المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٦، عدد إضافي ٤، ٢٠١٢ (٣٥٩-٣٦٣)
وقائع المؤتمر العلمي السادس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

# التحـري عن مرض الاجهاض الساري في الأغنـام باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل والفحوصات المصلية الأخرى

**هديل عاصم محمد و عامر نعمت سليم**

فرع الطب الباطني والوقائي، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

**الخلاصة**

استهدفت الدراسة التحري عن مرض الاجهاض الساري في قطعان الأغنام التي أظهرت حيواناتها علامات المرض و الإجهاض وفي مناطق مختلفة من محافظة نينوى.تضمنت الدراسة جمع ثلاثة آلاف عينة دم من 22 قطيعا من الأغنام وبصورة عشوائية تم فحص 485 عينة دم (النعاج 425 و الكباش 60) باختبار وردية البنكال فضلا عن إجراء فحص التلازن الأنبوبي للمصل، كما تم تأكيد التشخيص للعينات الموجبة والسالبة لاختباري وردية البنكال و التلازن الأنبوبي للمصل بأستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل. أظهرت نتائج الدراسة تبايناً في نسب الإجهاض في القطعان الخاضعة للدراسة اعتماداً على تاريخ الحالة المرضية التي بلغت من 1.6% لغاية 21.1% وبمعدل 11.9%، في حين بلغت نسب الإجهاض في القطعان اعتماداً على فحص وردية البنكال 5.4 %. كما لوحظ ارتفاع ملحوظ في نسبة إصابة الذكور (الكباش) بالبروسيلوسز التي وصلت إلى 50% وتبين من الدراسة أن نسبة التوافق بين اختباري وردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل بلغت 90.7%. تم استخدام زوجين من البادئات Primers، الزوج الاول وهو Brucella OMP2 (193 زوجاً قاعدياً) للتعرف على جنس البر وسيلا، في حين استخدم الزوج الآخر من البادئات والخاص بعترة *Br. melitensis* (731 زوجاً قاعدياً) للتعرف على عترة *Br. melitensis* فقط. وتم تطبيق البادئ Brucella OMP2 على قسم من العينات المنتخبة الموجبة والسالبة لاختباري وردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل باستخدام تقنية الـPCR حيث أظهرت نتائج الدراسة نسبة توافق بلغت 94.4 %.

# Detection of brucellosis in sheep using PCR with other serological tests

**H.A. Mohamed and A N. Saleem**

Department of Internal and Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

**Abstract**

The study aimed to investigate the brucellosis in sheep herds that showed, disease and signs of abortion in different regions of the Nineveh province. The study involved randomly collection of three thousand blood samples from 22 herds of sheep and from each blood samples, 485 (sheep 425 and rams 60) were tested for Rose-Bengal plate test (RBPT) as well as Tube agglutination test (TAT), then confirmed these diagnosis of the positive and negative samples of RBPT and TAT by using the polymerase chain reaction technique. The results showed variation in abortion rates 11.9% in herds under study depending on the history of the condition, which amounted from 1.6 - 21.1 %, while the abortion rates in herds based on the examination of a Rose-Bengal reach 5.4%. It was also noted a significant increase in the proportion of infected males (rams) brucellosis which reached 50%. The study found that the percentage of compatibility between the RBPT and TAT of the serum was 90.7%. Using two pairs of primers, the first one, Brucella OMP2 (193 base pairs) use to identify the genius of the Brucella, while the other pairs of primers use as specific (731 base pairs) to identify the strain of *Br. melitensis* only. Application of Brucella OMP2 primers on some selected result of positive and negative samples of RBPT and TAT by using PCR technique gives compatibility rate reach 94.4%.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

**المقدمة**

تشكل الأغنام مصدراً رئيساً لإنتاج اللحوم والحليب والصوف في العراق، وتعدّ محافظة نينوى الأولى في إنتاج الأغنام وتربيتها فضلاً عن كثرة الولادات الأمر الذي أدى إلى زيادة الاهتمام بها وتقليل ما أمكن من فرص إصابتها بالأمراض لاسيما المعدية منها، ومن هذه الأمراض الخطرة الإصابة بمرض البروسيلوسز (الإجهاض الساري) (1).

يعد هذا مرض الاجهاض الساري من الأمراض الخمجية الخطرة والأكثر أهمية في البرامج الصحية والبيطرية، وهو واسع الانتشار في العالم وهو من الأمراض المتوطنة في مناطق الشرق الأوسط وأمريكا اللاتينية وأفريقيا والهند وبعض مناطق آسيا (2)، فهو يصيب معظم الحيوانات فضلاً عن الإنسان (3).

