مروری بر روشهای تشخیص سرولوژی و آلرژیک بروسلوز

گردآوری: دکتر عسگر زینالی - عضو هیأت علمی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه ارومیه

چکیده

بهترین روش اثبات بیماری بروسلوز، کشتهای مثبت بوده ولی تستهای سرولوژیکی نیز نقش مهمی را در تشخیص بروسلوز بازی می‌کنند. CFT حساس و اختصاصی‌تر از SAT است، ولی ELISA حساستر از CFT می‌باشد. RBT برای سوندآژ گله‌ها، بهترین روش می‌باشد و IgG1-ELISA برابر MRT حساس است. Bercovich & Terlack میزان حساسیت به تست جلدی DTH، را ۸۱ درصد گزارش کرده‌اند ما عدد ۶۰٪ را به دست آوردیم و درصد موارد مثبت این تست در ۱۰/۵ ماه بعد از واکسیناسیون با Rev.1 حدود ۶/۵ برابر SAT شد.

مقدمه

بروسلوز از بیماریهای مشترک بین انسان و دام است که کنترل آن در انسان به شیوع بیماری در دیگر حیوانات بستگی دارد (۲۴). این بیماری باید با تشخیص و کشتار حیوانات مبتلا یا راکتور[1] و یا با واکسیناسیون کنترل شود (۱۱). تشخیص صحیح بیماری بروسلوز به تاریخچهٔ گله و اطلاعات فردی بستگی داشته و علاوه بر علائم بالینی، بر یافته‌های آزمایشگاهی نیز استوار است و آزمایشات سرمی، باکتریایی و آسیب‌شناسی ممکن است ضروری باشند (۱۴). تستهای آلرژیک جلدی، به تشخیص کمک کرده و اغلب دامهای آلوده را مشخص می‌نمایند (۱۰). بروسلاها همانند بسیاری از میکروارگانیسم‌های داخل سلولی به واکنشهای با واسطهٔ سلولی حساستر از ایمنی هومورال هستند (۳۰، ۳۲).

این بیماری در ایران، در حیوانات و انسان شایع است (۱). نسبت راکتور به تست در گاو ۰/۲ درصد در سال ۱۳۶۹ بوده که نسبت به سال ۱۳۶۸ افزایش یافته است (۱، ۴) و در گوسفندان ۱/۱۲ درصد بوده که نسبت به سال قبل، کاهش کمی را نشان می‌دهد (۱، ۴). بنا بر گزارش WHO/FAO (۱۹۹۰) تعداد مبتلایان انسانی در ایران از ۵۴۸۴۷ مورد در سال ۱۹۸۷ (۱۰/۷ درصدهزار) به ۷۱۰۵۱ مورد در سال ۱۹۸۸ (۱۳/۲ درصد هزار) رسیده است (۱۴). شیوع بیماری در ایران، اهمیت بررسی راههای مختلف تشخیص و کنترل آن را نمایان می‌کند و به دلیل خسارات اقتصادی قابل توجهی که همه ساله بر مملکت وارد می‌کند و با توجه به اینکه، این بیماری یکی از دو بیماری (سل و بروسلوز) است که جزو برنامهٔ کنترل و ریشه کنی دولت، در برنامه ۵ ساله دوم می‌باشد (۳). لذا نیازمند اقدامات جدی است تا عمل کنترل بیماری به طرز مطلوبی صورت گیرد.

