مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره شانزدهم/ پائیز ۱۳۹۰/ ۸-۱

جداسازی و تعیین گونه‌های بروسلا از نمونه‌های خونی بیماران بروسلوزیس با روشهای بیوشیمیایی، PCR و سرولوژی در استان کردستان

محمد رضا رحمانی[۱]، یوسف مطهری نیا[۲]، محمد علی رضائی[۳]، ندا اسد زاده[۲]، وریا حسینی[۴]، بهزاد محسن پور[۵]، نسرین بهمنی[۲]، محمد سعید هخامنشی[۶]، کیومرث رشیدی[۷]

۱-استادیار گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی سنندج، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۲- کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی سنندج، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۳-مربی گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

٤- کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی سنندج، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۵-استادیار گروه بیماریهای عفونی، بیمارستان توحید، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

٦-استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی سنندج، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۷-استادیار گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی سنندج، دانشگاه علوم پزشکی کردستان ، سنندج، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن :۶۱۳۱۴۱۲-۰۸۷۱
K.rashidi20@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوزیس یک عامل عمده زئونوز بوده و استان کردستان در ایران یکی از مناطق اندمیک برای شیوع این بیماری است. هدف از این مطالعه جداسازی بروسلا از بیماران بروسلوزیس و تعیین گونه‌های این باکتری به منظور بررسی شیوع این سویه‌ها در استان کردستان می‌باشد.

روش بررسی: از ۶۰ بیمار بروسلوز دارای علایم مراجعه‌کننده به بیمارستان توحید سنندج نمونه گیری از خون انجام گرفت. هر نمونه در محیط کشت خون (BACTEC) تلقیح شده و در شرایط دمایی ۳۷°C به مدت ۵ روز قرار گرفت. پس از این مدت، نمونه‌ها روی محیط بروسلا آگار به مدت ۳ روز کشت داده شد و سپس برای تشخیص باکتری‌های رشد کرده، روش PCR و تست‌های اوره آز، تولید H_2S، کاتالاز، اکسیداز، رنگ‌آمیزی گرم و رشد روی محیط‌های دارای رقت‌های مختلف از رنگهای تایونین و فوشین انجام شد. همچنین از روش آگلوتیناسیون اختصاصی برای تعیین گونهٔ این باکتریها نیزاستفاده گردید.

یافته‌ها: از ۶۰ نمونه خون گرفته شده از بیماران بروسلوزی، ۱۸ سوش بروسلا جداسازی شد. پس از انجام تستهای بیوشیمیایی، کل باکتریهای جدا شده به عنوان بروسلا ملی تنسیس با بیووار یک تا سه شناخته شد. نتایج آگلوتیناسیون نشان داد که ۱۴ سوش جزو بیوار ۱ بروسلا ملی تن سیس و ٤ سوش جزو بیوار ۳ می‌باشند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که شیوع بروسلوز با عامل بروسلا ملی تن سیس در استان کردستان بالا بوده و تلاش برای ریشه کن سازی این باکتری در این منطقه باید اختصاصی برای این باکتری باشد.

کلید واژه‌ها: جداسازی بروسلا، تعیین گونه، استان کردستان، PCR

وصول مقاله: ۸۹/۱۱/۷ اصلاحیه نهایی: ۹۰/۳/۱۱ پذیرش مقاله: ۹۰/۳/۱۷

مقدمه

گونه‌های بروسلا کوکوباسیل‌های گرم منفی هستند که به صورت فلور نرمال دستگاه ادراری در حیوانات اهلی مانند گاو، بز، گوسفند، سگ و خوک وجود دارند. هر چند این باکتری دارای رشد هوازی است اما برخی گونه‌های آن در شرایط دارای ۱۰ درصد CO_2 رشد بیشتری دارند. چهارگونه بروسلا وجود دارد که در انسان ایجاد بیماری می‌کنند که شامل :*melitensis*،