ويتسم هذا المرض بخطورته وتأثيراته السلبية والخسائر الاقتصادية كونه يتسبب في إحداث الإجهاض في النعاج وتأخير عملية الإخصاب وحدوث حالات احتباس المشيمة أو ولادة حملان وعجول ضعيفة فضلاً عن قلّة إنتاج الحليب والعُقم المؤقت والدائمي (4،5).

يتم تشخيص مرض البروسيلوسز بعدة طرائق منها المباشرة التي تعتمد على العزل الجرثومي، وغير المباشرة التي تعتمد على اكتشاف أضداد جراثيم البروسيلا في مصل الدم اضافة الى تشخيص جراثيم البروسيلا في دم الحيوانات المجهضة أو المصابة وأجنتها عن طريق ما يعرف بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (6). وبناءً على ما تقدم وللأهمية الصحية والاقتصادية البالغة للمرض ارتاينا القيام بهذه الدراسة لتحديد نسبة انتشار مرض البروسيلوسز في قطعان الاغنام عن طريق الاختبارات المصلية وتاكيدها باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل.

**المواد وطرائق العمل**

تم جمع ثلاثة آلاف عينة دم من 22 قطيعاً من الأغنام وبصورة عشوائية، وتضمن الجمع مناطق مختلفة من محافظة نينوى. تم فحص 485 عينة دم منها بفحص وردية البنكال (النعاج 425، والكباش 60) وبعداجراء الفحص على المصول، ثم حفظ المصل بالتجميد بدرجة -20 °م وقسم إلى جزءين: جزء منه لإجراء الاختبارات المصلية عليه، والجزء الآخر لأجراء فحص (تفاعل البلمرة المتسلسل).

فيما يخص الاختبارات المصلية فقد تم اجراء اختبار وردية البنكال حسب تعليمات الشركة المجهزة للمستضد من شركة Omega / المملكة المتحدة وكذلك اختبار التلازن الأنبوبي للمصل حسب الطريقة التي ورد ذكرها في (7).

كما تم تطبيق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) على 12 عينة مصل موجبة لفحص وردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل و 18 عينة مصل سالبة لفحص وردية البنكال و التلازن الأنبوبي للمصل وتضمنت التقنية استخلاص DNA من المصل اعتماداً على طريقة (8) وذلك باستخدام الأطقم الجاهزة Kits والتي جهّزت من معهد Borstel للتقنيات الإحيائية الجزيئية / ألمانيا مع بعض التحويرات، ثم اجريت عملية الترحيل الكهربائي لعينات DNA المستخلصة اعتمادا على ما ورد في (6) ثم تم حساب تركيزDNA لكل عينة باستخدام جهاز المطياف الضوئي.أما تحضير تفاعلات Species-specific PCR فقد تم استخدام المحاليل التالية في التفاعل :المحلول المنظم PCR buffer ×10 و القواعد النيتروجينية ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين dNTPs والمجهّزة من شركة أبندروف الألمانية و كذلك البادئات Primers المجهّزة من معهد Borstel للتقنيات الإحيائية / ألمانيا.

والجدول التالي يوضح نوع وتتابع البادئات التي تم استخدامها في الدراسة.

| ت | اسم البادئ | رقم البادئ | تتابع البادئ 3'---------------------------5' |
|---|---|---|---|
| ١ | Brucella- OMP2 | Forward | GCG CTC AGG CTG CCG ACG CAA |
| | | Reverse | ACC AGC CAT TGC GGT CGG TA |
| ٢ | *Brucella melitensis* | Forward | AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA |
| | | Reverse | TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT |

**النتائج**

بلغ العدد الكلي للأغنام الخاضعة للدراسة 3000 رأس (2880 نعجة و 120 كبشاً) وشملت 22 قطيعاً من الذين أظهروا علامات الإجهاض وقد توزعت بصورة عشوائية في محافظة نينوى (الجدول 1).

