

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^۴، وریا حسینی^۵، بهزاد محسن پور^۶، نسرین بهمنی^۷، محمد سعید هخامنشی^۸، کیومرث رشیدی^۹

- ۱- استادیار گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، 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 ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
 - ۴- 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
 - ۶- استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی سنندج، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
 - ۷- استادیار گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی سنندج، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۸۷۱-۶۱۳۱۴۱۲
- 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 علائم مراجعه‌کننده به بیمارستان توحید سنندج نمونه‌گیری از خون انجام گرفت. هر نمونه در محیط کشت خون (BACTEC) تلقیح شده و در شرایط دمایی 37°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 گونه این باکتریها نیز استفاده 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 ۴ 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

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: *amelitensis*

گونه‌های بروسلا کوکوباسیل‌های گرم منفی هستند که به صورت فلور نرمال دستگاه ادراری در حیوانات اهلی مانند گاو، بز، گوسفند، سگ و خوک وجود

بروسلوز می‌باشد که مثبت شدن آن به وسیله آزمایش آگلوتیناسیون سرم تأیید می‌گردد. این تست‌های آگلوتیناسیون بر اساس واکنش آنتی بادیها با لیوپلی 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 لیوپلی ساکارید صاف بروسلا تمایل زیادی به اتصال به باکتریهای گرم منفی دیگر همچون یرسینیا انتروکولیتیکا، ویبریو کلرا، اشرشیا کولی و فرانسیسلا تولرانزیز داشته و همین باعث افزایش اتصال اشتباه یا Cross Reaction بوده که احتمال پاسخ کاذب نیز بالا می‌رود (۷ و ۶). برای جلوگیری از امکان واکنش متقاطع آنتی بادهای IgM، روش 2-mercaptoethanol بر اساس اندازه‌گیری اختصاصی آگلوتینه‌کنندگی آنتی بادهای 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 CO₂، تولید H₂S، رشد در محیط‌های حاوی تاینون 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

گونه ملی تنسیس *canis* و *suis abortus* می‌باشند (۱). گونه 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 جمله آنها روشهای کشت نمونه 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

هوازی از گاز پک C شرکت (Merck) استفاده شد. کلونی‌های رشد کرده از لحاظ شکل، رنگ آمیزی گرم، اوره آز (Merck)، تولید H_2S (Merck)، کاتالاز و اکسیداز بررسی شدند (۱۲ و ۱۱).

استخراج DNA: برای استخراج DNA

از کلونی‌های رشد کرده باکتری روی محیط کشت از روش Boiling استفاده شد. طی این روش چند کلونی را برداشته و در $500 \mu l$ آب دو بار تقطیر حل کرده و در بن ماری در حال جوش به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ در دور $12000 g$ به مدت ۳ دقیقه، $5 \mu l$ 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 -5' CCAGCGCACCATCTTTCAG-3' و

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). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از PCR mix (سیناژن، تهران) بر روی نمونه‌های DNA استخراج شده از خون و همین‌طور 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

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره شانزدهم / پاییز ۱۳۹۰

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 سنجید توسط متخصص عفونی از لحاظ علایمی هم چون تب، لرز و عرق شبانه، بی‌اشتهایی و در بعضی موارد داشتن سابقه قبلی بروسلوز معاینه و تأیید و پس از اخذ رضایت از بیماران خون‌گیری و تست راییت و کومبس راییت انجام گردید (۱۱).

کشت و تست‌های تأییدی: از هر ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون گرفته شده ۵ میلی‌لیتر آن بلافاصله به سیستم محیط کشت BACTEC (BD ایرلند) اضافه شده و به ۵ میلی‌لیتر دیگر آن EDTA اضافه شده و برای استخراج DNA در فریزر نگه‌داری شد. محیط‌های BACTEC در دمای $37^{\circ}C$ 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 $37^{\circ}C$ قرار گرفتند. برای تهیه شرایط کم

رقت‌های ۱/۱۰۰۰۰۰، ۱/۵۰۰۰۰، از رنگ فوشین و یک پلیت به عنوان کنترل بدون رنگ در نظر گرفته شد. پلیت‌های مورد نظر در شرایط ۳۷°C در ۷ درصد CO₂ به مدت ۹۶ ساعت انکوبه شدند. پلیت‌های مورد نظر هر روز مورد بررسی قرار می‌گرفتند (۱۷ و ۱۶).

تست آگلوتیناسیون: در این روش از آنتی سرم‌های A و M برای تشخیص گونه باکتریهای جدا شده استفاده شد (۱۷ و ۱۶).

در این مطالعه عیار تست رایت یک هشتماد 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 گذشت ۱۰ روز از کشت نمونه‌های خون، کلونی‌های مشکوک به بروسلا مشاهده شدند (شکل ۱). پس از انجام رنگ آمیزی گرم و مثبت شدن تست‌های کاتالاز، اکسیداز و اوره آز باکتریهای بروسلا جدا سازی شدند (شکل ۲).



شکل ۲: رنگ آمیزی گرم باکتریهای جدا شده

قرار زیر بود: دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دنا تورا سیون 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 نتیجه PCR از سوش استاندارد Rev-1 خریداری شده از پژوهشکده بیوتکنولوژی تبریز استفاده شد.