Archive of SID

www.SID.ir

suis،*abortus* و *canis* می‌باشند (۱). گونه ملی تنسیس بیشتر در گوسفند و بز، گونه آبورتوس در گاو، گونه سویس در خوک و گونه کنیس در سگ مشاهده شده است. عفونت به وجود آمده در انسان توسط گونه‌های مختلف بروسلا به نام بیماری بروسلوزیس (Brucellosis) شناخته می‌شود که با در معرض قرار گرفتن انسان از طریق خوراکی، پوستی و تنفسی با حیوانات آلوده و فرآورده‌های آنها به وجود می‌آید. این بیماری به طور نادری از شخصی به شخص دیگر قابل سرایت است (۲). همچون بیماریهای سل و سیفلیس، بروسلوزیس می‌تواند با چندین فرم بالینی در انسان دیده شود. دوره نهفته بیماری معمولاً ۲ تا ۳ هفته بوده اما در برخی بیماران تا چندین ماه طول می‌کشد (۳). از علایم معمول در بیماران بروسلوز می‌توان به تب، لرز، عرق شبانه، بی‌اشتهایی، خستگی و کاهش وزن اشاره نمود. بیماری بروسلوز در کل کشنده نمی‌باشد اما در صورت عدم تشخیص و مزمن شدن بیماری می‌تواند مشکلاتی جدی برای بیمار به وجود آورد (۴). 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. چندین روش متداول برای تشخیص بیماران بروسلوزیس استفاده می‌گردد که از جملهٔ آنها روشهای کشت نمونهٔ خونی بیمار می‌باشد که حساسیت آن به میزان ۵۳ تا ۹۰ درصد متغیر است. از روشهای دیگر می‌توان به انواع تستهای آگلوتیناسیون، ELISA و PCR اشاره کرد. در هنگام عدم وجود شرایط کشت، برای تشخیص بروسلوز به طور معمول از روشهای سرولوژیکی و تستهای آگلوتیناسیون استفاده می‌شود. تست رز بنگال (Rose Bengal) یکی از روش‌های سرولوژیکی تشخیص بروسلوز می‌باشد که مثبت شدن آن به وسیله آزمایش آگلوتیناسیون سرم تأیید می‌گردد. این تستهای آگلوتیناسیون بر اساس واکنش آنتی بادیها با لیپوپلی ساکارید صاف بروسلا می‌باشد (۵). این آنتی بادیها مدت زمان طولانی در سرم بیماران وجود داشته و تشخیص آن برای بررسی میزان شیوع بیماری در مناطق اندمیک حایز اهمیت است. آنتی بادی تولید شده بر ضد لیپوپلی ساکارید صاف بروسلا تمایل زیادی به اتصال به باکتریهای گرم منفی دیگر همچون یرسینیا انتروکولیتیکا، ویبریو کلرا، اشرشیا کولی و فرانسیسلا تولرانزیس داشته و همین باعث افزایش اتصال اشتباه یا Cross Reaction بوده که احتمال پاسخ کاذب نیز بالا می‌رود (۷ و۶). برای جلوگیری از امکان واکنش متقاطع آنتی بادیهای IgM، روش 2-mercaptoethanol براساس اندازه‌گیری اختصاصی آگلوتینه‌کنندگی آنتی بادیهای IgG به کار می‌رود. برای بیماران مزمن از تست Coombs استفاده می‌شود که به مراتب دارای حساسیت بالاتری است، اما اکثر آزمایشگاههای بالینی به علت نیاز داشتن به مهارت و تجهیزات برای انجام این تست از آن استفاده نمی‌کنند (۸). روش مولکولی PCR از لحاظ حساسیت از روش محیط کشت بهتر عمل می‌کند. در برخی مطالعات گزارش شده است که حساسیت و اختصاصی بودن روش PCR در تشخیص بروسلوزیس به میزان ۹۸ درصد است (۹). برای تعیین گونه‌های بروسلا از روشهای کلاسیک مانند: تست اوره آز، نیاز به CO_2، تولید H_2S، رشد در محیط‌های حاوی تایونین و فوشین، آگلوتیناسیون و لیز با فاژ و از روشهای مولکولی می‌توان به Real time PCR اشاره کرد (۹). این بیماری در دنیا دارای گستردگی بوده به طوری که در آفریقا، آسیا و به خصوص منطقه خاورمیانه شیوع بالایی دارد (۱). میزان