بلغت نسبة الإجهاض في القطعان اعتماداً على فحص وردية البنكال RBPT 0 - 12 % بمعدل 5.4%، وبلغت نسبة الإصابة بالبروسيلا في الكباش في القطعان اعتماداً على فحص وردية البنكال 0 - 100% كما أظهرت الدراسة أن معدل الإصابة الكلية في القطعان اعتماداً على فحص وردية البنكال كانت 6.1%. وبلغت نسبة الإجهاض في القطعان الخاضعة للدراسة اعتماداً على تاريخ الحالة المرضية 11.9%. وبلغ عدد النماذج المفحوصة باختبار وردية البنكال 485 أنموذجاً مصلياً شمل على 425 أنموذجاً من الإناث و 60 من الذكور أخذت عشوائياً من القطعان التي أظهرت علامات الإجهاض حيث أعطى 185

أنموذجاً مصلياً نتائج موجبة لاختبار وردية البنكال وبنسبة 43.5% منها 155 من الإناث (36.5%) و 30 من الذكور (50.0%).

وتبين من الدراسة أن نسبة التوافق بين اختبار وردية البنكال واختبار التلازن الأنبوبي بلغت 90.7% حيث أجري هذا الاختبار على 43 أنموذجاً مصلياً من النماذج التي أعطت نتائج موجبة لاختبار وردية البنكال بصورة عشوائية. وبلغ عدد عينات الإناث المفحوصة بهذا الاختبار 30 أنموذجاً أعطت 3 منها فقط نتائج سالبة في حين بلغ عدد عينات الذكور 13 أنموذجاً كان واحدٌ منها فقط سالبا (الجدول 2).

إن نتائج اختبار تقنية PCR على عينات الأمصال السالبة لاختباري وردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل قد أعطت جميعها (حزم) وهذا دليل على وجود البروسيلا في هذه العينات وكذلك *Br.melitensis* وبنسبة 91.7 % لعينات المصل الموجبة لاختباري وردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل و 83.3 لعينات المصل السالبة لاختباري وردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل كما موضح بالجدول رقم (3)، وأظهرت النتائج ظهور حزمة واحدة للعينات جميعها الموجبة لاختبار PCR ومن مقارنة وجود حزم العينات مع الدليل الحجمي يتم حساب الوزن الجزيئي لهذه الحزمة، أما عدم ظهور الحزمة في العينة بعد التضاعف فتشير إلى كونها نتيجة سالبة (أي خالية من البروسيلا). وبلغ الوزن الجزيئي للحزم المتضاعفة باستخدام البادئ Brucella OMP2 193 زوجاً قاعدياً (الشكل 1)، أما البادئ الخاص بـ*Br.melitensis* فقد أعطت الحزم الظاهرة وزناً جزيئياً قدره 731 زوجاً قاعدياً (الشكل 2). وكما يوضح الجدول رقم (3) نتائج اختبارات تفاعلات PCR باستخدام البادئات المختلفة التي طبقت على العينات قيد الدراسة. أن ظهور الحزم عند استخدام البادئ الأول Brucella Omp2 دليل على وجود جرثومة البروسيلا، أما عند تطبيق البادئ الثاني الخاص بنوع *Br.melitensis* فهو دليل على أن نوع البروسيلا الموجودة في العينة تعود لنوع *Br.melitensis*.

الجدول 1: نتائج الدراسة الوبائية وفحص وردية البنكال في القطعان الخاضعة للدراسة.

| عدد القطعان | | العدد الكلي للحيوانات | الإجهاض في النعاج والإصابة في الكباش | | عدد الحيوانات المفحوصة بفحص RBPT | | | نسبة الإجهاض في النعاج والإصابة بالكباش اعتماداً على فحص RBPT% والإصابة الكلية |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | العدد | النسبة % | العدد | +ve RP | % | |
| 22 | نعاج | 2880 | 345 | 11.9 | 425 | 155 | 36.5 | 5.4 |
| | كباش | 120 | - | - | 60 | 30 | 50 | 25 |
| | كلي | 3000 | 345 | 11.9 | 485 | 185 | 43.5 | 6.1 |

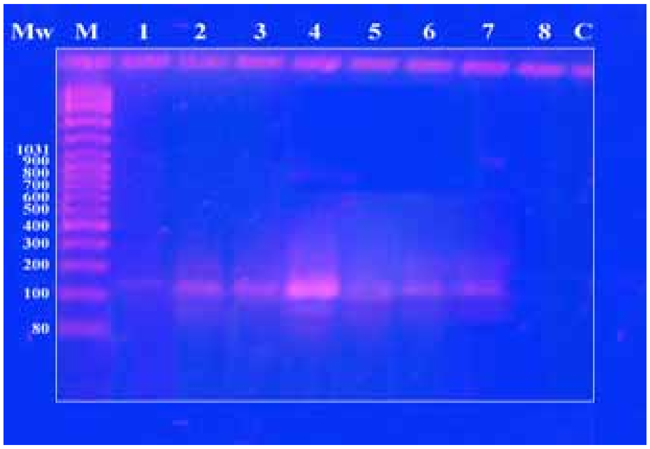
الجدول 2: نتائج اختبار التلازن الأنبوبي للمصل TAT والتوافق مع فحص وردية البنكال.