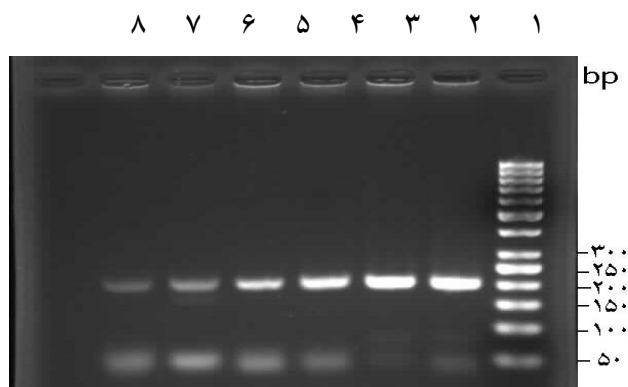
الکتروفورز روی ژل آگاروز: ۱۵ میکرولیتر محلول PCR با ۳ میکرولیتر از بافر الکتروفورز مخلوط و روی ژل قرار داده پس از ۳۰ دقیقه در ولتاژ ۱۱۰، نتیجه بر روی دستگاه ایلومینیتور UV مشاهده و نتایج ثبت گردید (۱۵).

تست مقاومت به رنگ (Dye Tolerance Test): از کشت ۷۲ ساعته 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، ۱/۵۰۰۰۰ و ۱/۲۵۰۰۰ و دو پلیت حاوی BHI آگار و



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

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



شکل ۳: رنگ آمیزی ژل آگاروز با اتیدیوم بروماید. ستون ۱: مارکر وزنی DNA ۵۰ جفت بازی، ستون ۲: سوش Rev-I با محصول ۱۹۷ جفت بازی، ستون ۳، ۴، ۵: باکتری های جدا شده با محصول ۱۹۷ جفت بازی، ستون ۶ و ۷: نمونه های خون با محصول ۱۹۷ جفت بازی، ستون ۸: نمونه *E.coli*

بروسلا در نمونه های خونی بوده و پس از آن کشت خون (۲۸/۵۷٪) می باشد.

نتایج تعیین گونه: برای باکتری های جدا شده تست های مربوط به تعیین گونه انجام شده که نتایج آن در جدول ۱ مشاهده می شود.

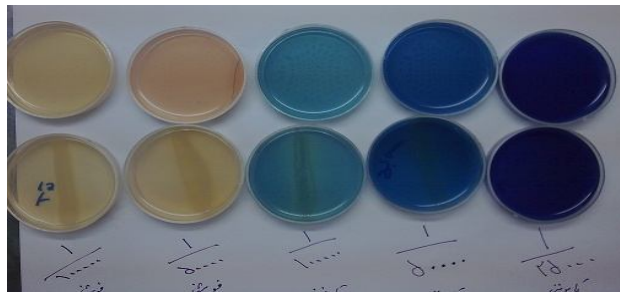
نتایج نمونه گیری: پس از انجام تست های تأییدی بیوشیمیایی و PCR از مجموع ۶۰ نمونه گرفته شده، ۱۸ سویه باکتری بروسلا جدا گردید. در این مطالعه مشخص شد که روش های سرولوژی (۹۵/۲۳٪) و روش PCR (۸۵/۷٪) به ترتیب دارای بیشترین حساسیت در تشخیص

جدول ۱: نتایج تست های تعیین گونه انجام شده برای بروسلای جدا شده از نمونه های خونی بیماران

تست های تعیین گونه	H ₂ S تست تولید	کاتالاز	اکسیداز	نیاز به CO ₂	اوره آز	رشد در رقت های مختلف تاپونین	رشد در رقت های مختلف فوشین
<i>Brucella melitensis</i>	-	+	+	-	+	+	+

فوشین نیز نشان دهنده رشد کل ۱۸ باکتری جدا شده در رقت های مختلف می باشد (شکل ۴).

نتایج تعیین گونه نشان دهنده عدم تولید H₂S و نیاز به CO₂ در هر ۱۸ بروسلای جدا شده بود. نتایج رشد در محیط های حاوی رقت های مختلف از رنگ های تاپونین و



شکل ۴: رقت‌های مختلف تائونین و فوشین از راست به چپ. پلتهای بالایی گروه شاهد و پلتهای پایینی باکتری رشد کرده را نشان می‌دهد.

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 مطالعه 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 بروسلاز استفاده شده است که به میزان ۹۳ درصد در شناسایی بروسلا در بیماران بروسلازی مؤثر بوده است، در حالی که میزان حساسیت روش PCR مورد استفاده در مطالعه حاضر در تشخیص بروسلازی ۸۵/۷٪ 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 رنگ آمیزی 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 نتیجه‌ی این مطالعه نشان داده است که این روش دارای حساسیت بالایی به میزان ۴۲/۲٪ در جداسازی

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 ۱۴ سوش جدا شده جزو بیوار ۱ و چهار سوش جزو بیوار ۳ بروسلا ملی تن سیس می‌باشند.

بحث

بروسلازیس بیماری حیوانات اهلی و وحشی می‌باشد که می‌تواند از طریق مستقیم و غیر مستقیم به انسان نیز منتقل شود. علائم و نشانه‌های بروسلازیس انسانی اختصاصی نیستند (۱۹ و ۱۸). در حقیقت تشخیص بروسلازیس 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 بوسیله روشهای سرولوژی و مولکولی لازم می‌باشد (۲۱ و ۲۰). 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

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 ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شده که نویسندگان این مقاله بدین وسیله تشکر و قدردانی خود را از این گروه ابراز می‌دارند.

بروسلا از خون می‌باشد (۲۲)، که نسبت به نتیجه کشت مطالعه 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 ارگانسیم‌های 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 مطالعه ما کل باکتریهای جدا شده

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. Specific 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 Esmail 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.

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.