Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(86): 52-59

Determination of isolated *Brucella* species in blood samples of patients with brucellosis by PCR

Naseri Z[1], Yousef Alikhani M[2], Hashemi H[3], Arabestani MR[4*]

1- Blood Transfusion Research Centre, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Hamadan, Iran
2- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of medical sciences, Hamadan, Iran, Brucellosis Research Center, Hamadan, Iran
3- Department of Infectious diseases, Faculty of Medicine, Hamadan University of medical sciences, Hamadan, Iran, Brucellosis Research Center, Hamadan, Iran
4- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan university of medical sciences, Hamadan, Iran, Brucellosis Research Center, Hamadan, Iran

Received:6 Apr 2014, Accepted: 11 Jin 2014

Abstract

Background: Brucellosis is a major cause of zoonosis disease and is endemic in hamadan Province in Iran. The purpose of this study was to isolate *Brucella* species from brucellosis patients and identify different species of this bacterium in order to determine the prevalence of the species.

Materials and Methods: This study was descriptive- cross sectional and fifty blood samples were obtained from brucellosis patients with clinical symptoms. The samples were cultured in BACTEC system and incubated for 14 days. Then, the samples were cultured on Brucella agar and biochemical tests were done for identification of bacteria. Finally, Polymerase Chain Reaction (PCR) applied for confirmation and isolated identification with specific primers.

Results: Seven *Brucella* strains were isolated from 50 blood samples of the patients with brucellosis by blood culture and PCR. The PCR results on blood specimens showed 4 positive in spite of the negative results of blood culture. PCR and biochemical methods revealed that all the 11 isolated bacteria were *Brucella Melitensis.*

Conclusion: This study was designed to evaluate PCR technique as a diagnostic tool for *brucella* spp in comparison to conventional techniques. This study showed a high prevalence of brucellosis due to *Brucella Melitensis* in Hamadan Province and efforts in this region should be aimed at the eradication of this bacterium.

Keywords: Brucellosis, Blood culture, Diagnosis, PCR.

*Corresponding Author:
Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran, Brucellosis Research Center, Hamadan, Iran.
Email: mohammad.arabestani@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 17، شماره 5 (شماره پیاپی 86)، مرداد 1393، 59-52

تعیین گونه های بروسلا ایزوله شده از نمونه‌های خون بیماران مشکوک به بروسلوزیس با روش PCR

زهرا ناصری[1]، محمد یوسف علیخانی[2]، سید حمید هاشمی[3]، ، محمد رضا عربستانی[4*]

1- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، پایگاه همدان، ایران
2- دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران، مرکز تحقیقات بروسلوز، همدان، ایران
3- استاد، گروه عفونی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران، مرکز تحقیقات بروسلوز، همدان، ایران
4- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران، مرکز تحقیقات بروسلوز، همدان، ایران

تاریخ دریافت:93/1/17 تاریخ پذیرش: 93/3/21

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوزیس به عنوان یکی از بیمای‌های شایع زئونوز محسوب می‌شود و استان همدان یکی از مناطق اندمیک این بیماری است. هدف از این مطالعه جداسازی بروسلا از بیماران بروسلوزیس و تعیین گونه‌های این باکتری به منظور بررسی شیوع این سویه‌ها بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع مقطعی- توصیفی بود و از50 بیمارمشکوک به بروسلوز و دارای علایم بالینی نمونه‌گیری از خون انجام شد. هر نمونه در محیط کشت خون BACTEC به مدت 14 روزتحت بررسی قرار گرفت. سپس، نمونه‌ها روی محیط بروسلا آگار کشت داده شد و برای تشخیص باکتری‌های رشد کرده، از آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده گردید. در مرحله بعد آزمون PCR جهت تائید و تعیین گونه‌های بروسلا انجام شد.

