

# Brusellozun Hızlı Tanısında Flöresan İn-Situ Hibridizasyon Yönteminin Önemi

## Significance of Fluorescent In-Situ Hybridization Method in Rapid Diagnosis of Brucellosis

Dr. Hörü GAZİ,<sup>a</sup>  
Dr. Süreyya Gül YURTSEVER,<sup>b</sup>  
Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU,<sup>a</sup>  
Dr. Sibel EL,<sup>c</sup>  
Pinar ERTURAL<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji AD,  
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Manisa

<sup>b</sup>Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü,  
Bakteriyoloji Laboratuvarı

<sup>c</sup>Enfeksiyon Hastalıkları ve  
Klinik Mikrobiyoloji,  
İzmir Atatürk Eğitim ve  
Araştırma Hastanesi, İzmir

Geliş Tarihi/Received: 29.03.2010  
Kabul Tarihi/Accepted: 17.12.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:

Dr. Hörü GAZİ  
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Manisa,  
TÜRKİYE/TURKEY  
horugazi@hotmail.com

**ÖZET Amaç:** Bruselloz, tüm dünyada yaygın olarak görülen, insanlarda ciddi hastalık ve büyük ekonomik kayıplara neden olan bir zoonozdur. Günümüzde, bruselloz tanısında kullanılan klasik tanı yöntemlerinin geç sonuç vermesi ve duyarlılığını etkileyen faktörlerden dolayı, hastalığın saptanmasında hızlı ve duyarlılığı yüksek tanı yöntemlerine giderek daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda, bruselloz tanısında farklı klinik örnekler kullanarak kısa sürede sonuç veren çok sayıda moleküler tanı testi değerlendirilmiştir. Ancak tanı ve tedavisi açısından zor bir enfeksiyon olarak nitelendirilen brusellozun saptanmasında yeterli duyarlılık ve özgüllüğe sahip, optimizasyonu tamamlanmış, rutinde uygulanabilir bir moleküler yöntem henüz bulunmamaktadır. Flöresan in situ hibridizasyon (FISH), identifikasyon süresini kısaltarak pozitif sinyal veren hemokültür şişelerinden *Brucella* spp.'yi saptayabilen yeni bir moleküler tanı yöntemidir. Bu çalışmada, bruselloz tanısında FISH tekniğinin konvansiyonel kültür yöntemi ile karşılaştırılması ve rutin uygulanabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Gram boyama yapıldıktan sonra, bruselloz şüphesi ile başvuran ve her biri farklı hastaya ait 100 hemokültür örneği eş zamanlı FISH ve konvansiyonel kültür yöntemleri ile çalışılmıştır. FISH sonuçlarının yorumlanmasında standart Wright's tüp aglütinasyon (STA) testi de kullanılmıştır. **Bulgular:** Çalışmaya dahil edilen örneklerin 43'ü kültür, 52'si STA, 44'ü FISH pozitif olarak değerlendirilmiştir. Kültür pozitif örneklerin 34'ü, STA pozitif örneklerin 29'u FISH yöntemi ile *Brucella* spp. olarak yorumlanmıştır. Altın standart yöntem olan kültür ile birlikte değerlendirildiğinde FISH yönteminin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %79.0, %82.4, %77.2 ve %83.9 olarak belirlenmiştir. **Sonuç:** FISH fazla ekipman gerektirmeyen, hızlı ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Ancak duyarlılığın istenen düzeyde olmamasından dolayı, maliyet etkin rutin tanı aracı olarak kullanılamayacağı, kullanılması gereken durumlarda ise FISH negatif örneklerin mutlaka kültür ve/veya serum tüp aglütinasyon testi ile doğrulanmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Bruselloz; tanı; kültür; in situ hibridizasyon, flöresans

