراکز تخصصی تشخیص بالینی و آزمایشگاهی در مناطق آندمیک سه موضوعی است که توجه بدان مسلما می‌تواند سبب کاهش فراوانی بیماری و تأخیر در تشخیص بروسلا باشد.

سپاسگزاری

این مقاله به درخواست اقای دکتر ایراجیان تدوین شده نویسندگان از ایشان جهت فراهم نمودن این فرصت تشکر می نمایند و امیدواریم برای مخاطبین سودمند قرار گیرد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Hajia M, Keramat F. Study on the rate of brucellosis relapse and efficiency of different treatment protocols among hospitalized patients. J Mil Med. 2003;5(3):195-9.
2. Hajia M, Soharbi A. Brucellosis: Laboratory Diagnosis, its challenges and prospective. Iran J Path. 2018;13(2):
3. Pakzad R, Pakzad I, Safiri S, Shirzadi MR, Mohammadpour M, Behroozi A, et al. Spatiotemporal analysis of brucellosis incidence in Iran from 2011 to 2014 using GIS. Int J Infect Dis. 2018;67:129-36. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.10.017 PMID:29122689
4. Golshani M, Buozari S. A Review of Brucellosis in Iran: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis, Control, and Prevention. Iran Biomed J. 2017;21(6):349-59. PMID:28766326 PMCID: PMC5572431
5. Hajia M. The Challenges in Diagnosis of Brucellosis Serological Tests and Available Approaches . Iran J Med Microbiol. 2018;12(1):1-5.
6. WHO. Brucellosis in Humans and animals. World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland. 2006.
7. Rostami F, Borzoueisileh S, Ebrahimpour S. An overview of brucellosis epidemic in Iran. Crescent Journal of Medical and Biological Sciences. 2016;3(1):35-6. http://www.cjmb.org/pdf.php?id=54
8. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman`s Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006.
9. Moosazadeh M, Abedi G, Kheradmand M, Safiri S, Nikaeen R. Seasonal pattern of brucellosis in Iran: A systematic review and meta-analysis. Iran J Health Sci. 2016;4(1):62-72. http://jhs.mazums.ac.ir/article-1-377-en.html
10. Hajia M, Rahbar M, Keramat F. Epidemiological, clinical, diagnostic and treatment aspects of hospitalized brucellosis patients in Hamadan. Ann Trop Med Public Health. 2009;2(2):42-5.
11. Esmaeili H. Brucellosis in Islamic republic of Iran. Journal of Medical Bacteriology. 2014;3(3-4):47-57.
12. Mostafavi E, Asmand M. Trend of brucellosis in Iran from 1991 to 2008. Iran J Epidemiol. 2012;8(1):93-100. http://irje.tums.ac.ir/article-1-24-en.html
13. Poole PM. A 6-year survey of human brucellosis in a rural area of north-western England and north Wales. Postgrad Med J. 1975;51(597):433-40. http://dx.doi.org/10.1136/pgmj.51.597.433
14. Chamberlin WE. Early history of bovine brucellosis eradication in Australia. Aust Vet J. 1985;62(9):289-92. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1985.tb14907.x
15. Eales KM, Norton RE, Ketheesan N. Brucellosis in northern Australia. Am J Trop Med Hyg. 2010;83(4):876-8. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0237 PMID:20889883 PMCID: PMC2946760
16. Dasjerdi MZ, Nobari RF, Ramezanpour J. Epidemiological features of human brucellosis in central Iran, 2006-2011. Public Health. 2012;126(12):1058-62. https://doi.org/10.1016/j.puhe.2012.07.001 PMID:22884862
17. Kassiri H, Amani H, Lotfi M. Epidemiological, laboratory, diagnostic and public health aspects of human brucellosis in Western Iran. Asian Pac J Trop Biomed. 2013;3(8):589-94. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60121-5
18. Kimman TG, Eric Smit E, Klein MR. Evidence-Based Biosafety: a Review of the Principles and Effectiveness of Microbiological Containment Measures. Clin Microbiol Rev. 2008;21(3):403-25. https://doi.org/10.1128/CMR.00014-08 PMID:18625678 PMCID:PMC2493080
19. Moradi G, Kanani S, Majidpour M, Ghaderi A. Epidemiological status survey of 3880 case of brucellosis in Kurdistan. Iran J Infect Dis Trop Med. 2006;11(33):27-33.
20. Khazaei S, Shojaeian M, Zamani R, Mansori K, Mohammadian-Hafshejani A, Rezaeian-Langroodi R, Ayubi E, Khazaei Z. Epidemiology and risk factors of childhood brucellosis in West of Iran. Int J Pediatr. 2016;4(7):2099-104.
21. Mirnejad R, Jazi FM, Mostafaei S, Sedighi M. Epidemiology of brucellosis in Iran: A comprehensive systematic review and meta-analysis study. Microb Pathog. 2017;109:239-47. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.005 PMID:28602839
22. Hasanzadeh A, Rahimi I, Shakerian A. Survey of epidemiology brucellosis in Mobarakeh, Esfahan from 2003 to 2010. Bull Env Pharmacol Life Sci. 2013;2(12):87-90.
23. Bokaie S, Sharifi L, Alizadeh H. Epidemiological survey of brucellosis in human and animals in Birjand, east of Iran. J Anim Vet Adv. 2008;7(4):460-3.