یافته‌ها: از 50 نمونه خون گرفته شده از بیماران مشکوک به بروسلوز، 7 نمونه خون از نظر آلودگی با بروسلا با روش کشت مثبت و با روشPCR تائید گردید. توسط PCR مستقیم روی نمونه‌های خون (22 درصد) 11 مورد مثبت شدند که تمام موارد کشت مثبت توسط PCR نیز شناسائی شدند. پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و PCR ، بروسلا ملی تنسیس به عنوان گونه باکتری‌های جدا شده، شناخته شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه تکنیک PCR برای تشخیص گونه‌های بروسلا در مقایسه با روش‌های معمول باکتری شناسی مورد ارزیابی قرار گرفت. این مطالعه نشان می‌دهد که شیوع بروسلوز با عامل غالبیت بروسلا ملی تنسیس در استان همدان مشهود بوده و تلاش برای ریشه کن سازی این باکتری در این منطقه بایستی انجام گیرد.

واژگان کلیدی: بروسلوزیس، شناسایی،کشت خون، PCR

***نویسنده مسئول**: همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بروسلوز
Email: mohammad.arabestani@gmail.com

مقدمه

بروسلوز بیماری عفونی مشترک بین انسان و حیوان (زئونوز) می‌باشد که توسط باکتری های داخل سلولی اختیاری از جنس بروسلا ایجاد می‌شود. چهار گونه این باکتری شامل بروسلا سویس، کنیس، آبورتوس و ملی تنسیس در ایجاد بیماری در انسان حائز اهمیت می‌باشند که گونه شایع در ایران، بروسلا ملی تنسیس است. بیماری تب مالت به شکل آندمیک وجود دارد و از مشکلات اصلی در سلامت، بهداشت عمومی و اقتصاد در سطح جهانی می‌باشد. راه عمومی انتقال به سه روش تماس مستقیم با دام آلوده، مصرف محصولات لبنی آلوده و استنشاق (به ندرت) است که جزء بیماری‌های مرتبط با شغل وحرفه نیز محسوب می‌شود(3-1). در ایران بیماری بیشتر در قسمت‌های مرکزی و غربی کشور شایع بوده و به شکل آندمیک می‌باشد. شیوع بالای عفونت به ترتیب در همدان 5/107، کردستان 5/83، آذربایجان غربی 4/71، زنجان1/67 در هر 100000 نفرجمعیت می‌باشد(4).

سالانه 500000 مورد جدید درگیری با بروسلوز در جهان گزارش می‌شود که طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت این تعداد در برابر شیوع واقعی آن ناچیز می‌باشد، زیرا این بیماری علائم بالینی متفاوتی دارد. تنوع، غیر اختصاصی و غیر تیپیک بودن علائم بالینی بروسلوز ضرورت تشخیص بر اساس یافته‌های آزمایشگاهی را روشن می‌سازد(4-3). از علایم معمول در بیماران بروسلوز می‌توان به تب، لرز، عرق شبانه، بی‌اشتهایی، خستگی و کاهش وزن اشاره نمود. بیماری بروسلوز به صورت کلی کشنده نمی‌باشد اما در صورت عدم تشخیص و مزمن شدن بیماری می تواند مشکلاتی جدی برای بیمار به وجود آورد(5).

به علت نبود علایم اختصاصی در این بیماری و شباهت علایم آن به بیماری‌های دیگر و هم‌چنین سخت رشد بودن باکتری بروسلا تشخیص این بیماری مشکل می‌باشد و تشخیص قطعی این بیماری در موقعی است که بروسلا از خون، مغز استخوان یا سایر بافت‌ها جدا گردد، میزان جداسازی بسته به روش مورد استفاده از 15 تا 90 درصد متغیر می‌باشد(6).

به علت مشکلاتی که در تشخیص این بیماری وجود دارد، روش‌های مختلفی در رابطه با انتخاب بهترین روش برای تشخیص مورد بررسی قرار گرفته و مقایسه این روش‌ها که شامل آزمایشات مختلف سرولوژیکی، کشت و PCR می‌باشد، نتایج مختلفی در برداشته است(7). چندین روش متداول برای تشخیص بیماران بروسلوزیس استفاده می‌گردد که از جملهٔ آنها روش‌های کشت نمونهٔ خون بیمار می‌باشد که حساسیت آن به میزان 53 تا 90 درصد متغیر است(3). از روش‌های دیگر می‌توان به انواع آزمون‌های PCR، الایزا و آگلوتیناسیون اشاره کرد. در هنگام عدم وجود شرایط کشت برای تشخیص بروسلوز به طور معمول از روش‌های سرولوژیکی و تست‌های آگلوتیناسیون استفاده می‌شود. روش مولکولی PCR نسبت به روش کشت خون از حساسیت بالاتری برخوردار است. در برخی مطالعات گزارش شده است که حساسیت و اختصاصی بودن روش PCR در تشخیص بروسلوزیس به میزان 98 درصد است(10-8).

