

Comparison of the sensitivity and specificity of modified Rose Bengal and ELISA test in the diagnosis of brucellosis

Behrooz Halashi¹, Hanieh Tarokhian², Babak Sayad³, Farhad Salari², Ali Gorgin Karaji⁴

1. MSc, Emam Reza Hospital, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0002-0360-7217

2. Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Tarokhian ORCID ID: 0000-0001-8920-6352, Salary ORCID ID: 0000-0003-3211-0354

3. Professor, Department of Infectious Disease, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8686-9986

4. Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran., (Corresponding Author), Tel: 083-34274618-20, Email: a_gorginkaraji@kums.ac.ir, ORCID ID: 0000-0003-4537-5722

ABSTRACT

Background and Aim: Brucellosis is a zoonotic disease and is one of the major health problems in our country. Considering its nonspecific symptoms, diagnosis of this disease is often made by laboratory methods. The purpose of the present study was to compare the sensitivity and specificity of ELISA and a relatively new modified Rose Bengal test in the diagnosis of brucellosis.

Material and Methods: In this cross-sectional study, blood samples were taken from 162 patients who had been diagnosed by an infectious disease specialist as suspected brucellosis. We used clot tube for serum preparation and anticoagulant tube to prevent coagulation. Serum was used for modified Rose Bengal test and ELISA tests and blood with anticoagulant was used for PCR test, as a gold standard test.

Results: The results of this study showed that modified Rose Bengal test had high sensitivity (94%) and relatively good specificity (70%), compared to PCR. In addition, ELISA test for IgG specific to *Brucella* antigen also had the same sensitivity and specificity as the modified Rose Bengal test (sensitivity 94% and specificity 71%). In contrast, ELISA test for IgM specific to *Brucella* antigen, showed high (84%) specificity, but low (65%) sensitivity.

Conclusion: The results of this study showed that the sensitivity and specificity of the modified Rose Bengal test were similar to those of ELISA test for IgG and could be a good alternative to this expensive and complex test in the diagnosis of brucellosis.

Keywords: Modified rose Bengal, IgG ELISA, IgM ELISA, Polymerase chain reaction

Received: Aug 5, 2019

Accepted: Nov 11, 2019

How to cite the article: Behrooz Halashi, Hanieh Tarokhian, Babak Sayad, Farhad Salari, Ali Gorgin Karaji. A Comparative Study of the Sensitivity and Specificity of the Modified Rose Bengal Test and the ELISA Test in the Diagnosis of Brucellosis. SJKU 2020;25(3):1-13.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

بررسی مقایسه‌ای حساسیت و ویژگی آزمایش رزبنگال اصلاح شده و آزمایش الایزا در تشخیص

بیماری بروسلوز

بهروز هلسی^۱، هانیه تارخیان^۲، بابک صیاد^۳، فرهاد سالاری^۴، علی گرگین کرگی^۴

۱. کارشناس ارشد ایمنولوژی، بیمارستان امام رضا، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید: ۷۲۱۷-۰۳۶۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰-۰۰۰۰

۲. استادیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید تارخیان: ۶۳۵۲-۰۳۴۲۰-۰۰۰۱-۰۰۰۰-۰۰۰۰

کد ارکید سالاری: ۰۳۵۴-۳۲۱۱-۰۰۰۳-۰۰۰۰-۰۰۰۰

۳. استاد گروه عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید: ۹۹۸۶-۸۶۸۶-۰۰۰۱-۰۰۰۰-۰۰۰۰

۴. دانشیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۸۳-۳۴۲۷۴۶۱۸-۰۸۳، پست الکترونیک:

a_gorginkaraji@kums.ac.ir، کد ارکید: ۵۷۲۲-۴۵۳۷-۰۰۰۳-۰۰۰۰-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز یک بیماری زئونوز است و از مشکلات بهداشتی مهم کشور محسوب می‌شود. تشخیص این بیماری، به دلیل علائم غیراختصاصی، اغلب به کمک روش‌های آزمایشگاهی صورت می‌گیرد. هدف از مطالعه حاضر بررسی مقایسه‌ای حساسیت و ویژگی آزمایش الایزا و آزمایش رزبنگال اصلاح شده در تشخیص بیماری بروسلوز بود.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه مقطعی، از ۱۶۲ فرد مشکوک به بروسلوز نمونه خون گرفته شد. بخشی از این خون به لوله لخته، جهت تهیه سرم و بخش دیگر به لوله واجد ضد انعقاد منتقل شد. سرم جهت انجام آزمایش رزبنگال اصلاح شده و آزمایش الایزا استفاده شد و خون واجد ضد انعقاد برای انجام آزمایش PCR، به‌عنوان استاندارد طلایی، مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که در مقایسه با روش PCR، آزمایش رزبنگال اصلاح شده، دارای حساسیت بالا (۹۴٪) و ویژگی نسبتاً خوب (۷۰٪) بود. بعلاوه آزمایش الایزا برای IgG ضد آنتی ژن بروسلا نیز دارای حساسیت و ویژگی مشابه با آزمایش رزبنگال اصلاح شده، بود (حساسیت ۹۴٪ و ویژگی ۷۱٪). در مقابل، آزمایش الایزا برای IgM ضد آنتی ژن بروسلا، ویژگی بالا (۸۴٪)؛ اما حساسیت پایین (۶۵٪) نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که حساسیت و ویژگی آزمایش رزبنگال اصلاح شده مشابه با آزمایش الایزا برای IgG بوده و می‌تواند جایگزین مناسبی برای این آزمایش پرهزینه و پیچیده، در تشخیص بیماری بروسلوز باشد.

