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

Behrooz Halashi[1], Hanieh Tarokhian[2], Babak Sayad[3], Farhad Salari[2], Ali Gorgin Karaji[4]

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 coagualation. 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

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و پنجم / مرداد و شهریور ۱۳۹۹/۱۳-۱

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

بهروز هلشی[۱]، هانیه تارخیان[۲]، بابک صیاد[۳]، فرهاد سالاری[۲]، علی گرگین کرجی[۴]

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

۲. استادیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. کد ارکید تارخیان: ۶۳۵۲-۸۹۲۰-۰۰۰۱-۰۰۰۰

کد ارکید سالاری: ۰۳۵۴-۳۲۱۱-۰۰۰۳-۰۰۰۰

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

۴. دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۸۳-۳۴۲۷۴۶۱۸، پست الکترونیک: a_gorginkaraji@kums.ac.ir، کد ارکید: ۵۷۲۲-۴۵۳۷-۰۰۰۳-۰۰۰۰

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

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

مقدمه

بیماری بروسلوز که به‌عنوان «تب مواج»، «تب مدیترانه ای» یا «تب مالت» نیز شناخته می‌شود، توسط باکتری‌های جنس بروسلا ایجاد می‌شود(۱). این بیماری، در انسان، در اثر تماس مستقیم یا غیرمستقیم با حیوانات آلوده یا محصولات آن‌ها و یا مصرف لبنیات غیرپاستوریزه ایجاد می‌شود(۳, ۲). بیماری تب مالت گرچه در کشورهای پیش رفته صنعتی ریشه کن شده‌است؛ اما در خاورمیانه (از جمله ایران)، هند، مکزیک، آمریکای مرکزی و جنوبی شایع بوده و از مشکلات مهم بهداشتی در این کشورها بشمار می‌رود(۴).

تشخیص بیماری تب مالت عمدتاً بر اساس علائم بالینی بیماری، اپیدمیولوژی و نتایج روش‌های آزمایشگاهی مانند کشت خون، آزمایش‌های سرولوژیک و روش‌های مولکولی صورت می‌گیرد(۵). گرچه کشت خون، دقیق‌ترین و معتبرترین روش تشخیص بیماری محسوب می‌شود؛ اما در عمل خیلی کم مثبت می‌شود، بعلاوه خطر انتقال بیماری به کارکنان آزمایشگاه را نیز در بر دارد(۶)؛ بنابراین، تشخیص آزمایشگاهی تب مالت عمدتاً با استفاده از آزمایش‌های سرولوژیک که روش‌هایی ساده، آسان و ارزان هستند، صورت می‌گیرد(۷). آزمایش‌های سرولوژیک متداول برای تشخیص بیماری بروسلوز شامل: رزبنگال، رایت سریع، آگلوتیناسیون استاندارد لوله‌ای (SAT)، کومبس-رایت، ۲- مرکاپتواتانول-رایت (2- ME - رایت)، فیکساسیون کمپلمان، ایمنوفلورسانس غیرمستقیم و روش الایزا هستند(۹, ۸). در این میان، آزمایش رزبنگال یک روش سریع و آسان است که معمولاً از آن برای غربال‌گری نمونه سرم‌ها و تعیین نمونه‌های مثبت، استفاده می‌شود. در سالیان اخیر، شکل دیگری از آن به نام آزمایش رزبنگال اصلاح شده معرفی شده که ادعا می‌شود نسبت به رزبنگال معمولی حساسیت بالاتری نشان می‌دهد(۱۰). بررسی‌ها 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 می‌شود که در آن با سنجش جداگانه آنتی‌بادی‌های IgM و IgG ضد آنتی‌ژن‌های بروسلا، امکان شناسایی بروسلوز حاد از مزمن نیز وجود دارد. با این وجود کیفیت متنوع معرف‌های تجاری الایزا، مقایسه نتایج آن را کمی دشوار می‌سازد(۱۳, ۱۲).