برای تعیین گونه‌های بروسلا از روش‌های کلاسیک مانند تست اوره آز، نیاز به CO_2، رشد در محیط‌های حاوی تیونین و فوشین، تولیدH_2S، آگلوتیناسیون توسط آنتی سرم و از روش‌های مولکولی می‌توان به PCR اشاره کرد(2، 3).

اکثر مطالعاتی که در کشور ما بر روی بروسلوز صورت گرفته است، مطالعات سرو اپیدمیولوژیک می‌باشد و مطالعات کمتری با استفاده از کشت با دستگاه BACTEC جهت کشت بروسلا انجام شده است. به دلیل آندمیک بودن بروسلوز در استان همدان و اهمیت تشخیص سریع و دقیق عامل این بیماری جهت انتخاب بهترین روش درمانی بر آن شدیم که مطالعه‌ای جامع با استفاده از روش‌های پیشرفته کشت BACTEC و PCR خون جهت تشخیص و تعیین گونه‌های بروسلا انجام گیرد.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه و جمعیت مورد مطالعه:

در ایـن مطالعـه توصـیفی- مقطعـی، 50 فـرد مشکوک به بروسلوز با تست های سرولوژیک مثبت و علائم بالینی که در بخش عفونی بیمارستان فرشچیان همدان بستری یا تحت درمان بودند، در یک دوره 18 ماهه مورد بررسی قرار گرفتند. این مطالعه دارای تاییدیه از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان به شماره 31354 می باشد. نمونـه خـون گرفتـه شـده از بیمـاران بـه آزمایـشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان ارسال گردید.

کشت خون با استفاده از دستگاه BACTEC و شناسایی باکتری‌های جدا شده با آزمون‌های بیوشیمیایی

ابتدا از بیماران مشکوک به بروسلوز 5 الی 7 میلی‌لیتر خون گرفته شد و به محیط کشت خون BACTEC تلقیح شد. محیط های کشت خون به بخش میکروب شناسی انتقال یافته و در داخل دستگاه BACTEC قرار گرفتند. تمام نمونه‌هایی که در طی هفته اول کشت مثبت شدند بر روی محیط بروسلا آگار، کشت مجدد بر روی آنها صورت گرفت. سپس در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 روز انکوبه گردید. در مرحله بعد باکتری‌های جدا شده از کشت خون با استفاده از رنگ آمیزی گرم (کوکوباسیل گرم منفی) و تست‌های بیوشیمیایی استاندارد (اکسیداز، کاتالاز، اوره از، تولید گاز H_2S و رشد بر روی محیط‌های حاوی رنگ‌های تیونین یا فوشین قلیائی...) تعیین هویت شدند. در مواردی که نتیجه کشت آنها در مرحله اول منفی گردید، طول مدت انکوبه گذاری به مدت 14 روز انجام گرفت(4، 6، 11).

استخراج DNA بروسلا

ابتدا یک لوپ باکتری را در محلول آب مقطر به صورت سوسپانسیون درآورده و این سوسپانسیون به مدت 10 دقیقه جوشانده شد. در مرحله بعد بقایای سلولی توسط عمل سانتریفوژ، رسوب و مایع روئی حاوی DNA به ویال دیگری منتقل و غلظت و میزان خلوص DNA توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. جهت استخراج DNA از نمونه های خون از کیت استخراجDNA شرکت بایونر استفاده گردید.

تایید باکتری های بروسلای جدا شده با استفاده از روش PCR

از توالی پرایمرهای ذکر شده در جدول 1 برای تایید جنس بروسلا استفاده گردید. این پرایمرها به طور اختصاصی موجب تکثیر یک قطعه 223 جفت باز از ژن محافظت شده bcsp31 می‌شوند. این ژن یک پروتئین غشائی 31 کیلودالتونی بروسلا آبورتوس را رمزدهی می کند که اختصاص جنس بروسلا بوده و در تمام سویه‌ها و بیوواریان‌های بروسلا وجود دارد(5-13). جهت انجام واکنشPCR از DNA سویه استاندارد بروسلا آبورتوس B-19 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. انجام PCR مستقیم بر روی نمونه های خون بیماران هم انجام شد که برای افزایش میزان DNA باکتری در نمونه های خون از محصول PCR اولیه به عنوان مولکول هدف برای بار دوم PCR انجام شد(Double PCR).