کلمات کلیدی: رزبنگال اصلاح شده، الایزای IgG، الایزای IgM، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

و وصول مقاله: ۹۸/۵/۱۴ اصلاحیه نهایی: ۹۸/۸/۱۹ پذیرش: ۹۸/۸/۲۰

مقدمه

بیماری بروسلوز که به عنوان «تب مواج»، «تب مدیترانه ای» یا «تب مالت» نیز شناخته می شود، توسط باکتری های جنس بروسلا ایجاد می شود (۱). این بیماری، در انسان، در اثر تماس مستقیم یا غیرمستقیم با حیوانات آلوده یا محصولات آن ها و یا مصرف لبنیات غیرپاستوریزه ایجاد می شود (۲، ۳). بیماری تب مالت گرچه در کشورهای پیش رفته صنعتی ریشه کن شده است؛ اما در خاورمیانه (از جمله ایران)، هند، مکزیک، آمریکای مرکزی و جنوبی شایع بوده و از مشکلات مهم بهداشتی در این کشورها بشمار می رود (۴).

تشخیص بیماری تب مالت عمدتاً بر اساس علائم بالینی بیماری، اپیدمیولوژی و نتایج روش های آزمایشگاهی مانند کشت خون، آزمایش های سرولوژیک و روش های مولکولی صورت می گیرد (۵). گرچه کشت خون، دقیق ترین و معتبرترین روش تشخیص بیماری محسوب می شود؛ اما در عمل خیلی کم مثبت می شود، بعلاوه خطر انتقال بیماری به کارکنان آزمایشگاه را نیز در بر دارد (۶)؛ بنابراین، تشخیص آزمایشگاهی تب مالت عمدتاً با استفاده از آزمایش های سرولوژیک که روش هایی ساده، آسان و ارزان هستند، صورت می گیرد (۷). آزمایش های سرولوژیک متداول برای تشخیص بیماری بروسلوز شامل: رزبنگال، رایت سریع، آگلوتیناسیون استاندارد لوله ای (SAT)، کومبس-رایت، ۲-مرکاپتواتانول-رایت (ME-2-رایت)، فیکساسیون کمپلمان، ایمنوفلورسانس غیرمستقیم و روش الایزا هستند (۸، ۹). در این میان، آزمایش رزبنگال یک روش سریع و آسان است که معمولاً از آن برای غربالگری نمونه سرم ها و تعیین نمونه های مثبت، استفاده می شود. در سالیان اخیر، شکل دیگری از آن به نام آزمایش رزبنگال معمولی حساسیت بالاتری نشان می دهد (۱۰).

بررسی ها حاکی است، این روش که اولین بار در سال ۱۹۹۴ توسط بلاسکو و همکاران شرح داده شد، حساسیت بالاتری

نسبت به رزبنگال معمولی دارد (۱۱). از طرف دیگر، روش الایزا به عنوان یک آزمایش با حساسیت بالا شناخته می شود که در آن با سنجش جداگانه آنتی بادی های IgG و IgM ضد آنتی ژن های بروسلا، امکان شناسایی بروسلوز حاد از مزمن نیز وجود دارد. با این وجود کیفیت متنوع معرف های تجاری الایزا، مقایسه نتایج آن را کمی دشوار می سازد (۱۳، ۱۲).

در کنار آزمایش های سرولوژیک، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، به واسطه توانایی تشخیص مقادیر بسیار کم DNA در خون یا سرم، به عنوان ابزاری قدرتمند برای تشخیص بیماری بروسلوز محسوب می شود (۱۴، ۱۵). آزمایش PCR حساسیت و ویژگی بالایی دارد، به طوری که از کشت خون حساس تر بوده و نسبت به آزمایش های متداول سرولوژیک ویژگی بالاتری دارد (۱۶). به دلیل حساسیت و ویژگی بسیار بالای روش PCR، امروزه متخصصین زیادی پیشنهاد می کنند که به جای کشت خون، از این تکنیک، به دلیل زمان بری کمتر و بی خطر بودن برای کارکنان آزمایشگاه، به عنوان استاندارد طلایی استفاده شود (۱۶، ۱۵).

نظر به اینکه مطالعات اخیر حاکی از حساسیت بالای آزمایش رزبنگال اصلاح شده در تشخیص بیماری بروسلوز است، بعلاوه الایزا نیز به عنوان یک آزمایش با حساسیت و ویژگی بالا شناخته می شود و با توجه به اینکه تاکنون این دو روش در هیچ مطالعه ای مورد مقایسه قرار نگرفته اند، هدف از تحقیق حاضر مقایسه حساسیت و ویژگی این دو روش آزمایش در تشخیص بیماری بروسلوز، در حضور روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)، به عنوان استاندارد طلایی بود.

مواد و روش ها**نمونه گیری**

در یک مطالعه مقطعی که از فروردین ۱۳۹۴ شروع شده و تا پایان بهمن ۱۳۹۴ ادامه یافت، از بین بیماران مراجعه کننده به

بر روی نمونه خون واجد ضد انعقاد این افراد، آزمایش PCR، به عنوان آزمایش استاندارد طلایی، برای تشخیص وجود DNA باکتری‌های جنس بروسلا انجام شد.

آزمایش رزبنگال اصلاح شده (Modified Rose Bengal test): این آزمایش شکل تغییر یافته رزبنگال معمولی است که در آن بجای مجاور شدن یک حجم سرم بیمار با حجم معادل از آنتی ژن بروسلا، سه حجم سرم بیمار با یک حجم آنتی ژن بروسلا مجاور می‌شود. برای این منظور بر روی یک کاشی سفید، ۷۵ میکرولیتر از سرم بیمار با ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون آنتی ژن مجاور کرده و پس از مخلوط کردن، به مدت ۴ دقیقه حرکت دورانی داده شد. پس از مدت زمان فوق نمونه از نظر آگلوتیناسیون بررسی شد، چنانچه آگلوتیناسیون واضح مشاهده می‌شد، نتیجه آزمایش مثبت در نظر گرفته می‌شد، در غیر این صورت نتیجه منفی در نظر گرفته می‌شد. آزمایش رزبنگال اصلاح شده بلافاصله پس از جداسازی سرم‌ها، بر روی آنها انجام شد؛ اما برای انجام آزمایش الایزا نمونه سرم‌ها تا زمان انجام آزمایش الایزا در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از استخراج DNA نیز تا زمان انجام آزمایش PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آنتی-ژن رزبنگال مورد استفاده در این مطالعه از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

آزمایش الایزا (ELISA) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: جهت سنجش سطح آنتی‌بادی Igm و Igg ضد بروسلا در سرم بیماران به روش الایزای، از کیت الایزای شرکت IBL آلمان و دستگاه میکروپلیت ریدر مدل Stat Fax 4200 استفاده شد.