در کنار آزمایش‌های سرولوژیک، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، به‌واسطه توانایی تشخیص مقادیر بسیار کم DNA در خون یا سرم، به‌عنوان ابزاری قدرتمند برای تشخیص بیماری بروسلوز محسوب می‌شود(۱۵, ۱۴). آزمایش PCR حساسیت و ویژگی بالایی دارد، به طوری که از کشت خون حساس‌تر بوده و نسبت به آزمایش‌های 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 زمان‌بری کمتر و بی‌خطر بودن برای کارکنان آزمایشگاه، به‌عنوان 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 به‌عنوان یک آزمایش با حساسیت و ویژگی بالا شناخته می‌شود و با توجه به اینکه تاکنون این دو روش در هیچ مطالعه‌ای مورد مقایسه قرار نگرفته‌اند، هدف از تحقیق حاضر مقایسه حساسیت و ویژگی این دو روش آزمایش در تشخیص بیماری بروسلوز، در حضور روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)، به‌عنوان استاندارد طلایی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

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

مطب پزشک 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، ۱۴ 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 اصلاح‌شده 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 IgG و IgM ضد بروسلا، با استفاده از کیت تشخیصی الایزای شرکت IBL آلمان، انجام شد. همچنین بر روی نمونه خون واجد ضد انعقاد این افراد، آزمایش PCR، به‌عنوان 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 آنتی‌ژن بروسلا، سه حجم سرم بیمار با یک حجم آنتی‌ژن بروسلا مجاور می‌شود. برای این منظور بر روی یک کاشی سفید، ۷۵ میکرولیتر از سرم بیمار با ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسون آنتی‌ژن 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

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 شده‌است. 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 (Polymerase (PCR) Chain Reaction): 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 آزمایش-های رزبنگال اصلاح شده و الایزا برای IgM و IgG 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

۱۰۰ × (تعداد موارد مثبت کاذب + تعداد موارد مثبت حقیقی/ تعداد موارد مثبت حقیقی) = ارزش اخباری مثبت

(ارزش اخباری مثبت = بیانگر درصد بیماران، در افرادی است که نتیجه آزمایش آن‌ها مثبت بوده‌است.)

۱۰۰ × (تعداد موارد منفی حقیقی + تعداد موارد منفی کاذب / تعداد موارد منفی حقیقی) = ارزش اخباری منفی

(ارزش اخباری منفی = بیانگر درصد سالم ها، در افرادی است که نتیجه آزمایش آن‌ها منفی بوده‌است.)

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 بروسلوز 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

۵۹ مـورد از ۶۳ مـورد مثبـت شـده بـا روش PCR (گلـد استاندارد) را پوشش می‌داد؛ بنـابراین، در ایـن آزمـایش، ۳۰ مـورد مثبـت کـاذب و ۴ مـورد منفـی کـاذب وجـود داشـت (جدول ۲). حساسیت و ویژگی ایـن آزمـایش بـه شـرح زیـر بود: حساسیت = ۹۴٪، ویژگی= ۷۰٪، ارزش اخباری مثبت = ۶۶٪ و ارزش اخباری منفی آن = ۹۵٪ بود.

نتـایج الایـزا بـرای آنتـی‌بـادی IgM ضـد بروسـلا: نتیجـه آزمایش الایزا برای آنتی‌بادی IgM ضد آنتی‌ژن بروسلا در ۵۷ نمونه از ۱۶۲ نمونه سرم، مثبت شد (سطح آنتـی‌بـادی در آن‌ها بیشـتر از ۱۰ واحـد بـود) (جـدول ۳). از ایـن ۵۷ نمونـه مثبت شده از نظر آنتی‌بادی IgM ضد آنتی‌ژن بروسلا، تنهـا ۴۱ مورد آن ها در روش PCR نیز نتیجه مثبـت نشـان دادنـد (جدول ۳). حساسیت و ویژگی این آزمایش به ترتیـب: ۶۵٪ و ۸۴٪ بود و ارزش اخباری مثبت و منفی آن بـه‌ترتیـب: ۷۲٪ و ۷۹٪ بـود. همچنـین نتـایج ایـن مطالعـه نشـان داد کـه اکثـر نمونه‌هایی که نتیجه آزمایش PCR در آن‌ها مثبت گردیـد، دارای تیتر آنتـی‌بـادی IgM ضـد بروسـلا پـایین، حتـی تیتـر صفر، بودند (جدول ۴).