جدول1. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه جهت شناسائی جنس و گونه‌های بروسلا

ژن هدف	توالی پرایمرها (5′→3)	اندازه (bp)	منبع
پروتئین غشایی (برا تعیین جنس بروسلا)	B4- F: TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA B5- R: CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG	223	5
برای تعیین گونه بروسلا ملی تنسیس	Meli: AAA-TCG-CGT-CCT-TGC-TGG-TCT-GA IS711:TGC-CGA-TCA-CTT-AAG-GGC-CTT-CAT	731	13
برای تعیین گونه بروسلا آبورتوس	Abor: GAC-GAA-CGG-AAT-TTT-TCC-AAT-CCC IS711: TGC-CGA-TCA-CTT-AAG-GGC-CTT-CAT	498	13

تعیین گونه های بروسلا با PCR

تمام مواردی که در کشت مثبت شده بودند و هم‌چنین مواردی که کشت آنها منفی ولی نتیجه PCR مستقیم روی نمونه‌های خون مثبت بودند، برای تعیین گونه بروسلا، از روش PCR با پرایمرهای اختصاص گونه بروسلا ملی تنسیس و بروسلا آبورتوس (جدول 1) استفاده گردید(15-13). برای نمونه‌های کشت مثبت از DNA استخراج شده باکتری استفاده شد ولی برای نمونه‌هایی که کشت منفی شده بود از محصول PCR اولیه آنها استفاده گردید. بعد از انجام PCR، هفت میکرولیتر از محصول PCR با 3 میکرولیتر لودینگ بافرمخلوط و به درون چاهک‌های ژل منتقل گردید. پس از انجام الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید برای مشاهده باندهای مورد انتظار از دستگاه ترانس لومیناتور استفاده شد.

روش آماری مورد استفاده در این تحقیق آزمون، کای اسکوئر بوده که داده‌ها باکمک نرم افزارSPSS نسخه 14 مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج کشت خون

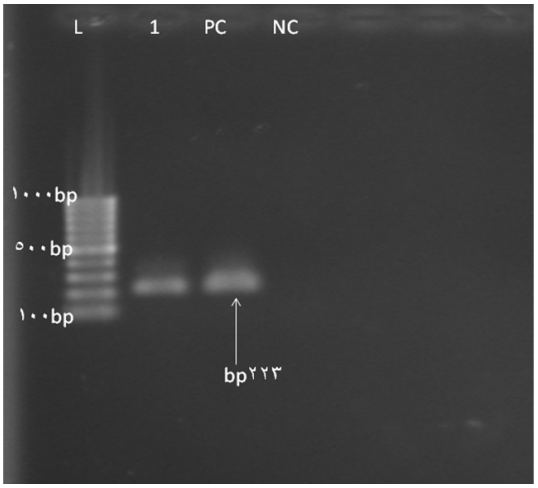
از 50 فرد مشکوک به بروسلوز توسط کشت خون، 7 نمونه باکتری بروسلا جداسازی و شناسائی گردید. تمام ویال‌های کشت خون که توسط دستگاه BACTEC از نظر رشد باکتری مثبت اعلام شده بود بر روی محیط بروسلا آگار کشت داده شد. کلنی‌های مشکوک به بروسلا همگی به صورت کوکوباسیل گرم منفی مشاهده شدند و هم‌چنین از نظر آزمایش اوره آز، تست کاتالاز، اکسیداز، مثبت بودند. تمام ویال‌های منفی به مدت 2 هفته نگهداری شد و کشت مجدد انجام گرفت که همگی نتایج منفی نشان دادند. حداقل زمان لازم برای انکوباسیون در سیستم BACTEC وجدا سازی باکتری در تحقیق حاضر2 روز و حداکثر زمان لازم 5 روز بود(جدول 2).