ویژگی و حساسیت روشهای مختلف سرمی در تشخیص بروسلوز

Gatel & Tadjbackhche در سال ۱۹۷۲ تعداد ۳۶۴۷ نمونهٔ سرم حیوانات مختلف و انسان را، در ایران از نظر پادتن‌های سرمی ضد بروسلا بررسی کردند. ابتدا در کلیهٔ سرمها آزمایش سروآگلوتیناسیون (SAT) انجام دادند و سپس کلیه سرمهای مشکوک و مثبت و تعدادی از سرمهای منفی را به روش CFT آزمایش کردند و از مقایسه آزمایش CFT و SAT روی ۶۷۴ نمونه از سرمهای فوق معلوم شد ۷۹/۵ درصد از سرمهایی که در SAT مثبت‌اند در آزمایش CFT نیز مثبت هستند و ۳۹/۳ درصد از سرمهایی که در رأیت مشکوکند، در آزمایش ثبوت کمپلمان (CFT) مثبتند. در عین حال ۹/۹ درصد از ۳۱۳ نمونهٔ سرمی منفی در آزمایش SAT، در CFT مثبت می‌شوند و این نتیجه حاصل شد که آزمایش CFT در تشخیص بیماری بروسلوز حساستر می‌باشد (۳۱).

Nicoletti (۱۹۸۲) آزمایش آگارژل ایمیونو دیفیوژن (AGID)، SAT، تست رزبنگال (RBT) و CFT را با سرم بزهای دامداریهای آلوده انجام داده که بیشترین حساسیت مربوط به RBT بوده و AGID از CFT خیلی اختصاصی‌تر بود. در گوسفندان تستهای SAT، CFT، و تستهای آلرژیک را انجام داد و CFT را دقیق‌ترین تست تشخیصی گزارش نمود.

در سال ۱۹۸۷ Reynolds روش ELISA و PCFIA[2] را برای تشخیص عفونت بروسلایی در ۶۰۱ گاو و تلیسه بکار برد. طی ۱۸۰ روز، هر ۳۰ روز یکبار آزمایش کاردتست، ACF[3]، ELISA و PCFIA با سرم هر حیوان انجام شد. نتایج نشان داد که ELISA کارآمدترین تست برای مشخص کردن عفونت اولیه است (۲۸).

Karaman در سال ۱۹۸۸ آزمایشات سرولوژیکی تشخیص بروسلوز در انسان و دام یعنی SAT، آزمایش حلقهٔ شیر (MAT)، CFT و ریوانول تست (RT) را با هم مقایسه کرده و نشان داد که نتایج MRT شبیه SAT است اما RT و CFT در تفکیک تیترهای پادتن حیوانات واکسینه شده و آلوده ارزش همسانی دارند (۱۶). Larsen و همکاران (۱۹۸۸) متعاقب همه گیری بروسلوز در سه گلهٔ گاو، و آزمایش با دو تست ELISA و CFT، استفاده کردن از هر دو تست را ضروری می‌دانند بخصوص اگر روش ریشه کنی، کشتار دامهای مبتلا باشد (۲۰).

Alonso و همکاران در سال ۱۹۹۰ تست EIA[4] ساده روی غشاء نیتروسلولز را با RPA، RBT، RT و CFT مقایسه کرده، ویژگی و حساسیت آنرا به ترتیب ۹۷/۸٪ و ۵۰٪ گزارش داده و استفاده همزمان آنرا با CFT در تشخیص بروسلوز خوک توصیه می‌کنند (۷).

Marin و همکاران (۱۹۸۹) با استفاده از سه نوع فرآورده آنتی‌ژنیکی مختلف، حساسیت و ویژگی سه تست CFT، AGID و ELISA را برای عفونت *Brucella ovis* گوسفندان بررسی کرده و گزارش دادند که حساسیت ELISA از همه بیشتر بود. (۹۷/۶ درصد)، سپس تستهای AGID (۹۶/۴٪) و CFT (۹۲/۷٪) قرار داشتند. تحت این شرایط همهٔ این تستها برای نمونه‌های سرم عادی از *B. ovis* ۱۰۰٪ اختصاصی بوده‌اند (۲۳).

LAKO و همکاران در سال ۱۹۸۹ در ۱۰ رأس گوسفند آلوده تجربی با *B. melitensis* ارزش تشخیصی تستهای سرولوژیکی RBT، آگلوتیناسیون سریع (RAT)، آگلوتیناسیون در لوله (SAT)، ایمینوفلورسانس غیر مستقیم و ELISA را به ترتیب ۸۶/۶٪، ۹۳٪، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ تعیین کردند (۱۹).