**ABSTRACT Objective:** Brucellosis is a zoonosis commonly seen worldwide it causes severe disease and great economic loss. Rapid and sensitive tests are increasingly required for detection of the disease since currently used conventional diagnostic methods give results late and there are some factors affecting its sensitivity. Recently, a number of diagnostic tests have been determined that use different clinical samples in order to diagnose brucellosis in a short time. However a sufficiently sensitive and specific, optimized, routinely applicable molecular method is still lacking for detection of brucellosis which is defined as a difficult infection in terms of diagnosis and treatment. Fluorescent in situ hybridization (FISH) is a novel molecular diagnostic method that can detect *Brucella* spp. from hemoculture tubes signaling positively by shortening identification time. In this study, we aimed to compare FISH technique with conventional culture method in diagnosis of brucellosis and to investigate its use routinely. **Material and Methods:** A total of 100 hemoculture samples of patients who applied with the suspicion of brucellosis were studied with FISH and culture methods concurrently, after gram staining. Standard Wright's tube agglutination (STA) test was also used for interpretation of the FISH results. **Results:** Of the tested samples, 43 studied with cultures, 52 with STA and 44 with FISH were found positive. The FISH detected *Brucella* spp. in 34 positive cultures and in 29 STA positive sample. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of FISH method were found as 79.0%, 82.4%, 77.2% and 83.9% respectively when evaluated together with culture which is the gold standard method. **Conclusion:** FISH is a rapid and easily applicable method not requiring much equipment. However, it was concluded that it could not be used as a cost-effective diagnostic tool as it was not as sensitive enough as desired, and in case of it is used, it would be useful to confirm FISH negative samples with culture and/or serum tube agglutination test.

**Key Words:** Brucellosis; diagnosis; culture; in situ hybridization, fluorescence

doi:10.5336/medsci.2010-18295

Copyright © 2011 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31(4):923-7

**B**ruselloz, uzun yıllardan beri yürütülmekte olan eradikasyon mücadelelerine rağmen, özellikle Güney Avrupa ülkelerinde, Orta Doğu, Batı Asya'nın gelişmekte olan ülkelerinde, Hint Yarımadası, Afrika, Orta ve Güney Amerika'nın bir kısmında hâlâ bir sağlık sorunu olarak önemini korumaktadır. Her yıl binlerce insan hastalığa yakalanmakta ve hastalık insanlarda fiziksel yetersizliğe ve iş gücü kaybına neden olmaktadır. Ülkemizde de önemli bir sağlık sorunu olan bruselloz her yaş ve cinste görülmektedir.<sup>1,2</sup>

Bruselloz tanısında geleneksel olarak uygulanan kültür ve serolojik tanı yöntemleri hala "altın standart" olmayı sürdürmektedir.<sup>3</sup> Ancak klasik tanı yöntemlerinin geç sonuç vermesi ve duyarlılığını etkileyen faktörlerden dolayı hastalığın saptanmasında hızlı ve duyarlılığı yüksek tanı yöntemlerine, giderek daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda kısa sürede sonuç veren moleküler tanı yöntemlerinin pratiğe girmiş olması bruselloz tanısında da uygulanmalarına yol açmıştır. Ancak tanı ve tedavisi açısından zor bir enfeksiyon olarak nitelendirilen brusellozun saptanmasında yeterli duyarlılık ve özgüllüğe sahip, optimizasyonu tamamlanmış, rutinde uygulanabilir bir moleküler yöntem henüz bulunmamaktadır.<sup>4</sup>

Bu araştırmanın amacı, brusellozun hızlı tanısında yeni bir hibridizasyon yöntemi olan floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği ile konvansiyonel kültür yöntemini karşılaştırarak, yeni yöntemin uygulanabilirliğini ve tanısal değerini araştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### HASTA GRUBU

Araştırmaya, Aralık 2007-Eylül 2009 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi ve İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları kliniklerine bruselloz şüphesi ile başvuran 100 hasta dahil edilmiştir. Çalışma protokolü Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Bruselloz ön tanısı ile başvuran hastalardan alınan kan örnekleri otomatize kan kültür sistemi

(BACTEC 9120, Becton Dickinson) şişelerine inoküle edilerek bir hafta süreyle inkübe edilmiştir. Üreme sinyali saptandıktan veya inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra tüm hemokültür örneklerinden iki adet çikolata ve birer adet %5 koyun kanlı ve eosin metilen blue agar (EMB) besiyerlerine (Oxoid, UK) subkültür yapılmıştır.