| الحيوان | العدد الكلي | العينات الموجبة | العيارية (وحدة دولية / مل) | | | | | | | النتائج السالبة | المطابقة % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 | | |
| النعاج | 30 | 27 | - | - | 7 | 10 | 6 | 3 | 1 | 3 | 90.0 |
| الكباش | 13 | 12 | - | - | 2 | 4 | 3 | 2 | 1 | 1 | 92.3 |
| المجموع | 43 | 39 | | | 9 | 14 | 9 | 5 | 2 | 4 | 90.7 |

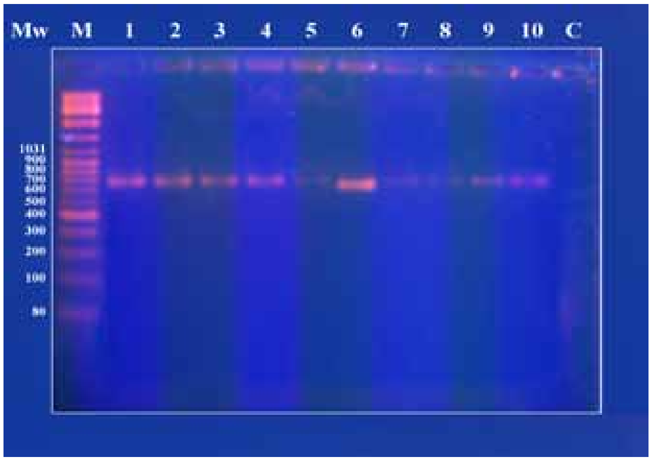
الجدول 3: نتائج اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل على العينات الخاضعة للدراسة.

| عدد العينات | نوع الاختبـــار | | البادئ OMP2 A/B | البادئ *Br. meletensis* A/B |
|---|---|---|---|---|
| | +ve RBPT | +ve TAT | | |
| 12 | + | + | 11 / 12 *<br>% 91.7 | 11 / 12<br>% 91.7 |
| 18 | - | - | 17 / 18<br>% 94.4 | 15 / 18<br>% 83.3 |

* A/B: A = عدد النماذج التي أعطت نتائج موجبة في اختبار تفاعل البلمرةالمتسلسل، B = عدد النماذج المفحوصة.




شكل (1): نتائج تضاعف الـDNA باستخدام البادئ Brucella $OMP_2$ المرحل على هلام الأكاروز 2% وعندالوزن الجزيئي 193 زوج قاعدي العينات المصل الموجبة والسالبة لاختباري وردية البنكال والتلازن الانبوبي للمصل (1-8)، اما (C) عينة السيطرة، (M) الدليل الحجمي القياسي.




شكل (2): نتائج تضاعف الـDNA لعينات المصل الموجبة والسالبة (1-10) لاختباري وردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل باستخدام البادئ الخاص بنوع *Br. melitensis* وعند الوزن الجزيئي 731 زوجاً قاعدياً والمرحلة على هلام الأكاروز وبتركيز 2%، ويمثل (M) الدليل الحجمي القياسي.