Archive of SID

www.SID.ir

شیوع بروسلوزیس در ایران متفاوت و از ۱/۵ تا ۱۰۷/۵ از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال ۲۰۰۳ می‌باشد. شیوع بالای عفونت به ترتیب در همدان با ۱۰۷/۵، کردستان با ۸۳/۵، آذربایجان غربی با ۷۱/۴ و زنجان با ۶۷/۱ از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است (۱۰). با توجه به اندمیک بودن شیوع بروسلوزیس در استان کردستان هدف از این مطالعه جداسازی و تشخیص گونه‌های بروسلا از نمونه‌های خونی بیماران مشکوک به بروسلوز با روشهای کشت، بیوشیمیایی و PCR در استان کردستان برای شناسایی عامل اصلی بروسلوز در استان کردستان است.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع توصیفی بود.

نمونه‌گیری: طی این مرحله بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان توحید سنندج توسط متخصص عفونی از لحاظ علایمی هم چون تب، لرز و عرق شبانه، بی‌اشتهایی و در بعضی موارد داشتن سابقهٔ قبلی بروسلوز معاینه و تأیید و پس از اخذ رضایت از بیماران خون گیری و تست رایت و کومبس رایت انجام گردید (۱۱).

کشت و تست‌های تأییدی: از هر ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون گرفته شده ۵ میلی لیتر آن بلافاصله به سیستم محیط کشت BACTEC (BD ایرلند) اضافه شده و به ۵ میلی لیتر دیگر آن EDTA اضافه شده و برای استخراج DNA در فریزر نگه‌داری شد. محیط‌های BACTEC در دمای ۳۷°C برای ۷ تا ۳۰ روز انکوبه شد. پس از زمان مورد نظر هر نمونه روی یک پلیت حاوی بروسلا آگار (Merck) کشت داده شد. پس از کشت یک سری از پلیت‌ها در شرایط هوازی و یک سری پلیت دیگر در شرایط کم هوازی انکوبه شده و به مدت بیش از ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. برای تهیه شرایط کم هوازی از گاز پک C شرکت (Merck) استفاده شد. کلونی‌های رشد کرده از لحاظ شکل، رنگ‌آمیزی گرم، اوره آز(Merck)، تولید H_2S (Merck)، کاتالاز و اکسیداز بررسی شدند (۱۲ و ۱۱).

استخراج DNA: برای استخراج DNA ازکلونی‌های رشد کرده باکتری روی محیط کشت از روش Boiling استفاده شد. طی این روش چند کلونی را برداشته و در ۵۰۰µl آب دو بار تقطیر حل کرده و در بن ماری در حال جوش به مدت۱۰ دقیقه قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰g به مدت۳ دقیقه، ۵ µl از مایع رویی نمونه برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. همچنین DNA از نمونه‌های خون کامل بیماران نیز با روش Salting Out (کیت،TaKaRa ژاپن) استخراج شده و از این DNA نیز برای واکنش PCR و ردیابی ژنوم باکتری استفاده شد (۱۳).

انجام PCR: طی این روش از پرایمرهای اختصاصی F: 5'- CCAGCGCACCATCTTTCAG-3' و

R: 5'-TCGTTGCGCGTAAGGATGC-3'

برای ژن *bcsp31* که یک پروتئین ۳۱ کیلودالتونی ایمونوژن در غشای خارجی بروسلا آبورتوس را کد می‌کند، که توالی آن در بین تمام گونه‌های بروسلا مشترک است، استفاده شد. قطعه DNA حاصل از PCR ۱۹۷ جفت باز طول دارد (۱۰). واکنشPCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از PCR mix (سیناژن، تهران) بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده از خون و همین طور جدا شده از کلنی رشد یافته در محیط کشت، صورت گرفت (۸). پس از بهینه شدن ست اولیه PCR، حساسیت و ویژگی پرایمرها تعیین و شرایط برای آزمایش نمونه‌ها آماده شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر به

Archive of SID

www.SID.ir

قرار زیر بود: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، انیلینگ در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه که مجموع سیکل‌ها ۴۰ بود (۱۴ و ۱۳). برای تأیید نتیجهٔ PCR از سوش استاندارد Rev-1 خریداری شده از پژوهشکده بیوتکنولوژی تبریز استفاده شد.