Çikolata besiyerlerine yapılan pasajlardan biri %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda, diğer plaklar ise aerob ortamda 48-72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Kültürde üreyen ve gram negatif boyanma özelliği gösteren kokobasil şeklindeki bakterilerin *Brucella* spp. olarak tanımlanması için standart mikrobiyolojik yöntemler kullanılmıştır.<sup>5</sup> Tür düzeyinde identifikasyon yapılmamıştır. Hastaların serolojik göstergeleri standart tüp aglutinasyon testi (STA, Wright testi) ile değerlendirilmiştir. 1/160 ve üzerindeki dilüsyonlarda aglutinasyonun izlenmesi pozitif olarak kabul edilmiştir.<sup>5</sup>

### FISH YÖNTEMİ

Gram boyalı preparat ve subkültür yapıldıktan sonra tüm hasta örnekleri FISH (SeaFAST, Brucella Combi kit, Hungary) yöntemi ile çalışılmıştır. Uygulamalarda pozitif kontrol olarak kültürde üretilmiş ve biyokimyasal yöntemlerle doğrulanmış *Brucella* spp.; negatif kontrol olarak *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları kullanılmıştır.

Çalışma prosedürü kısaca aşağıdaki gibidir: a) Steril enjektör ile hemokültür şişelerinden alınan 200 ml örnek iki dakika 2000 rpm'da santrifüj edilmiştir b) Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra, çöktelden alınan 2 ml örneğin üzerine 11 ml PBS eklenmiştir c) Elde edilen karışımdan 10 ml örnek seaFAST cam slayt kuyucukların üzerine damlatılmıştır d) Slaytlar 45°C'de beş dakika inkübe edildikten sonra 10 dakika etil alkol içinde bekletilmiştir e) Çalışma prosedürüne uygun olarak hazırlanmış DNA hibridizasyon solüsyonundan 10 ml lamlara yayılmıştır f) Slaytlar 48°C'de 90 dakika bekletilerek kurutulmuştur g) İnkübasyon sonrası lamlar önceden 46°C'ye kadar ısıtılmış yıkama solüsyonu ile 2 x 15 dakika yıkanmıştır h) Lamlar PBS ile iki dakika durulandıktan sonra kurutulmuş ve 10 ml anti-fading medyum ilave edilerek floresan mikroskop altında incelenmiştir.

## İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmanın verileri SPSS 11. 5 (SPSS INC, Chicago, IL, USA) istatistik paket programında değerlendirilmiştir. Araştırma kapsamında tanımlayıcı nitelikler, farklı tanı testlerinin pozitif ve negatif sonuçları yüzde dağılımı şeklinde sunulmuştur. Bruselloz tanısında altın standart yöntem olarak kültür kabul edilerek FISH yönteminin geçerliliği ve tutarlılığı değerlendirilmiştir. Geçerlilik için duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler elde edilmiştir. Tutarlılık için gözlenen tutarlılık, Kappa değeri ve Kappa değerinin istatistiksel önemlilik testi kullanılmıştır.

## BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen olguların demografik özellikleri değerlendirildiğinde 35'inin kadın, 65'inin erkek, yaş ortalamalarının ise  $42.2 \pm 18.9$  yıl olduğu saptanmıştır. Bruselloz ön tanısı ile başvuran hastalardan alınan kan örneklerinin 44'ü FISH pozitif, 43'ünün *Brucella* spp. için kültür pozitif olduğu saptanırken, 34 örnek her iki yöntemle bruselloz yönünden olumlu olarak değerlendirilmiştir. Hemokültür şişelerinden yapılan subkültürlerde *Brucella* spp. üreyen 43 hastanın dokuzu (%20.9) FISH negatif olarak değerlendirilirken, kültür negatif olan 57 hastanın 10'unda (%17.5) FISH yöntemi ile pozitif sonuç elde edilmiştir. Kültür altın standart kabul edilerek değerlendirildiğinde, FISH'in duyarlılığı % 79.0, özgüllüğü %82.4, pozitif prediktif değer (PPD) %77.2, negatif prediktif değer (NPD) %83.9 olarak belirlenmiştir. Hastaların serolojik göstergeleri göz önünde bulundurulduğunda ise, kültür pozitif 10 hastadan serum tüp aglütinasyon testi (STA) istenmemiş olup, STA istenen 90 hastanın 52'sinde antikor titrelerinin 1/160 veya üzerinde olduğu saptanmıştır. STA testi olumlu olan 52 hastanın 29'unun (%55.8), STA negatif 38 hastanın

sekizinin (%21.1) FISH ile pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. *Brucella* spp. için kültür ve FISH negatif olan 47 hastanın 19 (%40.4)'unda STA testi pozitif olup, kültür ve FISH pozitif 34 hastanın sadece üçünde (%8.8) STA'nın negatif olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan yöntemler ile elde edilen sonuçlar ve gözlenen tutarlılık oranları Tablo 1'de verilmiştir. Konvansiyonel yöntemler ile elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, STA ve/veya kültür pozitif 67 hastanın 28'inde FISH'in negatif olduğu; her iki yöntemle negatif olan 33 hastanın beşinde FISH'in pozitif sonuç verdiği saptanmıştır.

## TARTIŞMA

Bruselloz ülkemizde sık görülen ve bildirimi zorunlu bir hastalık olmasına rağmen gerçek insidansına, tanı ve tedavisine ilişkin veriler yeterli düzeyde değildir.<sup>6</sup>

Brusellozun kesin tanısı bakterilerin kültürden izolasyonu ile yapılmaktadır. Ancak kullanıma giren yeni otomatize kültür tekniklerine rağmen bruselloz şüphesi ile başvuran hastaların büyük bir kısmında bakteri üretilmemektedir. Bu nedenle, birçok laboratuvar da bruselloz tanısında serolojik testlere daha sık başvurulmaktadır.<sup>7-10</sup>

Günümüzde, STA başta olmak üzere, Coombs testi ve Enzyme Immune Assay (EIA) brusellozun serolojik tanısında yaygın olarak kullanılmalarına rağmen henüz altın standart olarak kabul edilen serolojik bir yöntem bulunmamaktadır.<sup>3,4,7,8</sup>

Son yıllarda mikrobiyolojinin birçok alanında olduğu gibi bruselloz tanısında da hibridizasyon ve amplifikasyon temelli moleküler tanı kitleri konvansiyonel yöntemlere alternatif olarak kullanılmaya çalışılmaktadır. Farklı araştırmacılar tarafından duyarlılıkları %50-100 arasında bildirilen bu

**TABLO 1:** Kullanılan yöntemlerle elde edilen sonuçların karşılaştırılması n (%).

	Uyumlu sonuçlar		Uyumsuz sonuçlar		Gözlenen tutarlılık	Kappa değeri	P değeri
	Pozitif	Negatif	+/-	-/+			
Kültür/FISH	34 (34.0)	47 (47.0)	9 (9.0)	10 (10.0)	%81.0	0.614	0.000
*STA/FISH	29 (32.2)	30 (33.3)	23 (25.6)	8 (8.9)	%66.0	0.330	0.001