**المناقشة**

هدفت الدراسة الكشف عن نسبة الإصابة بمرض الاجهاض الساري في قطعان الأغنام من خلال استخدام الاختبارات المصلية وتحديد نسب حدوثه في محافظة نينوى فضلاً عن مقارنة الاختبارات المصلية المستخدمة مع تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل لتحديد الكفاءة التشخيصية. وتضمنت الاختبارات المصلية اختبار وردية البنكال الذي تم استخدامه بوصفه اختباراً مسحياً تشخيصياً وذلك لما يمتاز به هذا الاختبار من سهولة وسرعة في التطبيق والحصول على النتائج خصوصاً عندما تكون اعداد الحيوانات مرتفعة (5)، إذ يقوم هذا الاختبار بالكشف عن الأجسام المضادة من أصناف الكلوبيولين المناعي IgM، IgG، IgA لكنه يظهر حساسية أكثر للكلوبيولين المناعي IgM الذي تكون نسبته مرتفعة في بداية الإصابة لذا استخدم لتعيين الاصابة المبكرة في القطعان (9) وعلى الرغم من ذلك فان من مساوئ هذا الاختبار إعطاءه نتائج موجبة كاذبة بنسبة (1-3%) فضلاً عن أنه لا يميز الحيوانات الملقحة عن المصابة (10). أما اختبار التلازن الأنبوبي للمصل الذي طبّق على مصول الأغنام التي أعطت نتائج موجبة نوعياً مع اختبار وردية البنكال فقد كانت نسبة التوافق الكلية بين اختبار التلازن الأنبوبي للمصل واختبار وردية البنكال في الأغنام (90.7%) وقد يعزى سبب ذلك إلى اختلاف حساسية الاختبارين للكلوبيولينات المناعية إذ إن اختبار التلازن الأنبوبي للمصل يكون أكثر حساسية من اختبار وردية البنكال في الكشف عن IgM كما وإن اختبار التلازن الأنبوبي للمصل قد يعطي نتائج سالبة في الحيوانات التي قد تكون في بداية الإصابة أو في الحالة المزمنة (11). وبصورة عامة فإن اختبار وردية البنكال يكشف عن الكلوبيولينات المناعية في حين أن اختبار التلازن الأنبوبي للمصل يقيس أو يحدد تركيز الأجسام المضادة النوعية في المصل (5).

ان عملية استخلاص الـDNA اعتمادا على الطريقة المتبعة في (8) وباستخدام الأطقم الجاهزة أثبتت فعاليتها في استخلاص DNA والحصول على كميات مناسبة يمكن استخدامها في تفاعل البلمرة المتسلسل، وبصورة عامة فإن الكمية المستخلصة من الحامض النووي DNA لا تعدّ عاملاً رئيساً لاستخدامها في تقنية الـPCR إذ تحتاج إلى كميات قليلة جداً أو شريط مفرد من DNA لتكون ضمن مواد التفاعل لإكمال عملية البلمرة وإحداث تضاعف لسلسلة DNA في المبلمر الحراري (12)، كما أثبتت الدراسة إمكانية استخدام مصل الدم للتحري عن وجود جراثيم البروسيلا بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للتشخيص السريع والدقيق وهذا يتفق مع ما ذكره كلّ من (13،14). إن الحساسية والخصوصية العالية التي امتازت بها هذه التقنية عن غيرها من التقنيات الأخرى في الكشف عن جرثومة البروسيلا هوان تلك الاختبارات تعتمد على وجود الأجسام المضادة في حين تعتمد تقنية الPCR على وجود المادة الوراثية DNA التابعة لجراثيم البروسيلا في النعاج التي أظهرت علامات الاجهاض الأمر الذي يشير إلى بداية المرض أي بداية تفاعل الجهاز المناعي مع جراثيم البروسيلا وعدم مقدرة هذا الجهاز على تكوين الكميات الكافية من الأجسام المضادة لاظهار تفاعل موجب في الاختبارات المصلية. فضلا عن قدرته في تميز الإصابة الفعالة Active infection والإصابة المزمنة أو التي في طور الشفاء، ولهذا قد

تعطي التقنيات المعتمدة على التحري عن الأجسام المضادة نتائج موجبة كاذبة الذي قد يعزى إلى بقاء الأجسام المضادة مدة طويلة بعد حصول الشفاء التام ولهذا فان تقنية الـPCR تلعب دوراً مهماً في متابعة تطور الحالة Follow up بدلاً من استخدام اختبار التلازن والإليزا (الذي يعد الاكثر حساسية من الاختبارات المناعية) لتجنب حصول الانتكاسات التي قد تكون خطرة ولاسيما في الإنسان (15).

من ملاحظة نتائج اختبار تفاعلات الـPCR باستخدام البادئات المختلفة التي طبقت على العينات جميعها قيد الدراسة من المصول السالبة والموجبة لاختباري وردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل فان الهدف من استخدام البادئ الأول Brucella OMP2 هو الكشف عن جنس البروسيلا وعند ظهور الحزم عند استخدام البادئ الثاني والخاص بنمط *Br. melitensis* فهو دليل على أن نوع البروسيلا يعود للنمط *Br. melitensis* وهذا يتفق مع أغلب الباحثين من أن السبب الرئيس للإجهاض في النعاج هو الإصابة بالبروسيلا النمط *Br. melitensis* (16) كما يعزى عدم ظهور الحزم في قسم من العينات باستخدام البادئ الخاص بـ*Br. melitensis* لعينات المصل الموجبة والسالبة لوردية البنكال والتلازن الأنبوبي للمصل دليل على وجود أنماط أخرى غير *Br. melitensis* يمكن أن تعود للأنماط *Br. abortus* أو *Br. ovis* التي يمكن أن تكشف عنها الدراسات اللاحقة باستخدام البادئات الخاصة بتلك الأنماط (17).