24. Zeinalian Dastjerdi M, Fadaei Nobari R, Ramazanpour J. Epidemiological features of human brucellosis in central Iran, 2006-2011. *Public health* 2012; **126**(12): 1058-1062. 32.

25. Azizi F, Hatami H, Janghorbani M. Epidemiology and control of common diseases in Iran. 4nd ed. Tehran: Khosravi Publishing; 2010.

26. Alavi SM, Mugahi S, Nashibi R, Gharkholu S. Brucellosis risk factors in the southwestern province of Khuzestan, Iran. Int J Enteric Pathog. 2014;2(1):1-4. https://doi.org/10.17795/ijep15610

27. Chegeni AS, Ezatpour B, Saki M, Mokhayeri H, Adavi S, Nasiri E, et al. Seroepidemiology of human brucellosis in nomads in a rural area of Iran. Asian Pac J Trop Dis. 2014;4(4):333-6. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60584-3

28. Beheshti S, Rezaian GR, Azad F, Faghiri Z, Taheri F. Seroprevalence of brucellosis and risk factors related to high risk occupational groups in Kazeroon, South of Iran. Int J Occup Environ Med. 2010;1(2):62-8. PMID:23022787

29. Bossi P, Tegnell A, Baka A, Van Loock F, Hendriks J, Werner A, et al. Bichat guidelines for the clinical management of brucellosis and bioterrorism-related brucellosis. Euro Surveill. 2004;9(12):33-4. https://doi.org/10.2807/esm.09.12.00506-en PMID:29183471

30. Hatami H. Bioterrorism. http://www.hbi.dmr.or.ir(FTP DIR) pub/computerized-books

31. Rita M. Traxler RM, Lehman MW, Bosserman EA, Guerra MA, Smith TL. A Literature Review of Laboratory-Acquired Brucellosis. J Clin Microbiol. 2013;51(9):3055-62. https://doi.org/10.1128/JCM.00135-13 PMID:23824774 PMCID:PMC3754682

32. Bahador A, Mansoori N, Esmaeili D, Sabri RA. Brucellosis: Prevalence and retrospective evaluation of risk factors in western cities of Tehran province, Iran. Afr J Microbiol Res. 2012;4(3):33-7. https://doi.org/10.5897/JBR12.010

33. Roushan MH, Mohrez M, Gangi SS, Amiri MS, Hajiahmadi M. Epidemiological features and clinical manifestations in 469 adult patients with brucellosis in Babol, Northern Iran. Epidemiol Infect. 2004;132(6):1109-14. https://doi.org/10.1017/S0950268804002833

34. Madkour MM, Kasper DL. Brucellosis. In Harrison`s principles of internal medicine. Eds:Braunwald E, Fauei AS, Kasper DL, et al. New York: McGraw Hill; 2001. p. 986-9.

35. Amaranth SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. Indian J Med Microbiol, 2007;25(3):188-202. https://doi.org/10.4103/0255-0857.34758

36. Hajia M, Rahbar M. Isolation of Brucella from blood culture of hospitalized brucellosis patients. Iran J Clin Infect Dis. 2006;1(2):5-10.

37. Hajia M, Rahbar M, Taghavi HA. Brucellosis Antibody Level of Hospitalized Patients in Hamadan, Western Iran. Shiraz E Med J. 2007;8(3):1-5.