STA: serum tüp aglütinasyon testi, FISH: flöresan in situ hibridizasyon, \*STA sonuçları 90 hasta üzerinden değerlendirilmiştir.

testlerde en çok bcs31, omp2, 16S rRNA ve IS711 bölgeleri hedef alınmaktadır. Ancak, duyarlılık ve özgüllüklerinin laboratuvarlar arasında farklılıklar göstermesi ve standart çalışma protokollerinin oluşturulamaması bu tekniklerin kullanımını kısıtlamaktadır.<sup>4,9,10,11</sup>

Bu çalışmada kültür yöntemi altın standart kabul edilerek, bruselloz tanısında FISH'in geçerliliği ve rutin kullanılabilirliği hastaların serolojik göstergeleri eşliğinde değerlendirilmiştir. Hedef nükleik asit izolasyonuna ve amplifikasyonuna ihtiyaç duyulmayan bu yöntemde, *Brucella*'ların ribozomal RNA dizilerine uygun flöresan boya ile işaretli problar kullanılarak birkaç saat gibi kısa sürede bakterilerin cins düzeyinde identifikasyonu yapılabilmektedir.

Almanya'da Wellinghausen ve ark., iki farklı prob kullanarak hibridizasyon temelli bir tanı kiti olan FISH'i, 33 hemokültür örneği kullanarak değerlendirmişler ve örneklerin 31'nin Eub 338 ile diğer iki örneğin de Bru 996 probu ile flöresans verdiğini saptamışlardır.<sup>12</sup> *Ochrobactrum anthropi* ile yalancı pozitif sonuçları önlemek için işaretli KBru 996 probu kullanıldığı belirtilen bu çalışmada, Bru 996 probu ile pozitif olarak değerlendiren örneklerin FISH ile eş zamanlı yapılan subkültürlerinde *B. melitensis*, Eub 338 probu ile pozitif sonuç veren örneklerin kültürlerinde ise enterik ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi non fermentatif bakterilerin ürediği saptanmıştır.

Aynı çalışmada, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* ve *B. neotomae* ait olmak üzere toplam 17 ATCC suşunun FISH ile doğru tanımlandığı bildirilmiştir (duyarlılık ve özgüllük %100) ve amplifikasyon gerektirmemesinin yanı sıra ucuz olmasından dolayı FISH'in bruselloz tanısında yararlı bir yöntem olabileceği belirtilmiştir.<sup>12</sup>

Çalışmamızda, FISH için elde edilen duyarlılık ve özgüllük oranları (%79.0-82.4) Wellinghausen ve ark. tarafından bildirilen oranlara göre daha düşük bulunmuştur.<sup>12</sup>

Bu sonuçların, kullanılan probların özgüllüğünden veya uygulama farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. FISH sonuçları, ülkemizde bruselloz tanısında sık kullanılan STA

ile karşılaştırıldığında, FISH'in kültür ile uyumunun STA'ya kıyasla daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, konvansiyonel yöntemler ile elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, STA ve/veya kültür pozitif hastaların %42'sinde FISH'in negatif sonuç verdiği saptanmıştır. Bu nedenle bruselloz şüphesi ile başvuran hastaların laboratuvar tanısında FISH'in tek başına maliyet etkin rutin moleküler testi olarak kullanılamayacağı, kullanılması gereken durumlarda ise FISH negatif örneklerin mutlaka kültür ve/veya STA ile doğrulanmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.