جدول2. نتایج کشت با دستگاه BACTEC و محیط کشت بروسلا آگار بر روی نمونه‌های خون بیماران

تست	نتایج مثبت تعداد(درصد)	نتایج منفی تعداد(درصد)
کشت با BACTEC	7(14)	43(86)
کشت بر روی محیط بروسلا آگار	7(14)	43(86)

نتایج PCR نمونه‌ها

نتایج به دست آمده از PCR نمونه‌ها، نشان دهنده شناسایی و تشخیص بروسلاهای جدا شده از بیماران می‌باشد (شکل 1). از مجموع 50 نمونه گرفته شده 7 سویه باکتری بروسلا(14 درصد) توسط کشت جدا و با PCR تایید گردیدند. توسط PCR مستقیم روی نمونه‌های خون 11 مورد (22 درصد) مثبت شدند که تمام موارد کشت مثبت توسط PCR نیز شناسائی شدند. به علاوه PCR مستقیم بر روی نمونه‌های خون توانست 4 نمونه (8 درصد) که از نظر کشت خون منفی بودند را نیز شناسائی نماید.

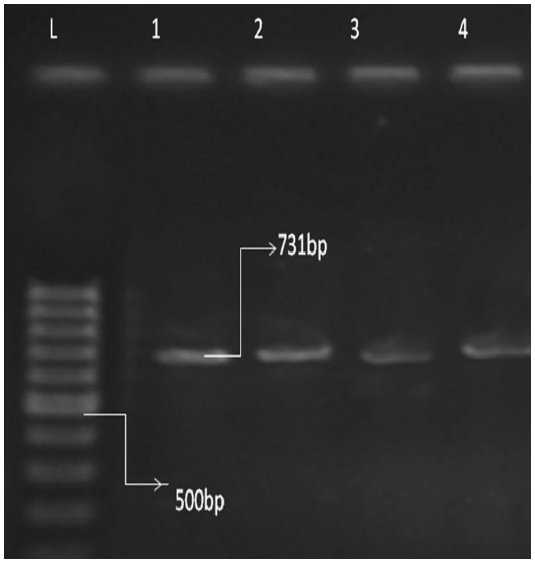


شکل1. الکتروفورز محصول PCR حاصل از نمونه‌های خون توسط پرایمرهای اختصاصی جنس بروسلا حاوی باند bp 223: L: مارکر، ستون 1: نمونه بالینی مثبت، ستون2 (PC): کنترل مثبت، ستون 3 (NC): کنترل منفی

نتایج PCR و روش‌های بیوشیمیایی در تعیین گونه

تمام باکتری‌های جدا شده از کشت خون و هم‌چنین نمونه‌هائی که PCR مستقیم روی آنها نتایج مثبت نشان دادند، با پرایمرهای اختصاصی بروسلا ملی تنسیس و

پرایمر اختصاصی بروسلا آبورتوس با روش PCR اختصاصی گونه مورد آزمایش قرار گرفتند. در تمام موارد باند اختصاصی مربوط به بروسلا ملی تنسیس شناسایی شد(شکل2). نتایج به دست آمده برای 7 سویه باکتری جدا شده با روش‌های بیوشیمیایی در جدول 3 آمده است.



شکل2. الکتروفورز محصول PCR حاصل از باکتری های جدا شده با پرایمرهای اختصاصی بروسلا ملی تنسیس حاوی باند 731bp؛ L: مارکر، ستون 1 الی 4 نمونه‌های حاصل از PCR قطعه مورد نظر جهت شناسایی بروسلا ملی تنسیس

جدول3. نتایج تست‌های تعیین گونه انجام شده برای بروسلاهای جدا شده از نمونه‌های خونی بیماران

تست‌های تعیین گونه	تولید H_2S	کاتالاز	اکسیداز	اوره از	نیاز به CO_2	رشد در رقت های مختلف تایونین و فوشین
بروسلا ملی تنسیس	منفی	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	مثبت