نتایج الایـزای آنتـی‌بـادی IgG ضـد بروسـلا: بـا انجـام ایـن آزمـایش، از ۱۶۲ نمونـه سـرم، تعـداد ۸۸ نمونـه سـرم دارای سطح آنتی‌بادی IgG بیشتر از ۱۰ واحد بودند، بنابراین مثبت در نظر گرفته شدند (جدول ۵). از این ۸۸ نمونه سـرم مثبـت، ۵۹ مورد آن‌ها در روش PCR نیز نتیجه مثبت نشـان دادنـد؛ امـا نتیجـه آزمـایش PCR در ۲۹ نمونـه سـرم منفـی شـد. از طرف دیگر از ۷۴ نمونه سـرمی کـه سـطح آنتـی بـادی IgG آن‌هـا کمتـر از ۱۰ واحـد بـود، نتیجـه آزمـایش PCR در ۴ نمونه سرم مثبت شد (منفی کاذب). همچنین نتایج نشـان داد که هر چه تیتر آنتـی‌بـادی IgG بـالاتر باشـد، احتمـال بیمـار بودن فرد بیشتر اسـت (جـدول ۶). حساسـیت و ویژگـی ایـن روش آزمایش به‌ترتیب: ۹۴٪ و ۷۱٪ و ارزش اخبـاری مثبـت و منفی آن به‌ترتیب: ۶۷٪ و ۹۵٪ بود.

مقایسه نتـایج آزمـایش رزبنگـال اصـلاح شـده (MRB) بـا الایزا IgM: مقایسه نتایج این دو نوع آزمایش در نمونه سرم افراد مشکوک به بروسلوز نشان داد کـه تعـداد مـواردی کـه هم نتیجه آزمایش MRB در آن ها مثبت شده و هـم مقـدار آنتی‌بادی IgM آن‌ها بیشتر از ۱۰ واحد بـود، ۵۰ مـورد بـود که ۳۹ مورد آن‌ها PCR مثبت بودند. از طرف دیگـر تعـداد مواردی که نتیجه الایـزای IgM در آن‌هـا منفـی شـد؛ ولـی آزمایش رزبنگال اصلاح شده آن‌ها مثبت گردید، ۳۹ مـورد بـود کـه ۲۰ مـورد از آن‌هـا PCR مثبـت بودنـد. در مقابـل، تعداد مواردی که سطح IgM آن‌ها بیشتر از ده واحد بـوده؛ ولی نتیجه آزمایش رزبنگال اصلاح شده در آن ها منفی شده بود، ۷ مورد بود که تنها دو مورد از آن‌ها نمونـه‌هـای PCR مثبت بودند (جدول ۷).

مقایسه نتـایج آزمـایش رزبنگـال اصـلاح شـده (MRB) بـا الایزا IgG: مقایسه نتایج آزمایش رزبنگـال اصـلاح شـده بـا الایـزای IgG (بـا Cut-off > 10)، بـه صـورت زیـر بـود: تعداد مواردی که هـم نتیجـه آزمـایش MRB آن‌هـا مثبـت بود و هم سطح IgG آن‌ها بیشتر از ۱۰ واحد بـود، ۷۶ مـورد بود که ۵۷ مورد آن‌ها نمونه‌های PCR مثبـت بودنـد. تعـداد مواردی که نتیجه MRB آن‌ها مثبـت بـود؛ امـا سـطح IgG آن ها کمتر از ۱۰ واحد بود، ۱۳ مورد بود کـه تنهـا دو مـورد از آن‌ها PCR مثبت بودند. به‌طور مشابه تعداد مـواردی کـه مقدار آنتی بـادی IgG آن‌هـا بیشـتر از ۱۰ واحـد بـود؛ ولـی نتیجه آزمایش MRB آن‌ها منفی بود، ۱۲ مورد بـود کـه دو مورد از آن‌ها PCR مثبت بودند (جدول ۸).