استخراج DNA (DNA extraction): در این مطالعه، برای استخراج DNA از نمونه خون بیماران، از کیت استخراج DNA (GeneAll، کره جنوبی) استفاده شد. همچنین DNA مورد نیاز جهت کنترل مثبت، از کلنی‌های

مطب پزشکی متخصص عفونی، واقع در مرکز شهر کرمانشاه، پس از معاینه، آن‌هایی که واجد حداقل دو مورد از علائم و نشانه‌های شواهد اپیدمیولوژیک مثبت، ارگانومگالی، آرتریت، آرترالژی و تب بودند، توسط پزشک مربوطه مشکوک به بروسلوز تشخیص داده شده و جهت انجام آزمایش‌های تشخیصی معرفی شدند. بر اساس مطالعات قبلی حجم نمونه ۱۶۰ نفر تعیین شد (۱۶، ۱۵) و در فاصله زمانی در نظر گرفته شده، ۱۶۲ (شامل ۹۷ زن و ۶۵ مرد) فرد مشکوک به بروسلوز وارد مطالعه شدند. از این ۱۶۲ نفر، ۲ نفر (۱/۲۳٪) در محدوده سنی ۱۰-۰ سال، ۱۴ نفر (۸/۶۴٪) در محدوده سنی ۲۰-۱۰ سال، ۳۶ نفر (۲۲/۲۲٪) در محدوده سنی ۳۰-۲۰ سال، ۴۲ نفر (۲۵/۹۳٪) در محدوده سنی ۴۰-۳۰ سال، ۳۳ نفر (۲۰/۳۷٪) در محدوده سنی ۵۰-۴۰ سال، ۱۶ نفر (۹/۸۸٪) در محدوده سنی ۶۰-۵۰ سال و ۵ نفر (۸/۶۴٪) در محدوده سنی ۷۰-۶۰ سال و ۵ نفر (۳/۰۹٪) در محدوده سنی ۸۰-۷۰ بودند. از هر یک از این افراد، پس از کسب رضایت، ۸ میلی‌لیتر خون گرفته شد، ۲ میلی‌لیتر آن برای انجام آزمایش PCR به لوله واجد ضد انعقاد (EDTA) منتقل شد و ۶ میلی‌لیتر جهت انجام آزمایش رزبنگال اصلاح شده و الایزا به لوله لخته منتقل شد. معیار خروج از مطالعه ابتلا به بیماری‌های التهابی و عفونی دیگر بود که به تشخیص پزشک متخصص عفونی از مطالعه کنار گذاشته شدند و تنها بیمارانی که بر اساس شواهد و علائم بالینی مشکوک به بیماری بروسلوز بودند وارد مطالعه شدند. بیماران فرم رضایت‌نامه را مطالعه و امضاء کردند و اطلاعات آن‌ها کاملاً محرمانه نگاه داشته شد و به هر بیمار یک کد داده شد.

روند انجام آزمایش بر روی نمونه سرم تمام بیماران مشکوک به بروسلوز، آزمایش رزبنگال اصلاح شده و آزمایش الایزا برای آنتی-بادی‌های Igm و Igg ضد بروسلا، با استفاده از کیت تشخیصی الایزای شرکت IBL آلمان، انجام شد. همچنین

باکتری بروسلا (تهیه شده از انستیتو پاستور)، استخراج گردید.

طراحی پرایمر:

جهت تشخیص مولکولی جنس بروسلا به روش PCR، از ژن BCSP31، که کد کننده یک پروتئین ۳۱ کیلودالتونی ایمونوژن در غشای خارج سلولی همه‌ی گونه‌های بروسلا است، استفاده شد. این ژن در تمامی گونه‌های بروسلا به جز بروسلا اویس حفاظت شده است. برای این منظور یک جفت پرایمر طراحی شد (جدول ۱). برای طراحی پرایمر از نرم افزار AlleleID 6.0 استفاده گردید. سپس با استفاده از برنامه BLAST اتصال پرایمرها به توالی مربوطه و سایر توالی‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سنتز پرایمرها به شرکت ماکروژن کره جنوبی سفارش داده شد.

واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) Polymerase Chain Reaction (PCR): DNA استخراج شده از نمونه خون تمامی افراد، هدف آزمایش PCR قرار گرفت. برای انجام واکنش PCR بر روی نمونه‌های DNA از مسترمیکس شرکت سیناکلون استفاده شد و واکنش با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio- RAD مدل C1000 Touch) انجام شد (جدول ۱). بعد از انجام واکنش PCR، محصول واکنش الکتروفورز شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده از آزمایش‌های مورد استفاده در این مطالعه، با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای تحلیل داده‌ها از روش های آمار توصیفی (میانگین، انحراف استاندارد، فراوانی و درصد) و استنباطی، از آزمون خی دو (X^2) استفاده شد. برای داده‌های کیفی، آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی دانت استفاده شد. برای مقایسه نتایج هر یک از آزمایش‌ها با آزمایش PCR از آزمون فریدمن استفاده شد. همچنین برای میزان همانندی بین آزمایش‌های مختلف از آزمون‌های همبستگی مانند آزمون پیرسون شد.

حساسیت و ویژگی و ارزش اخباری مثبت و منفی آزمایش‌های رزبنگال اصلاح شده و الایزا برای IgG و IgM در مقایسه با آزمایش PCR (استاندارد طلایی) سنجش شد. جهت تعیین حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی آزمایش‌ها، از فرمول‌های زیر استفاده شد:

تعداد موارد مثبت حقیقی + تعداد موارد منفی کاذب / تعداد موارد مثبت حقیقی = حساسیت

تعداد موارد منفی حقیقی + تعداد موارد مثبت کاذب / تعداد موارد منفی حقیقی = ویژگی

$100 \times (\text{تعداد موارد مثبت کاذب} + \text{تعداد موارد مثبت حقیقی} / \text{تعداد موارد مثبت حقیقی})$ = ارزش اخباری مثبت
(ارزش اخباری مثبت = بیانگر درصد بیماران، در افرادی است که نتیجه آزمایش آن‌ها مثبت بوده است.)