بحث

در مطالعه حاضر، میزان جداسازی باکتری بروسلا با استفاده از کشت خون توسط دستگاه BACTEC 9050، 14 درصد بود. در این خصوص مطالعات انجام شده توسط محققان دیگر از جمله یاقوپسکی با استفاده از دستگاه BACTEC NR 660 توانست در طی 7 روز 21 باکتری از 27 بیمار را جداسازی نماید که میزان جداسازی توسط این دستگاه 78 درصد گزارش گردید(11). هم‌چنین در مطالعه دیگری رز و همکاران توانستند با استفاده از دستگاه BACTEC 9120 در طی7 روز انکوباسیون 16 باکتری از 17 بیمار جداسازی نمایند(16). در مطالعه‌ای مشابه توسط دکتر پیری و همکاران با استفاده از دستگاه BACTEC9120 از 102 بیمار طی 7 روز انکوباسیون 41 مورد کشت مثبت جدا شد(3). همان‌گونه که نتایج این مطالعه نشان می‌دهد، میزان جداسازی باکتری در مقایسه با نتایج گزارش شده توسط سایر محققین، کمتر می باشد. سه احتمال برای توضیح جداسازی کم بروسلا توسط مطالعه ما مطرح می‌گردد که یک یا ترکیبی از این عوامل در جداسازی کم باکتری توسط ما می توانند نقش داشته باشند. 1- این احتمال وجود دارد که تعدادی از افراد مشکوک به بروسلوز در مرحله مزمن بیماری بروسلوز باشند و در این مرحله از بیماری جداسازی باکتری از بیمار بسیار مشکل می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط سارا و ویناس انجام شد آنها توانستند از 92/5 درصد بیماران واقع در فاز حاد بیماری بروسلوز باکتری را جداسازی نمایند در حالی که میزان جداسازی بیماران واقع در فاز مزمن فقط 8/3 درصد بود.2- این احتمال وجود دارد که تعدادی از بیماران مشکوک به بروسلوز از آنتی‌بیوتیک استفاده کرده باشند و استفاده از

آنتی‌بیوتیک باعث کاهش میزان جداسازی باکتری در مطالعه ما باشد.3- از آنجایی که در مناطق اندمیک افرادی که از نظر سرولوژیک مثبت باشند از شیوع بالایی برخوردار است و همدان نیز از مناطق آندمیک این بیماری می باشد، بنابراین افراد مشکوک به بروسلوز ممکن است از سایر بیماری‌های مزمن رنج ببرند و فقط سرم مثبت برای بروسلوز باشند. ما معتقدیم چنانچه در این مطالعه نمونه را از افرادی که تیتر بالاتری از نظر آنتی بادی‌های ضد بروسلوز داشتند برای مثال بالاتر از 1/320 و یا افرادی که تیتر آنتی بادی‌های ضد بروسلوز آنها در مرحله نقاهت چهار برابر یا بیشتر از مرحله حاد بیماری باشند احتمال جداسازی بروسلا بیشتر می‌شد.

در این مطالعه تمام موارد کشت مثبت در طی هفته اوّل توسط دستگاه BACTEC مثبت اعلام شد و پس از کشت مجدد باکتری بر روی محیط‌های جامد، باکتری بروسلا جداسازی گردید. از ویال‌های کشت منفی اعلام شده توسط دستگاه BACTEC بعد از انجام کشت مجدد حتی بعد از هفته چهارم نیز هیچ‌گونه باکتری بر روی محیط های جامد جداسازی نشد و در واقع حساسیت دستگاه BACTEC برای جداسازی بروسلا کامل و 100 درصد بود به همین دلیل، استفاده از دستگاه BACTEC 9050 برای جداسازی و تشخیص بروسلا توصیه می‌شود. در بررسی دیگری که توسط ذوقی و عبادی به مدت 10 سال (1980-1971) انجام شد، تعداد 1107 مورد باکتری بروسلا را تایپینگ نمودند که اکثر آنها بروسلا ملی تنسیس بایوتیپ یک بودند(2). در این مطالعه نیز تمام سویه‌های ایزوله شده، مربوط به گونه بروسلا ملی تنسیس بودند. علیرغم حساسیت نسبتا خوب دستگاه BACTEC، با توجه به مدت زمان تقریباً طولانی (1الی2 هفته انکوباسیون) ونیاز به کشت‌های مجدد جهت تشخیص جنس و گونه باکتری‌های مورد نظر، روش های مولکولی از جمله روش های مبتنی بر PCR که دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی هستند پیشنهاد می‌گردد. در مطالعات گوناگون از جمله مطالعه زروا و همکاران حساسیت و اختصاصیت روش PCR را بالاتر از 95 درصد و 100 درصد به ترتیب گزارش داده‌اند(12). در این مطالعه نیز تعداد موارد مثبت PCR (22 درصد) نسبت به کشت (14 درصد) بیشتر بود. از موارد با اهمیت دیگر این مطالعه تعیین گونه ایزوله‌های جداسازی شده بود که باعث شناخت سویه غالب بروسلا پراکنده در منطقه گردید و برای مطالعات اپیدمیولوژیک و مطالعات آینده بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر 7 سوش بروسلا از نمونه های خونی بیماران با روش کشت و 11 مورد با PCRجدا گردید و با تست های بیوشیمیایی و PCRتعیین گونه شدند. کل سویه‌های جدا شده، گونه ملی تنسیس بودند و بروسلا ملی تنسیس عامل اصلی عفونت در بیماران مبتلا به بروسلوز در استان همدان می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان دادکه روش‌های تشخیصی جدید بروسلا از جمله روش‌های مولکولی مانند روش PCR ازحساسیت، اختصایت، سرعت بالاتری نسبت به روش‌های کشت برخوردارمی‌باشند. هم‌چنین در روش‌های مولکولی خطر آلودگی کارکنان آزمایشگاه به حد قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت آموزشی وپژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر تامین منابع مالی این پایان نامه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Pishva A, Salehi M, Salehi R, Ebrahimi MR. Identification of *Brucella* spp in central region of Iran. Iranian Journal of Biology. 2009; 20 (1): 15-21. [Persian]