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

	دناتوراسیون اولیه	دناتوراسیون	انیلینگ	اکستنشن (گسترش)	تعداد سیکل	گسترش نهایی
دما (درجه سانتی گراد)	۹۵	۹۵	۶۵	۷۲	۳۰	۷۲
زمان	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) درمقایسه با PCR

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

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

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

جدول ۴. رابطه تیتر آنتی‌بادی در الایزای IgM با نتیجه آزمایش PCR

تیتر 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

جدول ۶. آنتی‌بادی IgG با	آزمایش PCR	IgM تیتر > 10IU		جمع	ارتباط تیتر در الایزای نتیجه
		منفی	مثبت		
	منفی	۷۰	۲۹	۹۹	
	مثبت	۴	۵۹	۶۳	
	جمع	۷۴	۸۸	۱۶۲	

آزمایش PCR

تیتر IgG	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

با بررسی نمونه سرم‌های افراد مشکوک به بروسلوز با استفاده از آزمایش رزبنگال اصلاح شده، از ۶۳ نمونه مثبت شده با آزمایش PCR، ۵۹ نمونه مثبت شد؛ اما ۴ نمونه سرم به‌صورت کاذب منفی شد، بعلاوه ۳۰ نمونه سرم نیز به صورت کاذب مثبت شد. به این ترتیب آزمایش MRB در مقایسه با PCR (به‌عنوان استاندارد طلایی) حساسیت ۹۴٪ و ویژگی ۷۰٪ نشان داد. بررسی نمونه سرم‌های افراد مشکوک به بروسلوز با آزمایش الایزا برای IgM ضد آنتی‌ژن بروسلا، نشان داد که از ۶۳ نمونه مثبت شده با آزمایش PCR، ۴۱ نمونه سرم واجد تیتر آنتی‌بادی IgM ضد آنتی ژن‌های بروسلا بیشتر از ۱۰ واحد (مثبت) بود؛ اما در ۲۲ نمونه سرم تیتر آنتی‌بادی IgM ضد آنتی‌ژن بروسلا کمتر از ۱۰ واحد بود (منفی کاذب)، بعلاوه ۱۶ نمونه سرم نیز در حالیکه نتیجه آزمایش PCR آن‌ها منفی بود، تیتر آنتی‌بادی IgM ضد آنتی‌ژن‌های بروسلا بیشتر از ۱۰ واحد نشان دادند (مثبت کاذب). به این ترتیب آزمایش الایزای IgM در مقایسه با PCR (به‌عنوان استاندارد طلایی) حساسیت ۶۵٪ و ویژگی ۸۴٪ نشان داد.همان‌طور که جدول نشان می‌دهد اکثر نمونه‌هایی که نتیجه آزمایش PCR در آن‌ها مثبت شده بود، نمونه سرم‌هایی با تیتر پایین و حتی تیتر صفر آنتی‌بادی IgM ضد بروسلا بودند. نتیجه بررسی نمونه سرم‌های افراد مشکوک به بروسلوز با آزمایش الایزا برای IgG ضد آنتی‌ژن 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 (به‌عنوان استاندارد طلایی) حساسیت ۹۴٪ و ویژگی ۷۱٪ نشان داد. نتایج مطالعه نشان داد که ارتباط مستقیمی بین تیتر آنتی‌بادی IgG و مثبت شدن نتیجه آزمایش PCR وجود دارد، هر چقدر تیتر آنتی‌بادی IgG بالاتر باشد، احتمال مثبت شدن آزمایش PCR بیشتر است.

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

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

بررسی نمونه سرم افراد مشکوک به بروسلوز 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 IgM در آن‌ها منفی شد؛ ولی آزمایش رزبنگال اصلاح شده آن‌ها مثبت گردید، ۳۹ مورد بود. همچنین تعداد مواردی که نتیجه آزمایش آلایزای IgM در آن‌ها مثبت شد؛ولی آزمایش رزبنگال اصلاح شده آن‌ها منفی گردید، ۷ مورد بود.

