

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

Naseri Z<sup>1</sup>, Yousef Alikhani M<sup>2</sup>, Hashemi H<sup>3</sup>, Arabestani MR<sup>4\*</sup>

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 Jun 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

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

زهرا ناصری<sup>1</sup>، محمد یوسف علیخانی<sup>2</sup>، سید حمید هاشمی<sup>3</sup>، محمد رضا عربستانی<sup>4\*</sup>

- 1- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، پایگاه همدان، ایران
- 2- دانشیار، گروه میکروبی 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 میکروبی 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 بیماری های شایع زئونوز محسوب می شود و استان همدان یکی از مناطق اندمیک این بیماری است. هدف از این مطالعه جداسازی بروسلا از بیماران بروسلوزیس و تعیین گونه های این باکتری به منظور بررسی شیوع این سویه ها بود.

**مواد و روش ها:** این مطالعه از نوع مقطعی - توصیفی بود و از 50 بیمار مشکوک به بروسلوز و دارای علائم بالینی نمونه گیری از خون انجام شد. هر نمونه در محیط کشت خون BACTEC به مدت 14 روز تحت بررسی قرار گرفت. سپس، نمونه ها روی محیط بروسلا آگار کشت داده شد و برای تشخیص باکتری های رشد کرده، از آزمون های بیوشیمیایی استفاده گردید. در مرحله بعد آزمون PCR جهت تأیید و تعیین گونه های بروسلا انجام شد.

**یافته ها:** 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 روش PCR تأیید گردید. توسط PCR مستقیم روی نمونه های خون (22 درصد) 11 مورد مثبت شدند که تمام موارد کشت مثبت توسط PCR نیز شناسائی شدند. پس از انجام آزمون های بیوشیمیایی و PCR، بروسلا ملی تنسیس به عنوان گونه باکتری های جدا شده، شناخته شد.

**نتیجه گیری:** در این مطالعه تکنیک PCR برای تشخیص گونه های بروسلا در مقایسه با روش های معمول باکتری شناسی مورد ارزیابی قرار گرفت. این مطالعه نشان می دهد 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 میکروبی شناسی، مرکز تحقیقات بروسلوز

Email: mohammad.arabestani@gmail.com

## مقدمه

بروسلوز بیماری عفونی مشترک بین انسان و حیوان (زئونوز) می باشد که توسط باکتری های داخل سلولی اختیاری از جنس بروسلا ایجاد می شود. چهار گونه این باکتری شامل بروسلا سویس، کنیس، آبورتوس و ملی تنسیس در ایجاد بیماری در انسان حائز اهمیت می باشند 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 می باشد. راه عمومی انتقال به سه روش تماس مستقیم با دام آلوده، مصرف محصولات لبنی آلوده و استنشاق (به ندرت) است که جزء بیماری های مرتبط با شغل و حرفه نیز محسوب می شود (3-1). در ایران بیماری بیشتر در قسمت های مرکزی و غربی کشور شایع بوده و به شکل آندمیک می باشد. شیوع بالای عفونت به ترتیب در همدان 5/107، کردستان 5/83، آذربایجان غربی 4/71، زنجان 1/67 در هر 100000 نفر جمعیت می باشد (4).

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

به علت نبود علائم اختصاصی در این بیماری و شباهت علائم آن به بیماری های دیگر و همچنین سخت رشد بودن باکتری بروسلا تشخیص این بیماری مشکل می باشد و تشخیص قطعی این بیماری در موقعی است که بروسلا از خون، مغز استخوان یا سایر بافت ها جدا گردد،

میزان جداسازی بسته به روش مورد استفاده از 15 تا 90 درصد متغیر می باشد (6).

به علت مشکلاتی که در تشخیص این بیماری وجود دارد، روش های مختلفی در رابطه با انتخاب بهترین روش برای تشخیص مورد بررسی قرار گرفته و مقایسه این روش ها که شامل آزمایشات مختلف سرولوژیکی، کشت و PCR می باشد، نتایج مختلفی در برداشته است (7). چندین روش متداول برای تشخیص بیماران بروسلوزیس استفاده می گردد که از جمله آنها روش های کشت نمونه خون بیمار می باشد که حساسیت آن به میزان 53 تا 90 درصد متغیر است (3). از روش های دیگر می توان به انواع آزمون های PCR، الایزا و آگلوتیناسیون اشاره کرد. در هنگام عدم وجود شرایط کشت برای تشخیص بروسلوز به طور معمول از روش های سرولوژیکی و تست های آگلوتیناسیون استفاده می شود. 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 (8-10).

برای تعیین گونه های بروسلا از روش های کلاسیک مانند تست اوره آز، نیاز به CO<sub>2</sub>، رشد در محیط های حاوی تیونین و فوشین، تولید H<sub>2</sub>S، آگلوتیناسیون توسط آنتی سرم و از روش های مولکولی می توان به PCR اشاره کرد (2، 3).