الکتروفورز روی ژل آگاروز: ۱۵میکرولیتر محلول PCR با ۳ میکرولیتر از بافر الکتروفورز مخلوط و روی ژل قرار داده پس از ۳۰ دقیقه در ولتاژ ۱۱۰، نتیجه بر روی دستگاه ایلومینیتورUV مشاهده و نتایج ثبت گردید (۱۵).

تست مقاومت به رنگ (Dye Tolerance Test): از کشت ۷۲ ساعتهٔ هر باکتری جدا شده یک رقت ۰/۵ مک فارلند تهیه شده و به میزان ۱۰ میکرولیتر برای هر پلیت در یک ست ۶ تایی از محیط‌های مقاومت به رنگ تلقیح شد. هر ست دارای ۳ پلیت حاوی BHI آگار و رقتهایی از رنگ تایونین به میزان: ۱/۱۰۰۰۰۰،۱/۵۰۰۰۰۰ و ۱/۲۵۰۰۰ و دو پلیت حاوی BHI آگار و رقتهای۱/۱۰۰۰۰۰،۱/۵۰۰۰۰۰ از رنگ فوشین و یک پلیت به عنوان کنترل بدون رنگ در نظر گرفته شد. پلیت‌های مورد نظر در شرایط $37^{\circ}C$ در ۷ درصد CO_2 به مدت ۹۶ ساعت انکوبه شدند. پلیت‌های مورد نظر هر روز مورد بررسی قرار می‌گرفتند (۱۷ و۱۶).

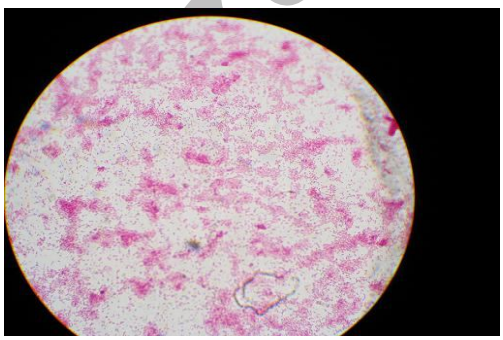
تست آگلوتیناسیون: در این روش از آنتی سرم‌های A و M برای تشخیص گونه باکتریهای جدا شده استفاده شد (۱۷ و۱۶).

در این مطالعه عیار تست رایت یک هشتادم معادل چهار مثبت که بیش از ۲۰۰ واحد بین المللی آنتی بادی است به عنوان تست مثبت برای بیماران ارزیابی گردید.

یافته‌ها

نتایج تستهای تأییدی: پس از گذشت۱۰ روز از کشت نمونه‌های خون، کلونی‌های مشکوک به بروسلا مشاهده شدند (شکل۱). پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم و مثبت شدن تست‌های کاتالاز، اکسیداز و اوره آز باکتریهای بروسلا جداسازی شدند (شکل۲).

شکل ۱ :کلونی باکتریهای جدا شده روی محیط کشت بروسلا آگار خون دار

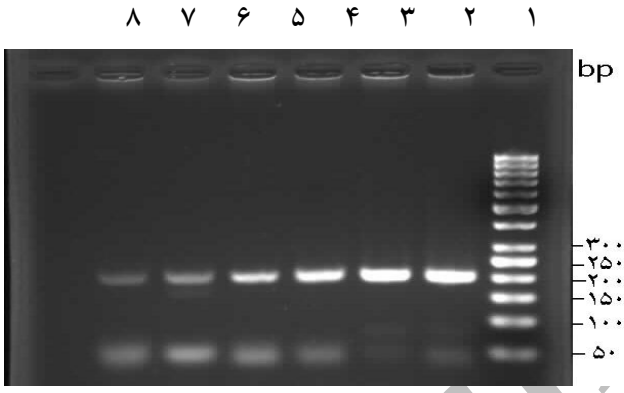


شکل ۲ : رنگ آمیزی گرم باکتریهای جدا شده

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج PCR: پس از انجام PCR نتایج به دست آمده حاکی از شناسایی و تشخیص بروسلاهای جدا شده از بیماران در شکل ۳ قابل مشاهده می‌باشد (شکل۳).