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

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

مقایسه نتایج این دو نوع آزمایش در نمونه سرم افراد مشکوک به بروسلوز 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

آزمایش رزبنگال اصلاح شده یک آزمایش اسلایدی ساده، ارزان و سریع است که بر اساس مطالعات قبلی، نسبت به سایر آزمایش‌های سرولوژی از حساسیت بالاتری در تشخیص بیماری بروسلوز برخوردار است(۱۱). همچنین آزمایش الایزا نیز به‌عنوان یک آزمایش با حساسیت و ویژگی بالا شناخته می‌شود. 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 بروسلوز(۱۹-۱۷) و با توجه به محدودیت‌ها و معایب روش کشت، به‌عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شده است. در مطالعه حاضر نیز، آزمایش PCR به‌عنوان آزمایش استاندارد طلایی در نظر گرفته شد. نظر به اینکه تاکنون در هیچ مطالعه‌ای توانایی آزمایش رزبنگال اصلاح شده و آزمایش الایزا در تشخیص بیماری بروسلوزمورد مطالعه قرار نگرفته است، لذا هدف از مطالعه حاضر مقایسه حساسیت و ویژگی این دو آزمایش در تشخیص بیماری بروسلوز، در حضور آزمایش PCR، به‌عنوان آزمایش استاندارد طلایی، بود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حساسیت و ویژگی آزمایش رزبنگال اصلاح شده، در حضور آزمایش PCR به‌عنوان 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 آنتی‌بادی ضد بروسلا دارد(۱۰). همچنین محققی بنام فریرا در مطالعه‌ای تائید کرده که آزمایش رزبنگال اصلاح شده می‌تواند جایگزین سودمندی برای آزمایش رزبنگال معمولی به‌عنوان 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 آنتی‌بادی در شروع بیماری بروسلوز، یا ناشی از وجود زیر کلاس‌های با خاصیت آگلوتیناسیون پایین، یا ناشی از تیتر بالای آنتی‌بادی (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 به‌صورت کاذب مثبت شده بود. نتایج مثبت کاذب در آزمایش رزبنگال اصلاح شده می‌تواند ناشی از واکنش متقاطع با عوامل عفونی دیگر مانند باکتری‌های گرم منفی باشد. بعلاوه بیماری‌های غیرعفونی مانند لنفوم، لوپوس اریتروماتوز سیستمیک و یا مولتیپل میولوما می‌توانند سبب واکنش‌های متقاطع و موارد مثبت کاذب شوند(۲۱، ۱۳). نتیجه بررسی سطح آنتی‌بادی IgM ضد بروسلا در نمونه سرم بیماران مشکوک به بروسلوز نشان داد که حساسیت و ویژگی آزمایش الایزا برای آنتی‌بادی IgM ضد آنتی‌ژن‌های بروسلا به ترتیب ۶۵٪ و ۸۴٪ است. بعلاوه بر اساس نتایج این مطالعه هر چه سطح آنتی بادی IgM 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 آنتی‌بادی 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 شده‌است(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 آنتی‌بادی 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 آنتی‌بادی سرم و احتمال بیمار بودن فرد رابطه‌ی مستقیم وجود دارد. هرچه سطح آنتی‌بادی IgG بالاتر باشد، با قطعیت بیشتری می توان بر بیمار بودن فرد صحه گذاشت، هر چند گاهی ممکن است فردی با سطح آنتی‌بادی 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