*Brucella*'ların cins ve tür düzeyinde identifikasyonuna yönelik, Fernandez-Lago ve ark., *Brucella abortus*'un 16S rRNA dizilerine özgü işaretli problar kullanarak ve oluşan flöresansın flow cytometri ile saptanması temeline dayanan bir hibridizasyon yöntemi geliştirmişlerdir.<sup>11</sup> Araştırmacılar, *Brucella* cinsine ait bakterilerinin yanı sıra bu bakteriler ile filogenetik yakınlığı olan *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum*, *Mycoplana*, *Phyllobacterium* ve *Brucella* ile serolojik çapraz reaksiyonlara neden olan çeşitli enterik bakterileri çalışmaya dahil ederek, kullanılan problarla farklı *Brucella* türlerinin tanımlanabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmada, *Brucella* spp. ile serolojik çapraz reaksiyonlara sebep olan bakterilerin hiçbirinde flöresans saptanmadığı, filogenetik yakınlık gösteren bakterilerin ise kullanılan yöntemle *Brucella*'dan ayırt edilemediği vurgulanmıştır. Bu sonuçların ışığında, araştırmacılar *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum* ile oluşan enfeksiyonların çok yaygın görülmemesi ve bu tür bakterilerin daha çok fırsatçı enfeksiyonlara neden olmalarından dolayı, bruselloz düşünülen olgularda bu yöntemin kullanılabilceğini savunmuşlardır.

Çalışmamızda, serolojik çapraz reaksiyonlara neden olan bakteriler ile oluşan yanlış pozitif sonuçları önlemek için *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşları kullanılırken, *Brucella* ile filogenetik yakınlığı olan bakteriler için herhangi bir değerlendirme yapılamamıştır. Bununla birlikte, günümüzde bu ayırımın sadece sekans analizleri ile mümkün olabileceği birçok çalışmada bildirilmiştir.<sup>4,13,14</sup>

Sonuç olarak, bu çalışmanın verileri ve ilgili literatür genel olarak değerlendirildiğinde, FISH'in amplifikasyon gerektirmemesi, PCR'a göre maliyetinin düşük olması, direkt hemokültür şişelerine uygulanabilmesi ve klasik kültür yöntemi

mine göre daha kısa sürede sonuç vermesi gibi avantajlarının olmasına rağmen, rutin moleküler tanı aracı olarak kullanılabilirliğini destekleyenleri çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2006; 6(2):91-9.
- Russo G, Pasquali P, Nenova R, Alexandrov T, Ralchev S, Vullo V, et al. Reemergence of human and animal brucellosis, bulgaria. *Emerg Infect Dis* 2009;15(2):314-6.
- Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(12):775-86.
- Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4(1):115-23.
- Young EJ. Brucella species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5<sup>th</sup> ed. Edinburg: Churchill Livingstone; 2000. p.2386-93.
- Demiroğlu YZ, Turunç T, Alişkan H, Colakoğlu S, Arslan H. [Brucellosis: retrospective evaluation of the clinical, laboratory and epidemiological features of 151 cases]. *Mikrobiyol Bul* 2007;41(4):517-27.
- Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol* 2010;140(3-4):392-8.
- Bogdanovich T, Skurnik M, Lübeck PS, Ahrens P, Hoorfar J. Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus Brucella. *J Clin Microbiol* 2004;42(5): 2261-3.
- Kattar MM, Zalloua PA, Araj GF, Samaha-Kfoury J, Shbaklo H, Kanj SS, et al. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59(1):23-32.
- Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol* 2002;90(1-4):435-46.
- Fernández-Lago L, Vallejo FJ, Trujillano I, Vizcaino N. Fluorescent whole-cell hybridization with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify Brucella spp. by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 2000;38(7):2768-71.
- Wellinghausen N, Nöckler K, Sigge A, Bartel M, Essig A, Poppert S. Rapid detection of Brucella spp. in blood cultures by fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2006;44(5):1828-30.
- Gee JE, De BK, Levett PN, Whitney AM, Novak RT, Popovic T. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of Brucella isolates. *J Clin Microbiol* 2004;42(8):3649-54.
- Bohlin J, Snipen L, Cloeckaert A, Lagesen K, Ussery D, Kristoffersen AB, et al. Genomic comparisons of Brucella spp. and closely related bacteria using base compositional and proteome based methods. *BMC Evol Biol* 2010;10:249.