$100 \times (\text{تعداد موارد منفی حقیقی} + \text{تعداد موارد منفی کاذب} / \text{تعداد موارد منفی حقیقی})$ = ارزش اخباری منفی
(ارزش اخباری منفی = بیانگر درصد سالم‌ها، در افرادی است که نتیجه آزمایش آن‌ها منفی بوده است.)

یافته‌ها

نتایج این مطالعه نشان داد که زنان، به دلیل تماس بیشتر با حیوانات آلوده و تماس با شیر و سایر فرآورده‌های لبنی بیشتر در معرض ابتلا به این بیماری هستند، به همین دلیل در این مطالعه تعداد زنان بیمار بیش از مردان بود. همچنین بیشتر مبتلایان (۷۰/۳۷٪) در محدوده سنی ۵۱-۲۰ سال قرار داشتند؛ به عبارت دیگر بیشتر مبتلایان را جمعیت فعال جامعه تشکیل می‌دادند.

نتایج PCR: آزمایش PCR بر روی نمونه خون ۱۶۲ بیمار مشکوک به بروسلا انجام گردید. از این آزمایش به‌عنوان استاندارد طلایی استفاده شد. نتیجه آزمایش PCR در ۶۳ مورد (۳۹٪) مثبت و در ۹۹ مورد (۶۱٪) منفی شد. نتایج آزمایش رزبنگال اصلاح شده (MRB): با انجام این آزمایش، از ۱۶۲ نمونه سرم، ۸۹ مورد آن مثبت گردید، که

بودن فرد بیشتر است (جدول ۶). حساسیت و ویژگی این روش آزمایش به ترتیب: ۹۴٪ و ۷۱٪ و ارزش اخباری مثبت و منفی آن به ترتیب: ۶۷٪ و ۹۵٪ بود.

مقایسه نتایج آزمایش رزبنگال اصلاح شده (MRB) با الایزا IgM: مقایسه نتایج این دو نوع آزمایش در نمونه سرم افراد مشکوک به بروسلاز نشان داد که تعداد مواردی که هم نتیجه آزمایش MRB در آن‌ها مثبت شده و هم مقدار آنتی‌بادی IgM آن‌ها بیشتر از ۱۰ واحد بود، ۵۰ مورد بود که ۳۹ مورد آن‌ها PCR مثبت بودند. از طرف دیگر تعداد مواردی که نتیجه الایزای IgM در آن‌ها منفی شد؛ ولی آزمایش رزبنگال اصلاح شده آن‌ها مثبت گردید، ۳۹ مورد بود که ۲۰ مورد از آن‌ها PCR مثبت بودند. در مقابل، تعداد مواردی که سطح IgM آن‌ها بیشتر از ده واحد بوده؛ ولی نتیجه آزمایش رزبنگال اصلاح شده در آن‌ها منفی شده بود، ۷ مورد بود که تنها دو مورد از آن‌ها نمونه‌های PCR مثبت بودند (جدول ۷).

مقایسه نتایج آزمایش رزبنگال اصلاح شده (MRB) با الایزا IgG: مقایسه نتایج آزمایش رزبنگال اصلاح شده با الایزای IgG (با $\text{Cut-off} > 10$)، به صورت زیر بود: تعداد مواردی که هم نتیجه آزمایش MRB آن‌ها مثبت بود و هم سطح IgG آن‌ها بیشتر از ۱۰ واحد بود، ۷۶ مورد بود که ۵۷ مورد آن‌ها نمونه‌های PCR مثبت بودند. تعداد مواردی که نتیجه MRB آن‌ها مثبت بود؛ اما سطح IgG آن‌ها کمتر از ۱۰ واحد بود، ۱۳ مورد بود که تنها دو مورد از آن‌ها PCR مثبت بودند. به طور مشابه تعداد مواردی که مقدار آنتی‌بادی IgG آن‌ها بیشتر از ۱۰ واحد بود؛ ولی نتیجه آزمایش MRB آن‌ها منفی بود، ۱۲ مورد بود که دو مورد از آن‌ها PCR مثبت بودند (جدول ۸).

۵۹ مورد از ۶۳ مورد مثبت شده با روش PCR (گلد استاندارد) را پوشش می‌داد؛ بنابراین، در این آزمایش، ۳۰ مورد مثبت کاذب و ۴ مورد منفی کاذب وجود داشت (جدول ۲). حساسیت و ویژگی این آزمایش به شرح زیر بود: حساسیت = ۹۴٪، ویژگی = ۷۰٪، ارزش اخباری مثبت = ۶۶٪ و ارزش اخباری منفی آن = ۹۵٪ بود.

نتایج الایزا برای آنتی‌بادی IgM ضد بروسلا: نتیجه آزمایش الایزا برای آنتی‌بادی IgM ضد آنتی‌ژن بروسلا در ۵۷ نمونه از ۱۶۲ نمونه سرم، مثبت شد (سطح آنتی‌بادی در آن‌ها بیشتر از ۱۰ واحد بود) (جدول ۳). از این ۵۷ نمونه مثبت شده از نظر آنتی‌بادی IgM ضد آنتی‌ژن بروسلا، تنها ۴۱ مورد آن‌ها در روش PCR نیز نتیجه مثبت نشان دادند (جدول ۳). حساسیت و ویژگی این آزمایش به ترتیب: ۶۵٪ و ۸۴٪ بود و ارزش اخباری مثبت و منفی آن به ترتیب: ۷۲٪ و ۷۹٪ بود. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که اکثر نمونه‌هایی که نتیجه آزمایش PCR در آن‌ها مثبت گردید، دارای تیتراژ آنتی‌بادی IgM ضد بروسلا پایین، حتی تیتراژ صفر، بودند (جدول ۴).