شکل ۳ : رنگ آمیزی ژل آگاروز با اتیدیوم بروماید. ستون ۱: مارکر وزنی DNA ۵۰ جفت بازی، ستون ۲: سوش *Rev-1* با محصول ۱۹۷ جفت بازی، ستون ۳،۴،۵: باکتری های جدا شده با محصول ۱۹۷ جفت بازی، ستون۶ و ۷: نمونه های خون با محصول ۱۹۷ جفت بازی، ستون۸: نمونه *E.coli*

نتایج نمونه‌گیری: پس از انجام تستهای تأییدی بیوشیمیایی و PCR از مجموع ۶۰ نمونه گرفته شده، ۱۸ سویه باکتری بروسلا جدا گردید. در این مطالعه مشخص شد که روشهای سرولوژی (۹۵/۲۳٪) **و** روش PCR (۸۵/۷٪) به ترتیب دارای بیشترین حساسیت در تشخیص بروسلا در نمونه‌های خونی بوده و پس از آن کشت خون (۲۸/۵۷٪) می‌باشد.

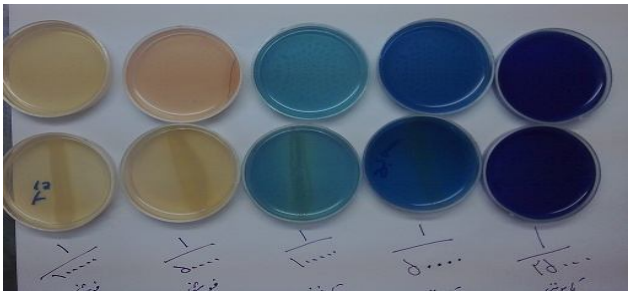
نتایج تعیین گونه: برای باکتریهای جدا شده تستهای مربوط به تعیین گونه انجام شده که نتایج آن در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

جدول ۱: نتایج تستهای تعیین گونه انجام شده برای بروسلاهای جدا شده از نمونه‌های خونی بیماران

تست‌های تعیین گونه	تست تولید H_2S	کاتالاز	اکسیداز	نیاز به CO_2	اوره آز	رشد در رقت‌های مختلف تایونین	رشد در رقتهای مختلف فوشین
Brucella melitensis	–	+	+	–	+	+	+

نتایج تعیین گونه نشان دهنده عدم تولید H_2S و نیاز به CO_2 در هر ۱۸ بروسلای جدا شده بود. نتایج رشد در محیط‌های حاوی رقت‌های مختلف از رنگهای تایونین و فوشین نیز نشان دهنده رشد کل ۱۸ باکتری جدا شده در رقت‌های مختلف می‌باشد (شکل۴).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴ : رقتهای مختلف تایونین و فوشین از راست به چپ. پلیت‌های بالایی گروه شاهد و پلیت‌های پایین باکتری رشد کرده را نشان می‌دهد.

نتایج آگلوتیناسیون اختصاصی: در این روش ۱۴ باکتری جدا شده دارای آگلوتیناسیون A منفی و M مثبت، و چهار باکتری جدا شده دیگر دارای آگلوتیناسیون مثبت به هر دو آنتی سرم بوده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که ۱۴سوش جدا شده جزو بیوار ۱ و چهار سوش جزو بیوار ۳ بروسلا ملی تن سیس می‌باشند.