2. Zowghi E, Ebadi A, Yarahmadi M. Isolation and identification of Brucella organisms in Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2009; 3(4):185-8.

3. Maleknejad P, Peeri-DoGaheh H, AmirZargar A, Jafari S, Fatollahzadeh B. Diagnosis of brucellosis by use of bactec blood

culture and confirmation by PCR. J Vet Res. 2007;62(4):83-6.
4. Rashidi K, Motaharinia Y, Rezaee MA, Asadzade N, Hazhir MS, Mohsenpour B, et al. Determination of antibiotic resistance in *Brucella* spp from brucellosis patient in Kordestan. Veterinary Journal of Islamic Azad University. 2009; 4 (4): 41-7.[Persian]
5. Elfaki MG, Uz-Zaman T, Al-Hokail AA, Nakeeb SM. Detection of Brucella DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2005;53(1):1-7.
6. Bailey and Scott. Diagnostic Microbiolog: Patricia Tannian; 2002.
7. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. 2004; 4(1):115-23.
8. Elfaki M, Al-Hokil A, Nakeeb Sh, Al-Rabiah F. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of brucellosis in humans. Med Sci Monit. 2005;11(11):69-74.
9. Colmenero J, Queipo-Ortuno M, Reguera J, Baeza G, Salazar J, Morata P. Real time polymerase chain reaction: a new powerful tool for the diagnosis of neurobrucellosis. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 2005;76(7):1025-7.
10. Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera J, García-Ordoñez MA, Pichardo C, de Dios Colmenero J. Posttreatment follow-up of brucellosis by PCR assay. Journal of clinical microbiology. 1999;37(12):4163-6.
11. Yagupsky P. Detection of Brucellae in blood cultures. Journal of clinical microbiology. 1999; 37(11):3437-42.
12. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis N. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. Journal of clinical microbiology. 2001;39(4):1661-4.
13. Khosravi AD, Abasi E, Alavi SM. Isolation of Brucella melitensis and Brucella abortus from brucellosis patients by conventional culture method and polymerase chain reaction technique. Pak J Med Sci. 2006;22(4):396-400.
14. Imaoka K, Kimura M, Suzuki M, Kamiyama T, Yamada A. Simultaneous detection of the genus Brucella by combinatorial PCR. Japanese journal of infectious diseases. 2007;60(2/3):137-8.
15. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of Brucella abortus bv. 1, 2, and 4, Brucella melitensis, Brucella ovis, and Brucella suis bv. 1 by PCR. Journal of clinical microbiology. 1994;32(11):2660-6.
16. Ruiz J, Lorente I, Pérez J, Simarro E, Martinez-Campos L. Diagnosis of brucellosis by using blood cultures. Journal of clinical microbiology. 1997;35(9):2417-8.