نتایج الایزای آنتی‌بادی IgG ضد بروسلا: با انجام این آزمایش، از ۱۶۲ نمونه سرم، تعداد ۸۸ نمونه سرم دارای سطح آنتی‌بادی IgG بیشتر از ۱۰ واحد بودند، بنابراین مثبت در نظر گرفته شدند (جدول ۵). از این ۸۸ نمونه سرم مثبت، ۵۹ مورد آن‌ها در روش PCR نیز نتیجه مثبت نشان دادند؛ اما نتیجه آزمایش PCR در ۲۹ نمونه سرم منفی شد. از طرف دیگر از ۷۴ نمونه سرمی که سطح آنتی‌بادی IgG آن‌ها کمتر از ۱۰ واحد بود، نتیجه آزمایش PCR در ۴ نمونه سرم مثبت شد (منفی کاذب). همچنین نتایج نشان داد که هر چه تیتراژ آنتی‌بادی IgG بالاتر باشد، احتمال بیمار

جدول ۱. جدول زمان بندی دمایی واکنش PCR و توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش

دنا تورا سیون اولیه	دنا تورا سیون	اینلینگ	اکستنشن (گسترش)	تعداد سیکل	گسترش نهایی
۹۵	۹۵	۶۵	۷۲	۳۰	۷۲
۳ دقیقه	۳۰ ثانیه	۲۰ ثانیه	۳۰ ثانیه		۵ دقیقه
پرایمر	سکانس				طول (جفت باز)
فوروارد	5'-TCC GAT TGG TGG TCT GAT C-3'				۴۴۶ جفت باز
معکوس	5'-CAC CAT CTT TCA GCC TCT C-3'				

جدول ۲. حساسیت و ویژگی آزمایش رز بنگال اصلاح شده (MRB) در مقایسه با PCR

جمع	آزمایش رز بنگال اصلاح شده			PCR آزمایش
	مثبت	منفی	منفی	
۹۹	۳۰	۶۹	منفی	
۶۳	۵۹	۴	مثبت	
۱۶۲	۸۹	۷۳	جمع	

جدول ۳. حساسیت و ویژگی آزمایش الایزای IgM در مقایسه با PCR

جمع	آزمایش الایزای IgM			PCR آزمایش
	مثبت	منفی	منفی	
۹۹	۱۶	۸۳	منفی	
۶۳	۴۱	۲۲	مثبت	
۱۶۲	۵۷	۱۰۵	جمع	

جدول ۴. رابطه تیتراژ آنتی بادی در الایزای IgM با نتیجه آزمایش PCR

تیتراژ IgM	۰-۱۰	۱۰-۵۰	۵۰-۱۰۰	۱۰۰-۱۵۰	۱۵۰-۲۰۰	۲۰۰-۲۵۰
تعداد نمونه سرم	۱۰۵	۳۷	۱۴	۶		
تعداد PCR مثبت	۲۲	۲۳	۱۲	۶		

جدول ۵. حساسیت و ویژگی آزمایش الایزای IgG در مقایسه با PCR

	IgM > 10IU تیتراژ		جمع	آزمایش PCR	جدول ۶. آنتی بادی IgG با جمع
	مثبت	منفی			
ارتباط تیتراژ در الایزای نتیجه	۹۹	۷۰	۱۶۲	منفی	
	۶۳	۴	۶۷	مثبت	
	۱۶۲	۷۴	۲۳۶	جمع	

آزمایش PCR								
IgG تیتراژ	۰-۱۰	۱۰-۵۰	۵۰-۱۰۰	۱۰۰-۱۵۰	۱۵۰-۲۰۰	۲۰۰-۲۵۰	۲۵۰-۳۰۰	>۳۰۰
تعداد نمونه سرم	۷۴	۱۹	۱۳	۲۵	۱۸	۲	۲	۷
تعداد PCR مثبت	۴	۳	۱۱	۱۷	۱۸	۲	۲	۶

IgM در مقایسه با PCR (به عنوان استاندارد طلایی) حساسیت ۶۵٪ و ویژگی ۸۴٪ نشان داد. همان طور که جدول نشان می دهد اکثر نمونه هایی که نتیجه آزمایش PCR در آنها مثبت شده بود، نمونه سرم هایی با تیتراژ پایین و حتی تیتراژ صفر آنتی بادی IgM ضد بروسلا بودند. نتیجه بررسی نمونه سرم های افراد مشکوک به بروسلا با آزمایش الایزای برای IgG ضد آنتی ژن بروسلا، نشان داد که از ۶۳ نمونه مثبت شده با آزمایش PCR، ۵۹ نمونه آنها با آزمایش الایزای IgG نیز مثبت شدند؛ اما ۴ نمونه سرم منفی کاذب شد، بعلاوه ۲۹ نمونه سرم نیز مثبت کاذب شد. به این ترتیب آزمایش الایزای IgG در مقایسه با PCR (به عنوان استاندارد طلایی) حساسیت ۹۴٪ و ویژگی ۷۱٪ نشان داد. نتایج مطالعه نشان داد که ارتباط مستقیمی بین تیتراژ آنتی بادی IgG و مثبت شدن نتیجه آزمایش PCR وجود دارد، هر چقدر تیتراژ آنتی بادی IgG بالاتر باشد، احتمال مثبت شدن آزمایش PCR بیشتر است.