بحث

بروسلوزیس بیماری حیوانات اهلی و وحشی می‌باشد که می‌تواند از طریق مستقیم و غیر مستقیم به انسان نیز منتقل شود. علایم و نشانه‌های بروسلوزیس انسانی اختصاصی نیستند (۱۹و۱۸و۸). در حقیقت تشخیص بروسلوزیس نمی‌تواند بر اساس نشانه‌های بالینی باشد، زیرا می‌تواند با بیماری‌های دیگر همچون مالاریا، تیفوئید و لپتوسپیروز اشتباه گرفته شود. بنابراین تشخیص این میکروارگانیسم توسط محیط کشت، یا بوسیلهٔ روشهای سرولوژی و مولکولی لازم می‌باشد (۲۱ و۲۰). در این مطالعه ۱۸ سوش بروسلا از نمونه‌های خونی بیماران با روش کشت، تست‌های بیوشیمیایی و PCR جداسازی گردید همچنین کل سوشهای جدا شده به عنوان گونه ملی تن سیس شناسایی شدند. در مطالعه‌ای که توسط خسروی و همکارانش در سال ۲۰۰۶ انجام شده گونه‌های بروسلا ملی تن سیس و آبورتوس با استفاده از روشهای کشت و PCR از بیماران جداسازی شده است. طی این بررسی در روش کشت از محیط اختصاصی کاستاندا استفاده شده که حساسیت تشخیص آن به میزان ۲۶ درصد بوده است، این نتیجه در حالی است که در مطالعهٔ حاضر از محیط کشت BACTEC استفاده گردید که درصد تشخیص آن (۲۸/۵۷٪) بیشتر از روش خسروی و همکارانش بوده است. همچنین در مطالعه خسروی از روش PCR نیز برای تشخیص بیماری بروسلوز استفاده شده است که به میزان ۹۳ درصد در شناسایی بروسلا در بیماران بروسلوزی مؤثر بوده است، در حالی که میزان حساسیت روش PCR مورد استفاده در مطالعهٔ حاضر در تشخیص بروسلوزیس۸۵/۷٪ بوده است که احتمالاً به دلیل نوع پرایمرهای استفاده شده می‌باشد (۱۱). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط ملک نژاد و همکارانش انجام شده است تستهای اوره آز و رنگ‌آمیزی آکریدین و سیستم BACTEC در تشخیص بروسلا در خون مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه از سیستم کشت BACTEC و دستگاه مدل ۹۱۲۰ برای کشت خون بیماران استفاده شده است که نتیجه ی این مطالعه نشان داده است که این روش دارای حساسیت بالایی به میزان ۴۲/۲٪ در جداسازی

Archive of SID

www.SID.ir

بروسلا از خون می‌باشد (۲۲)، که نسبت به نتیجهٔ کشت مطالعهٔ حاضر (۲۸/۵۷٪) بیشتر می‌باشد که این اختلاف احتمالاً به دلیل استفاده ما از روش کشت BACTEC بدون استفاده از دستگاه و به صورت دستی بوده است. در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۸ توسط ذوقی و همکارانش، جداسازی و تشخیص ارگانیسم‌های بروسلا در ایران مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه از روشهای محیط کشت، حساسیت به رنگهای تایونین و فوشین و روش آگلوتیناسیون و لیز با فاژ استفاده شده است. طی این بررسی بیشترین مورد جدا شده بروسلا ملی تن سیس و بیوارهای ۱ و ۲ بوده است (۲۳). این در حالی است که در مطالعهٔ ما کل باکتریهای جدا شده جزو گونه ملی تن سیس بوده و اکثریت آنها با بیوار ۱ و بقیه با بیوار ۳ مشخص شده‌اند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بروسلا ملی تن سیس با بیوارهای ۱ و ۳ عامل اصلی عفونت در بیماران بروسلوز در استان کردستان می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کمک و حمایت گروه میکروب شناسی و ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شده که نویسندگان این مقاله بدین وسیله تشکر و قدردانی خود را از این گروه ابراز می‌دارند.