اکثر مطالعاتی که در کشور ما بر روی بروسلوز صورت گرفته است، مطالعات سرو اپیدمیولوژیکی می باشد 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 مطالعه ای جامع با استفاده از روش های پیشرفته کشت BACTEC و PCR خون جهت تشخیص و تعیین گونه های بروسلا انجام گیرد.

## مواد و روش ها

## نوع مطالعه و جمعیت مورد مطالعه:

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، 50 فرد مشکوک به بروسلاز با تست های سرولوژیک مثبت و علائم بالینی که در بخش عفونی بیمارستان فرشیچان 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. نمونه خون گرفته شده از بیماران به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان ارسال گردید.

## کشت خون با استفاده از دستگاه BACTEC و شناسایی باکتری های جدا شده با آزمون های بیوشیمیایی

ابتدا از بیماران مشکوک به بروسلاز 5 الی 7 میلی لیتر 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 نمونه هایی 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 سانتی گراد به مدت 3 روز انکوبه گردید. در مرحله بعد باکتری های جدا شده از کشت خون با استفاده از رنگ آمیزی گرم (کو کوباسیل گرم منفی) و تست های بیوشیمیایی استاندارد (اکسیداز، کاتالاز، اوره از، تولید گاز H<sub>2</sub>S و رشد بر روی محیط های حاوی رنگ های 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 در آورده 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 اندازه گیری گردید. جهت استخراج DNA از نمونه های خون از کیت استخراج DNA شرکت بایونر استفاده گردید.

## تایید باکتری های بروسلائی 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 می شوند. این ژن یک پروتئین غشائی 31 کیلو دالتونی بروسلا آورتوس را رمزدهی می کند که اختصاص جنس بروسلا بوده و در تمام سویه ها و بیواریان های بروسلا وجود دارد (5-13). جهت انجام واکنش PCR از DNA سویه استاندارد بروسلا آورتوس 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).

جدول 1. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه جهت شناسایی جنس و گونه های بروسلا

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

## تعیین گونه های بروسلا با PCR

تمام مواردی که در کشت مثبت شده بودند و هم چنین مواردی که کشت آنها منفی ولی نتیجه PCR مستقیم روی نمونه های خون مثبت بودند، برای تعیین گونه بروسلا، از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی گونه بروسلا ملی تنسیس و بروسلا آبورتوس (جدول 1) استفاده گردید (13-15). برای نمونه های کشت مثبت از DNA استخراج شده باکتری استفاده شد ولی برای نمونه هایی 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 بافر مخلوط و به درون چاهک های 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 داده ها با کمک نرم افزار SPSS نسخه 14 مورد آنالیز قرار گرفت.

## یافته ها

## نتایج کشت خون

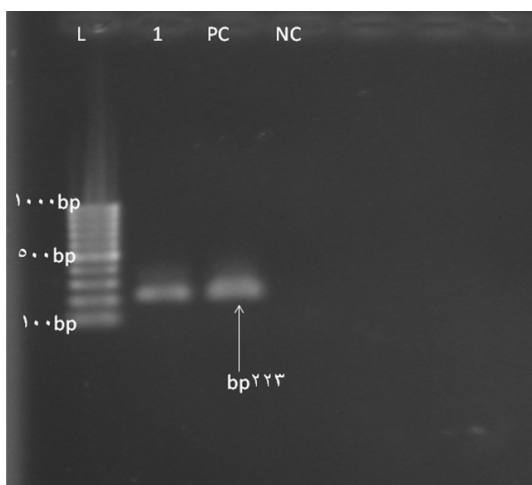
از 50 فرد مشکوک به بروسلاز توسط کشت خون، 7 نمونه باکتری بروسلا جداسازی و شناسائی گردید. تمام ویال های کشت خون که توسط دستگاه BACTEC از نظر رشد باکتری مثبت اعلام شده بود بر روی محیط بروسلا آگار کشت داده شد. کلنی های مشکوک به بروسلا همگی به صورت کوکوباسیل گرم منفی مشاهده شدند و هم چنین از نظر آزمایش اوره آز، تست کاتالاز، اکسیداز، مثبت بودند. تمام ویال های 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 و جداسازی باکتری در تحقیق حاضر 2 روز و حداکثر زمان لازم 5 روز بود (جدول 2).