با بررسی نمونه سرم های افراد مشکوک به بروسلا با استفاده از آزمایش رزینگال اصلاح شده، از ۶۳ نمونه مثبت شده با آزمایش PCR، ۵۹ نمونه مثبت شد؛ اما ۴ نمونه سرم به صورت کاذب منفی شد، بعلاوه ۳۰ نمونه سرم نیز به صورت کاذب مثبت شد. به این ترتیب آزمایش MRB در مقایسه با PCR (به عنوان استاندارد طلایی) حساسیت ۹۴٪ و ویژگی ۷۰٪ نشان داد. بررسی نمونه سرم های افراد مشکوک به بروسلا با آزمایش الایزای برای IgM ضد آنتی ژن بروسلا، نشان داد که از ۶۳ نمونه مثبت شده با آزمایش PCR، ۴۱ نمونه سرم واجد تیتراژ آنتی بادی IgM ضد آنتی ژن های بروسلا بیشتر از ۱۰ واحد (مثبت) بود؛ اما در ۲۲ نمونه سرم تیتراژ آنتی بادی IgM ضد آنتی ژن بروسلا کمتر از ۱۰ واحد بود (منفی کاذب)، بعلاوه ۱۶ نمونه سرم نیز در حالیکه نتیجه آزمایش PCR آنها منفی بود، تیتراژ آنتی بادی IgM ضد آنتی ژن های بروسلا بیشتر از ۱۰ واحد نشان دادند (مثبت کاذب). به این ترتیب آزمایش الایزای

جدول ۷. مقایسه نتایج آزمایش رزبنگال اصلاح شده (MRB) با الایزای IgM ضد آنتی ژن بروسلا

جمع	IgM > 10IU تیتراژ		MRB آزمایش
	مثبت	منفی	
۷۳	۷	۶۶	منفی
۸۹	۵۰	۳۹	مثبت
۱۶۲	۵۷	۱۰۵	جمع

IgM در آنها

بررسی نمونه

منفی شد؛ ولی آزمایش رزبنگال اصلاح شده آنها مثبت گردید، ۳۹ مورد بود. همچنین تعداد مواردی که نتیجه آزمایش آلیزای IgM در آنها مثبت شد؛ ولی آزمایش رزبنگال اصلاح شده آنها منفی گردید، ۷ مورد بود.

سرم افراد مشکوک به بروسلاز با این دو نوع آزمایش نشان داد که ۵۰ نمونه سرم با هر دو آزمایش MRB و الایزای IgM مثبت شدند و نتیجه ۶۶ نمونه سرم با هر دو آزمایش منفی شد. از طرف دیگر تعداد مواردی که نتیجه الایزای

جدول ۸. مقایسه نتایج تست رزبنگال اصلاح شده (MRB) با الایزای IgG ضد آنتی ژن بروسلا

جمع	IgG ≥ 10IU تیتراژ		MRB آزمایش
	مثبت	منفی	
۷۳	۱۲	۶۱	منفی
۸۹	۷۶	۱۳	مثبت
۱۶۲	۸۸	۷۴	جمع

تشخیص بیماری بروسلاز بر خوردار است (۱۱). همچنین آزمایش الایزای نیز به عنوان یک آزمایش با حساسیت و ویژگی بالا شناخته می شود. از طرف دیگر، در مطالعات گذشته روش PCR، به دلیل ایمنی بالا، حساسیت و ویژگی زیاد نسبت به سایر روش های آزمایشگاهی در تشخیص بیماری بروسلاز (۱۹-۱۷) و با توجه به محدودیت ها و معایب روش کشت، به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شده است. در مطالعه حاضر نیز، آزمایش PCR به عنوان آزمایش استاندارد طلایی در نظر

مقایسه نتایج این دو نوع آزمایش در نمونه سرم افراد مشکوک به بروسلاز نشان داد که نتیجه ۷۶ نمونه سرم در هر دو آزمایش MRB و الایزای IgG مثبت شد و نتیجه ۶۱ نمونه سرم در هر دو آزمایش منفی شد. از طرف دیگر تعداد مواردی که نتیجه الایزای IgG در آنها منفی شد؛ ولی آزمایش رزبنگال اصلاح شده مثبت گردید، ۱۳ مورد بود و تعداد مواردی که نتیجه آزمایش الایزای IgG در آنها مثبت شد؛ ولی آزمایش رزبنگال اصلاح شده آنها منفی گردید، ۱۲ مورد بود. این نتایج حاکی از مشابه بودن نتیجه این دو روش آزمایش بود.

بحث

گرفته شد. نظر به اینکه تا کنون در هیچ مطالعه ای توانایی آزمایش رزبنگال اصلاح شده و آزمایش الایزای در تشخیص بیماری بروسلاز مورد مطالعه قرار نگرفته است، لذا هدف از مطالعه حاضر مقایسه حساسیت و ویژگی این دو آزمایش در تشخیص بیماری بروسلاز، در حضور آزمایش PCR، به عنوان آزمایش استاندارد طلایی، بود.

آزمایش رزبنگال اصلاح شده یک آزمایش اسلایدی ساده، ارزان و سریع است که بر اساس مطالعات قبلی، نسبت به سایر آزمایش های سروزوی از حساسیت بالاتری در

بالاتر باشد، احتمال ابتلا فرد به بیماری بروسلوز بیشتر است. از طرف دیگر، بررسی سطح آنتی بادی IgG ضد بروسلا در نمونه سرم بیماران مشکوک به بروسلوز نشان داد که چنانچه مرز مثبت شدن آزمایش الایزا برای آنتی بادی IgG ضد بروسلا را، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (IBL، آلمان)، ۱۰ واحد در نظر بگیریم، حساسیت و ویژگی این آزمایش به ترتیب ۹۴٪ و ۷۱٪ و ارزش اخباری منفی آن نیز ۹۵٪ خواهد بود که مشابه با حساسیت و ویژگی و ارزش اخباری منفی آزمایش رزبنگال اصلاح شده، است. در موافقت با این نتایج، فریرا (Ferreira) و همکاران نیز در مطالعه خود به نتیجه مشابهی دست یافتند (۲۰). Gomez و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که حساسیت روش الایزا در تشخیص بروسلوز انسانی بیشتر از آزمایش‌های رزبنگال و رایت لوله‌ای نیست (۹). در مطالعه Ciftçi و همکاران (۲۰۰۵) در کشور ترکیه نیز حساسیت الایزا برای IgG، ۹۴/۳ درصد و برای IgM، ۷۱/۴ درصد گزارش شده است (۲۲)، که مشابه با نتایج مطالعه ما است. همچنین مطالعه‌ی Fadeel و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که آزمایش الایزا برای IgG حساس‌تر از آزمایش الایزا برای آنتی بادی IgM است (۲۳). با این وجود در مطالعه Araj و همکاران (۲۰۰۵) حساسیت الایزا IgM بالاتر از الایزا IgG گزارش شده است (۲۴). متفاوت بودن نتیجه مطالعه Araj می‌تواند به این دلیل باشد که بیماران شرکت کننده در مطالعه ایشان در مرحله حاد بیماری بروسلوز بوده‌اند. بررسی سطح IgG در سرم بیماران نشان داد که همانند آزمایش آگلوتیناسیون استاندارد (SAT)، بین سطح آنتی-بادی سرم و احتمال بیمار بودن فرد رابطه‌ی مستقیم وجود دارد. هرچه سطح آنتی بادی IgG بالاتر باشد، با قطعیت بیشتری می‌توان بر بیمار بودن فرد صحه گذاشت، هر چند گاهی ممکن است فردی با سطح آنتی بادی بالا نیز بیمار نباشد. در این مطالعه نتیجه آزمایش الایزای IgG با نتیجه آزمایش رزبنگال اصلاح شده تا ۹۷٪ تطابق داشت. این امر حاکی از تطابق بالای این دو آزمایش است. در واقع می