إن تقنية الـPCR ولاسيما باستخدام البادئات التخصصية Species-specific طريقة مناسبة وسريعة لتشخيص جراثيم البروسيلا التي من خلالها يمكن معرفة جنس الجرثومة ونمطها الخاص وتحديد عائديتها حتى ولو كانت في خليط يحوي على مجموعات كبيرة من المسببات الجرثومية، وهذا ما يفسّر دقة وحساسية الـPCR في الكشف عن المسببات المرضية التي تعجز بقية التقنيات الكشف عنها (18). كما أن لتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل إمكانية تحديد نوع الإصابة وحتى الكشف عن الحيوانات الملقحة ضد مرض البروسيلوسز بسهولة وذلك باعتمادها البادئ الخاص بالأنواع المستخدمة في تصنيع لقاح البروسيلا ولاسيما *Br. melitensis* Rev. 1 (19).

## شكر وتقدير

الشكر والتقدير الى عمادة كلية الطب البيطري، جامعة الموصل لدعمها لانجاز هذا البحث.

## المصادر


١. الحاج طه، أحمد، محمد، عطا الله سعيد و طاقة، محمد رمزي. تغذية الحيوان. مديرية مطبعة الجامعة، جامعة الموصل (مترجم) 1984.

2. Yagupsky P, Peled N. Use of the isolator 1.5 microbial tube for detection of *Br. melitensis* in synovial fluid. J Clin Microbiol 2002; 40:10.
3. Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Grace EM, McDonald WC. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella spp.* Emerg Infect Dis 2003; 9(4): 485-488
4. Solera J, Martinez-AlFaro E ,Espinosq A. Recognition and optimum treatment of brucellosis. Drugs. 1997; 53: 245-256.
5. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs and horses. 8th ed. Bailliere Tindall, London 2000. pp. 867-891.
6. Navarro E, Eschribano J, Fernandez JA, Solera J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella spp.* in human blood samples. Immunol Med Microbiol 2002;34:147-151.
7. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology. 4th ed., Mmerican Society for Microbiology, Washington D. C 1985: p 383-386.
8. Romero C, Lopez I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucell spp.* by PCR. Appl Environmen Microbiol. 1999;65(8):3735-3737.
9. Corbel, MJ. Brucellosis an overview. Emerg. Infect. Dis. 1997; 3: 213-221.
10. Radostits OM, Blood DC, Gray CC. Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs and horses. 8th ed. Bailliere Tindall 1994:p787-813.
11. Alton GG , Jones LM , Angus RD ,Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Institutes National de La Recherche Agronomique, Paris, France1988:p63-129.
12. Newton CR, Graham A. PCR. 2nd ed. Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford, U.K 1997:p18-22.
13. Elfaki MG, Uz-Zaman T, Al-Hokail AA, Nakeeb SM. Detection of Brucella DNA in sera from pateints with brucellosis by polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 27: 125-132.
14. Vrioni G, Gartzonika C, Kostoalo A, Boboyianni C, Papadopoulou C, Levidiotou S. Application of a polymerase chain reaction enzyme immunoassay in peripheral whole blood and serum specimens for diagnosis of acute human brucellosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23(3): 194-199.
15. Al-Attas RA, Mohammad AK, AbdulRahman AQ, Mohammad B, Nafisan AG. Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. Annals of Saudi Medicine. 2000;20(3-4):224-228
16. Saleem AN, Rhaymah MS, Shamoon GN. Isolation and seroprevalence of ovine brucellosis. Iraqi J Vet Sci 2004;18(1):31-38
17. Manterola L, Tejero GA, Ficapal A, Shopayeva B, Blasco JM, Marin CM, Lopez I. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection is serum samples for rams. Vet Microbiol 2003;92:65-72.
18. Zerva L, Bourancas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of Human Brocellosis by PCR. J Clin Microbiol 2001;39(4):1661-1664.
19. Cloeckaert A, Garyon M, Grepinet O. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev. 1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene. Vaccine 2002;20:2546-2550.