تـوان گفـت کـه مزیـت الایـزای IgG نسـبت بـه رزبنگـال اصلاح شده، تعیین هم‌زمان نمونه‌های مثبت و سـطح آنتـی-بادی IgG در این نمونه‌ها است. در حـالی کـه در آزمـایش رزبنگال اصلاح شده، تنهـا مـی‌تـوان نمونـه‌هـای مثبـت و تـا حدی شدت مثبت شدن آن ها را مشخص ساخت؛ امـا بـرای تعیین تیتـر آنتـی‌بـادی نیـاز بـه آزمـایش‌هـای تکمیلـی ماننـد آزمایش SAT است؛ بنابراین، بر اساس نتـایج ایـن مطالعـه، می‌توان آزمایش رزبنگال اصـلاح شـده کـه یـک آزمـایش ساده و ارزان است را جایگزین آزمـایش الایـزا بـرای IgG کـه یـک آزمـایش پرهزینـه و نیازمنـد مـواد و کیـت‌هـای آزمایشگاهی و دستگاه‌های گران‌قیمت اسـت، کـرد. بـا ایـن وجود، در این مطالعه نتیجه آزمایش رزبنگـال اصـلاح شـده در دو نمونـه سـرمی کـه نتیجـه آزمـایش الایـزا IgG آن‌هـا مثبـت شـده و سـطح آنتـی‌بـادی بـالایی نشـان دادنـد، منفـی گردید. ایـن امـر مـی‌توانـد ناشـی از وجـود آنتـی‌بـادی‌هـای غیرآگلوتینان در این نمونه سرم‌ها باشد. چرا که این دسـته از آنتی‌بادی ها در حالی که با آزمایش رزبنگـال اصـلاح شـده قابل تشخیص نیستند، با آزمـایش الایـزا بـه‌خـوبی تشـخیص داده می‌شوند و این یکی از امتیازهای آزمایش الایزا نسـبت به آزمایش‌های مبتنی بر آگلوتیناسیون محسوب می‌شود.

نظر به اینکه بیماری بروسلوز در کشور ما اندمیک است، لذا همواره سطح پایینی از آنتی‌بادی در سرم برخی افراد وجـود دارد. برای حذف یا کاهش موارد مثبت کاذب در آزمـایش الایزای IgG، بایستی Cut-off بـالاتری را بـه‌عنـوان معیـار مثبت بودن در نظر گرفت؛ بنابراین چنانچـه در ایـن مطالعـه، مرز مثبت شدن آزمـایش الایـزا بـرای IgG ضـد بروسـلا را بیشـتر یـا معـادل ۳۰ واحـد در نظـر بگیـریم، در حـالی کـه حساسـیت آزمـایش بـدون تغییـر مـی‌مانـد (۹۴٪)، ویژگـی آزمایش افزایش یافته و به سطح ۸۰٪ مـی‌رسـد. بـا توجـه بـه اینکه کیت های سنجش آنتی‌بادی هـای ضـد بروسـلا اکثـراً خـارجی بـوده و متناسـب بـا وضـعیت بیمـاری بروسـلوز در کشور یـا کشـورهـایی تهیـه و استانداردسـازی شـده‌انـد کـه متفاوت از شرایط بیماری بروسلوز در کشـور مـا اسـت، لـذا نمی‌توان Cut-off تعیـین شـده در ایـن کیـت‌هـا را مـلاک تشخیصی قرار داد. لذا نیاز اسـت Cut-off آزمـایش الایـزا بـرای IgG و IgM ضـد آنتـی‌ژن‌هـای بروسـلا متناسـب بـا شرایط کشور ما تعیین و استانداردسازی شود.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که آزمـایش رزبنگـال اصلاح شده، یک آزمایش سـاده، ارزان و سـریع اسـت کـه دارای حساسیت و ویژگی مشـابه بـا آزمـایش الایـزای IgG در تشـخیص بیمـاری بروسـلوز اسـت. بـا توجـه بـه اینکـه آزمایش الایزای IgG، یک آزمایش گران‌قیمت، پیچیده و بـا زمـان‌بـری بیشـتر بـوده و نیازمنـد مـواد و دسـتگاه‌هـای گران‌قیمت است، لذا با انجام آزمایش رزبنگال اصلاح شده می‌توان نیاز به آزمایش الایزا را مرتفع ساخت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه بواسطه تامین هزینه انجام این طرح پژوهشی اعلام می‌دارند. این مقاله حاصل پایان‌نامه 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 فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تامین گردید.

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 Kholy 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.