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حساسیت و ویژگی آزمایش رزبنگال اصلاح شده، در حضور آزمایش PCR به عنوان آزمایش استاندارد طلایی، به ترتیب ۹۴٪ و ۷۰٪ بود و ارزش اخباری منفی آن نیز ۹۵٪ بود. در مطالعه‌ای که توسط گرگین و همکاران (۱۳۹۰) انجام شد، نشان داده شده است که آزمایش رزبنگال اصلاح شده حساسیت بسیار بیشتری نسبت به رزبنگال معمولی و رایت سریع در تشخیص نمونه‌های مثبت از نظر آنتی بادی ضد بروسلا دارد (۱۰). همچنین محققى بنام فریرا در مطالعه‌ای تأیید کرده که آزمایش رزبنگال اصلاح شده می‌تواند جایگزین سودمندی برای آزمایش رزبنگال معمولی به عنوان آزمایش غربالگر باشد (۲۰). در این مطالعه نتیجه آزمایش رزبنگال اصلاح شده در ۴ مورد از نمونه‌هایی که آزمایش PCR آن‌ها مثبت شده بودند، منفی گردید. نتیجه منفی کاذب در آزمایش رزبنگال اصلاح شده می‌تواند ناشی از پایین بودن سطح آنتی بادی در شروع بیماری بروسلوز، یا ناشی از وجود زیر کلاس‌های با خاصیت آگلوتیناسیون پایین، یا ناشی از تیترا بالای آنتی بادی (پدیده پروزون) و یا اینکه به دلیل بیماری‌هایی با عوارض هیپوایمنوگلوبولینمی باشد (۱۳). از طرف دیگر، در ۳۰ مورد از نمونه‌هایی که نتیجه آزمایش رزبنگال اصلاح شده آن‌ها مثبت شده بود، نتیجه آزمایش PCR منفی گردید؛ به عبارت دیگر آزمایش رزبنگال اصلاح شده در آن‌ها به صورت کاذب مثبت شده بود. نتایج مثبت کاذب در آزمایش رزبنگال اصلاح شده می‌تواند ناشی از واکنش متقاطع با عوامل عفونی دیگر مانند باکتری-های گرم منفی باشد. بعلاوه بیماری‌های غیر عفونی مانند لنفوم، لوپوس اریترماتوز سیستمیک و یا مولتیپل میلوما می‌توانند سبب واکنش‌های متقاطع و موارد مثبت کاذب شوند (۲۱، ۱۳). نتیجه بررسی سطح آنتی بادی IgM ضد بروسلا در نمونه سرم بیماران مشکوک به بروسلوز نشان داد که حساسیت و ویژگی آزمایش الایزا برای آنتی بادی IgM ضد آنتی ژن‌های بروسلا به ترتیب ۶۵٪ و ۸۴٪ است. بعلاوه بر اساس نتایج این مطالعه هر چه سطح آنتی بادی IgM

اینکه کیت های سنجش آنتی بادی های ضد بروسلا اکثراً خارجی بوده و متناسب با وضعیت بیماری بروسلوز در کشور یا کشورهای تهیه و استانداردسازی شده اند که متفاوت از شرایط بیماری بروسلوز در کشور ما است، لذا نمی توان Cut-off تعیین شده در این کیت ها را ملاک تشخیصی قرار داد. لذا نیاز است Cut-off آزمایش الایزا برای IgG و IgM ضد آنتی ژن های بروسلا متناسب با شرایط کشور ما تعیین و استانداردسازی شود.

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که آزمایش رزبنگال اصلاح شده، یک آزمایش ساده، ارزان و سریع است که دارای حساسیت و ویژگی مشابه با آزمایش الایزا IgG در تشخیص بیماری بروسلوز است. با توجه به اینکه آزمایش الایزا IgG، یک آزمایش گران قیمت، پیچیده و با زمان ببری بیشتر بوده و نیازمند مواد و دستگاه های گران قیمت است، لذا با انجام آزمایش رزبنگال اصلاح شده می توان نیاز به آزمایش الایزا را مرتفع ساخت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه بواسطه تامین هزینه انجام این طرح پژوهشی اعلام می دارند. این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد آقای بهروز هلشی است که در قالب یک طرح تحقیقاتی با کد رهگیری ۹۴۰۶۷ و با کد اخلاق: (KUMS.REC.1394.518) ثبت شده است. بودجه این طرح توسط معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تامین گردید.