38. Franco MP, Mulder M, Gilman R, Smits HL. Human Brucellosis. Lancet Infect Dis. 2007;7(12):775-86. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70286-4

39. Nielsen K, Smith P, Widdison J, Gall D, Kelly L, Kelly W, et al. Serological relationship between cattle exposed to Brucella abortus, Yersinia enterocolitica O: 9 and Escherichia coli O157: H7. Vet Microbiol. 2004;100(1-2):25-30. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.12.010 PMID:15135510

40. Perry MB, Bundle DR. Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of Brucella. In: Adams LG, editor. Advances in brucellosis research. Austin, Texas: Texas A&M University Press; 1990. p. 76-88.

41. Zeinali M, Shirzadi MR, Haj rasuliha H. National Guideline for Brucellosis Control. 2nd ed. Tehran: Raz Nahan Publishing; 2012.

42. Zowghi E, Samar G. Interpretation of brucellosis serology tests [in Persian]. Nabz J. 1996;6:30Y34.

43. Zowghi E, Ebadi A. Typing of *Brucella* strains isolated in Iran. Archive of institute Razi. 1982;33(1):109-14. http://dx.doi.org/10.22092/ari.1982.108881

44. Memish Z, Mah MW, Suliman AM, Shaalan M, Khan Y. Brucella Bacteraemia: Clinical and Laboratory Observations in 160 Patients. J Infect. 2000;40(1):59-63. https://doi.org/10.1053/jinf.1999.0586

45. Christopher S, Umapathy BL, Ravikumar KL. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. J Lab Physicians. 2010;2(2):55-60. https://doi.org/10.4103/0974-2727.72149 PMID:21346896 PMCID:PMC3040083

46. Mantur BG, Amarnath, Shinde RS. Review of Clinical and Laboratory features of human brucellosis. Indian J Med Microbiol 2007;25(3):188-202. https://doi.org/10.4103/0255-0857.34758

47. Vakili Z, Momen Heravi M, Sharif AR, Masoumi M. Sensitivity and specificity of ELISA test in diagnosis of brucellosis. Kowsar Medical Journal. 2010;15(2):95-8.

48. Amirzargar AA, Hassibi M, Maleknejad P, Piri-Dougahe H, Jafari S, Bakhsh AS, et al. Comparison of diagnostic methods in hospitalized patients with brucellosis in Iran. Inf Dis Clin Pract. 2009;17(4):239-42. https://doi.org/10.1097/IPC.0b013e31818718e8

49. Al-Attas R A, Al-Khalifa M, Al-Qurashi RA, Badway M, Al-Gualy N. Evaluation of PCR, Culture and Serology for the diagnosis of acute human brucellosis. Ann Saudi Med. 2000;20(3-4):224-8. https://doi.org/10.5144/0256-4947.2000.224 PMID:17322662

50. Fox KF, Fox A, Nagpal M, Steinberg P, Heroux K. Identification of Brucella by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation of Brucella canis from other Brucella spp. pathogenic for humans by carbohydrate profiles. J Clin Microbiol. 1998;36(11):3217-22. PMID:9774568 PMCID:PMC105304

51. Leal-Klevezas DS, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP. Molecular detection of Brucella spp.: rapid identification of B. abortus biovar I using PCR. Arch Med Res. 1995;26(3):263-7. PMID:8580678

52. Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD. Rapid diagnosis of Human brucellosis by peripheral-Blood PCR assay. J Clin Microbiol. 1997;35(11):2927-30. PMID:9350761 PMCID:PMC230089

53. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I. Specific detection of Brucella DNA by PCR. J Clin Microbiol. 1995;33(3):615-7. PMID:7538508 PMCID:PMC227999

54. Baily GG, Krahn JB Drasar BS, Stoker NG. Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification. J Trop Med Hyg. 1992;95(4):271-5. PMID:1495123

55. Jazi FM, Mirnejad R, Piranfar V, Mozafari NA, Salehi TZ, Khormali M, et al. Real-time PCR and high-resolution melt analysis methods for detection of pathogenic species of Brucella. J Clin Lab Med. 2017;41(6):325-31.

56. Piranfar V, Sharif M, Hashemi M, Vahdati AR, Mirnejad R, Detection and discrimination of two Brucella species by multiplex real-time PCR and high-resolution melt analysis curve from human blood and comparison of results using RFLP. Iran J Basic Med Sci. 2015;18(9):909-14. PMID:26523223 PMCID:PMC4620191

57. Hajia M, Fallah F, Angoti G, Karimi A,Rahbar M, Gachkar L, et al. Comparison of methods for diagnosing Brucellosis. Lab Med. 2013;44(1):29-33. https://doi.org/10.1309/LM4J9MWOBIP A6RBN