## جدول 2. نتایج کشت با دستگاه BACTEC و محیط کشت

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

## نتایج PCR نمونه ها

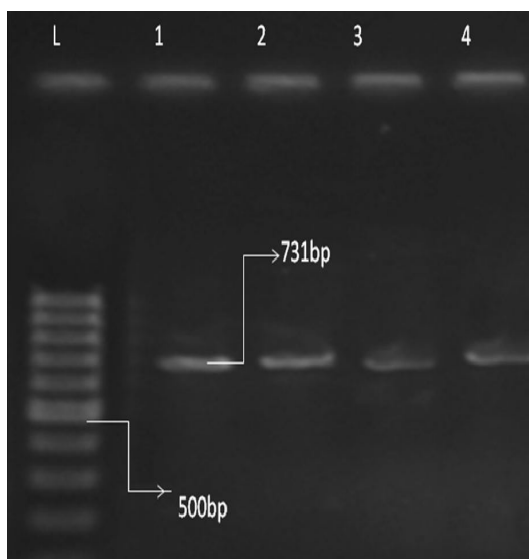
نتایج به دست آمده از PCR نمونه ها، نشان دهنده شناسایی و تشخیص بروسلاهای جدا شده از بیماران می باشد (شکل 1). از مجموع 50 نمونه گرفته شده 7 سویه باکتری بروسلا (14 درصد) توسط کشت جدا و با PCR تایید گردیدند. توسط PCR مستقیم روی نمونه های خون 11 مورد (22 درصد) مثبت شدند که تمام موارد کشت مثبت توسط PCR نیز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



شکل 1. الکتروفورز محصول PCR حاصل از نمونه های خون توسط پرایمرهای اختصاصی جنس بروسلا حاوی باند 223 bp: L: مارکر، ستون 1: نمونه بالینی مثبت، ستون 2 (PC): کنترل مثبت، ستون 3 (NC): کنترل منفی

## نتایج PCR و روش های بیوشیمیایی در تعیین گونه

تمام باکتری های جدا شده از کشت خون و هم چنین نمونه هایی که PCR مستقیم روی آنها نتایج مثبت نشان دادند، با پرایمرهای اختصاصی بروسلا ملی تنسیس و



شکل 2. الکتروفورز محصول PCR حاصل از باکتری های جدا شده با پرایمرهای اختصاصی بروسلا ملی تنسیس حاوی باند 731bp: L: مارکر، ستون 1 الی 4 نمونه های حاصل از PCR قطعه مورد نظر جهت شناسایی بروسلا ملی تنسیس

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 (شکل 2). نتایج به دست آمده برای 7 سویه باکتری جدا شده با روش های بیوشیمیایی در جدول 3 آمده است.

جدول 3. نتایج تست های تعیین گونه انجام شده برای بروسلاهای جدا شده از نمونه های خونی بیماران

تست های تعیین گونه	تولید H <sub>2</sub> S	کاتالاز	اکسیداز	اوره از	نیاز به CO <sub>2</sub>	رشد در رقت های مختلف تایونین و فوشین
بروسلا ملی تنسیس	منفی	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	مثبت

## بحث

مطالعه نشان می دهد، 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 می گردد 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 بروسلاز در مرحله مزمن بیماری بروسلاز باشند و در این مرحله از بیماری جداسازی باکتری از بیمار بسیار مشکل می باشد. در مطالعه ای که توسط سارا و ویناس انجام شد آنها توانستند از 92/5 درصد بیماران واقع در فاز حاد بیماری بروسلاز 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 بروسلاز از آنتی بیوتیک استفاده کرده باشند و استفاده از

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). هم چنین در مطالعه دیگری رز و همکاران توانستند با استفاده از دستگاه BACTEC 9120 در طی 7 روز انکوباسیون 16 باکتری از 17 بیمار جداسازی نمایند (16). در مطالعه ای مشابه توسط دکتر پیری و همکاران با استفاده از دستگاه BACTEC 9120 از 102 بیمار طی 7 روز انکوباسیون 41 مورد کشت مثبت جدا شد (3). همان گونه که نتایج این

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 PCR جدا گردید و با تست های بیوشیمیایی و PCR تعیین 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 داد که روش‌های تشخیصی جدید بروسلا از جمله روش‌های مولکولی مانند روش PCR از حساسیت، اختصاصیت، سرعت بالاتری نسبت به روش‌های کشت برخوردار می‌باشند. هم چنین در روش‌های مولکولی خطر آلودگی کارکنان آزمایشگاه به حد قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت آموزشی و پژوهشی 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-DoGahneh H, AmirZargar A, Jafari S, Fatollahzadeh B. Diagnosis of brucellosis by use of bactec blood

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 می‌باشد، 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 تیترا بالاتری از نظر آنتی بادی‌های ضد بروسلوز داشتند برای مثال بالاتر از 1/320 و یا افرادی که تیترا 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 اول 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 هیچ گونه باکتری بر روی محیط‌های 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 تایینگ 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 نسبتاً خوب دستگاه BACTEC، با توجه به مدت زمان تقریباً طولانی (آلی 2 هفته انکوباسیون) و نیاز به کشت‌های مجدد جهت تشخیص جنس و گونه باکتری‌های مورد نظر، روش‌های مولکولی از جمله روش‌های 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

- 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.