توان گفت که مزیت الایزا IgG نسبت به رزبنگال اصلاح شده، تعیین هم زمان نمونه های مثبت و سطح آنتی-بادی IgG در این نمونه ها است. در حالی که در آزمایش رزبنگال اصلاح شده، تنها می توان نمونه های مثبت و تا حدی شدت مثبت شدن آن ها را مشخص ساخت؛ اما برای تعیین تیتراژ آنتی بادی نیاز به آزمایش های تکمیلی مانند آزمایش SAT است؛ بنابراین، بر اساس نتایج این مطالعه، می توان آزمایش رزبنگال اصلاح شده که یک آزمایش ساده و ارزان است را جایگزین آزمایش الایزا برای IgG که یک آزمایش پرهزینه و نیازمند مواد و کیت های آزمایشگاهی و دستگاه های گران قیمت است، کرد. با این وجود، در این مطالعه نتیجه آزمایش رزبنگال اصلاح شده در دو نمونه سرمی که نتیجه آزمایش الایزا IgG آن ها مثبت شده و سطح آنتی بادی بالایی نشان دادند، منفی گردید. این امر می تواند ناشی از وجود آنتی بادی های غیر آگلوتینان در این نمونه سرم ها باشد. چرا که این دسته از آنتی بادی ها در حالی که با آزمایش رزبنگال اصلاح شده قابل تشخیص نیستند، با آزمایش الایزا به خوبی تشخیص داده می شوند و این یکی از امتیازهای آزمایش الایزا نسبت به آزمایش های مبتنی بر آگلوتیناسیون محسوب می شود.

نظر به اینکه بیماری بروسلوز در کشور ما اندمیک است، لذا همواره سطح پایینی از آنتی بادی در سرم برخی افراد وجود دارد. برای حذف یا کاهش موارد مثبت کاذب در آزمایش الایزا IgG، بایستی Cut-off بالاتری را به عنوان معیار مثبت بودن در نظر گرفت؛ بنابراین چنانچه در این مطالعه، مرز مثبت شدن آزمایش الایزا برای IgG ضد بروسلا را بیشتر یا معادل ۳۰ واحد در نظر بگیریم، در حالی که حساسیت آزمایش بدون تغییر می ماند (۹۴٪)، ویژگی آزمایش افزایش یافته و به سطح ۸۰٪ می رسد. با توجه به

منابع

1. Cutler S, Whatmore A. Progress in understanding brucellosis. Vet Rec. 2003; 153(21):641-2.
2. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. Vet Microbiol. 2010; 140(3-4):392-8.

3. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. *N Engl J Med*. 2005; 352(22):2325-36.
4. Young EJ. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis*. 1995; 21(2):283-9.
5. Irmak H, Buzgan T, Evirgen O, Akdeniz H, Demiroz AP, Abdoel TH, et al. Use of the Brucella IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70(6):688-94.
6. Mangalgi S, Sajjan A. Comparison of three blood culture techniques in the diagnosis of human brucellosis. *J Lab Physicians*. 2014; 6(1):14-7.
7. 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. *J Infect Dev Ctries*. 2011; 5(11):786-91.
8. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36 Suppl 1: S12-7.
9. Gomez MC, Nieto JA, Rosa C, Geijo P, Escribano MA, Munoz A, et al. Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15(6):1031-3.
10. Gorgin Karaji A, Abdi F, Rezaei M. The agreement rate of rose Bengal, modified rose Bengal and rapid Wright tests for detection of positive serum sample of Brucellosis. *Behbood Journal*. 2011; 15(1):31-9.
11. Blasco JM, Garin-Bastuji B, Marin CM, Gerbier G, Fanlo J, Jimenez de Bagues MP, et al. Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep and goats. *Vet Rec*. 1994; 134(16):415-20.
12. Emmerzaal A, de Wit JJ, Dijkstra T, Bakker D, van Zijderveld FG. The Dutch Brucella abortus monitoring programme for cattle: the impact of false-positive serological reactions and comparison of serological tests. *Vet Q*. 2002; 24(1):40-6.
13. Shirzadi MR, Zinali M, Rezaei F. Guide to Diagnosis and Treatment of Brucellosis (Malta fever). In: Office for the Prevention of Human - Animal Communicable Diseases, Deputy of Health, Ministry of Health and Medical Education, 2014:1-116.
14. Imaoka K, Kimura M, Suzuki M, Kamiyama T, Yamada A. Simultaneous detection of the genus Brucella by combinatorial PCR. *Jpn J Infect Dis*. 2007; 60(2-3):137-9.
15. Hekmatimoghaddam S, Sadeh M, Khalili MB, Mollaabedin M, Sazmand A. Comparison of PCR, Wright agglutination test and blood culture for diagnosis of brucellosis in suspected patients. *Pak J Biol Sci*. 2013; 16(22):1589-92.
16. 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.
17. Al-Attas RA, Al-Khalifa M, Al-Qurashi AR, Badawy 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.
18. Elfaki MG, Al-Hokail AA, Nakeeb SM, Al-Rabiah FA. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of brucellosis in humans. *Med Sci Monit*. 2005; 11(11):69-74.
19. El Kholly AA, Gomaa HE, El Anany MG, Abd El Rasheed E. Diagnosis of human brucellosis in Egypt by polymerase chain reaction. *East Mediterr Health J*. 2009; 15(5):1068-74.
20. Ferreira AC, Cardoso R, Travassos Dias I, Mariano I, Belo A, Rolao Preto I, et al. Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep. *Vet Res*. 2003; 34(3):297-305.

21. E. BJ, J. BM, Raphael D. Principles and Practice of infectious Diseases. Brucella Species. 6th ed ed. New Yourk: Churchill Living Stome; 2005.
22. Ciftci C, Ozturk F, Oztekin A, Karaoglan H, Saba R, Gultekin M, et al. Comparison of the serological tests used for the laboratory diagnosis of brucellosis. Mikrobiyol Bul. 2005; 39(3):291-9.
23. Fadeel MA, Hoffmaster AR, Shi J, Pimentel G, Stoddard RA. Comparison of four commercial IgM and IgG ELISA kits for diagnosing brucellosis. J Med Microbiol. 2011; 60(12):1767-73.
24. Araj GF, Kattar MM, Fattouh LG, Bajakian KO, Kobeissi SA. Evaluation of the PANBIO Brucella immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of human brucellosis. Clin Diagn Lab Immunol. 2005; 12(11):1334-5.