References

1. Matthew L Lim, and Leland S Rickman. Brucellosis. Infect Dis Clin Pract 2004; 12: 7-14.
2. Alcina V. Carvalho Neta, Juliana P.S. Mol, Mariana N. Xavier, Tatiane A. Paixo, Andrey P. Lage, Renato L. Santos. Pathogenesis of bovine brucellosis. The Veterinary Journal; 2010; 184: 146–155.
3. Young EJ. An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis 1995; 21: 283-290.
4. Malik GM. A clinical study of brucellosis in adults in the Asir region of southern Saudi Arabia. Am J Trop Med Hyg 1997; 56: 375-377.
5. Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis-a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. Clin Lab 2003; 49: 577-89.
6. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specifi C antibody profile in human brucellosis. Clin Infect Dis 1992; 14: 131-40.
7. Mantecon MA, Gutierrez P, del Pilar Zarzosa M, Dueñas AI, Solera J, Fernández-Lago L and et al. Utility of an immunocapture-agglutination test and an enzyme-linked immunosorbent assay test against cytosolic proteins from Brucella melitensis B115 in the diagnosis and follow-up of human acute brucellosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 55: 27-35.
8. Maria Pia Franco, Maximilian Mulder, Robert H Gilman, Henk L Smits. Human brucellosis. Lancet Infect Dis 2007; 7: 775-86.
9. Adrian M. Whatmore. Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infection Genetics and Evaluation 2009; 1168-1184.
10. Ghobad Moradi, Nader Esmaiel Nasab, Ebrahim Ghaderi, Marzieh Sofi Majidpour, Hamideh Salimzadeh. Brucellosis in Kurdistan Province from 1997 to 2003. Annuals of Alquds Medicine 2006; 2: 32-37.
11. Azar D Khosravi, Effat Abassi, Seyed Mohammad Alavi. 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: 396-400.

Archive of SID
www.SID.ir

12. B Kazemi, SA Yousefi Namin, M Dowlatshahi, M Bandepour, F Kafilzadeh. Detection of Brucella by peripheral blood PCR and comparison with culture and serological methods in suspected cases. Iran J Publ Health 2008; 37:96-102.
13. Stella Mitka, Constantine Anetakis, Efimia Souliou, Eudoxia Diza and Athina Kansouzidou. Evaluation of different PCR Assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. J of Clin Microbiol 2007; 45: 1211-1218.
14. Romero C, Pardo M, Grillo MJ, Diaz R, Balsco JM and Goni IL. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy Cattle. J Clin Microbiol 1995; 33: 3198-3200.
15. Romero C and I. Lopez. Goni. Improved methods for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of Brucella spp by PCR. Appl. Environ. Microbiol 1999; 65: 3735-3737.
16. Esra Buyukcangaz, Aysin Sen, Serpil Kahya. Isolation and biotyping of Brucella melitensis from aborted sheep and goat fetuses. Turk. J Vet. Anim Sci 2009; 33: 311-316.
17. Z Ilhan, H Solmaz, A Aksakal, T Gulhan, IH Ekin, B boynukara. detection of brucella melitensis DNA in the milk of sheep after abortion by PCR assay. Arch Med Vet 2008; 40: 141-146.
18. Mantur BG, Amaranth SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. Indian J Med Microbiol 2007; 25: 188-202.
19. Shen MW. Diagnostic and therapeutic challenges of childhood brucellosis in a nonendemic country. Pediatrics 2008; 121: 1178-83.
20. Richtzenhain LJ, Cortez A, Heinemann MB, Soares RM, Sakamoto SM, Vasconcellos SA, and et al. A multiplex PCR for the detection of Brucella spp.and Leptospira spp DNA from aborted bovine fetuses. Vet Microbiol 2002; 87: 139-47.
21. Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP. Single-step PCR for detection of Brucella spp from blood and milk of infected animals. J Clin Microbiol 1995; 33: 3087-90.
22. P Maleknejad, FB Hashemi, B Fatollahzadeh, S Jafari ,H Peeri Dogaheh. Direct Urease test and acridine orange staining on bactec blood culture for rapid presumptive diagnosis of Brucellosis. Iran J Publ Health 2005; 34: 52-55.
23. Esmaeil Zowghi, Abdollah Ebadi, Mehran Yarahmadi. Isolation and identification of Brucella organisms in Iran. Iran J of Clin Infect Dis 2008; 3: 185-188.

Archive of SID

www.SID.ir