در بررسی Pappous & Hontou در سال ۱۹۸۹ برای کنترل سرولوژیکی بیماری بروسلوز در ۴۹۸ گاو، در تستهای RBT و CFT به ترتیب ۱۲۰ و ۱۲۱ گاو مثبت شدند و از ۳۳۲ گوسفند، از گلهٔ آلوده ۱۲۲ و ۱۰۳ مورد و از ۴۰۷ بز، از گلهٔ آلوده ۱۳۱ و ۱۵۰ مورد به ترتیب MRT و CFT مثبت بودند. آنها نتیجه می‌گیرند که در بعضی از موارد CFT حساستر از RBT می‌باشد و استفادهٔ توامان آنها را در گله‌های بز و گوسفند توصیه می‌کنند (۲۵).

در سال ۱۹۸۹ Albert & Bohm برای تشخیص بروسلوز در ۱۵۰ رأس گاو و گوسفند روش EIA ساده را به کار برده و با CFT و SAT مقایسه کردند. به عقیدهٔ آنان روش EIA ساده دقیق، قابل اعتماد و خیلی حساستر از تستهای مرسوم (SAT و CFT) است، سرم کمتری مصرف شده و برای ارزیابی روزمره توصیه می‌شود (۶).

Trap & Garin درسال ۱۹۹۰ برای تشخیص بروسلوز در حیوانات ویژگی و حساسیت PCFT[5] را با TCFT[6] مقایسه کردند، آنها ۴۸ نمونهٔ عاری از بروسلوز را برای ارزیابی ویژگی و ۱۸۴ نمونهٔ مشکوک را برای ارزیابی حساسیت انتخاب کرده و نتیجه گرفتند که PCFT به اندازهٔ TCFT اختصاصی بوده و در رقتهای پایین کمی حساستر است اما در رقتهای بالا TCFT حساستر می‌باشد (۱، ۳۳).

Kerkhofs و همکاران (۱۹۹۰) نتیجهٔ تشخیص بروسلوز گاوی به روش ELISA را با MRT مقایسه کردند. به طوری که از بین ۱۰۵ گله که با ELISA و MRT آزمایش شد، تنها ۲۹ گله فقط با ELISA مشخص گردید و ۴۰ گلهٔ MRT مثبت، الیزا مثبت هم بودند. تیتراسیون IgG1 الیزایی (IgG1 - ELISA) ۹۲/۸ درصد گاوانی را که در سه روش ELISA مثبت بودند مشخص کرد. استفادهٔ IgG1 - ELISA همراه با IgG2 - ELISA حساسیت را به ۱۰۰ درصد افزایش داد اما به طور مختصری ویژگی کاهش یافت. IgG2-ELISA کمکی به بهبود تشخیص نکرد، در نهایت وقتی حساسیت MRT با IgG1 - ELISA را مقایسه کردند IgG1 - ELISA به طور متوسط ۲۲ برابر MRT حساستر بود (۱۷).

Pappous & Hontou (۱۹۹۰) در بررسی سرولوژیکی گوسفندان واکسینه شده (با واکسن ضد بروسلوز Rev.1) با سه روش SAT، RBT و CFT به این نتیجه رسیدند که در چند روز اول بعد از واکسیناسیون SAT و RBT حساستر از CFT هستند اما بعداً CFT حساستر از آنها می‌شود (۲۶).

Rojas و همکاران در سال ۱۹۹۰ تست EIA روی غشاء نیتروسلولز را برای تشخیص *B. ovis* با PSAT[7]، TSAT[8] و CFT مقایسه کرده و آن را به دلیل ویژگی ۱۰۰٪ و حساسیت ۹۸/۱٪ به عفونت *B. ovis* در تشخیص بروسلوز توصیه نموده‌اند (۲۹).

ذوقی و همکاران (۱۹۹۰) در ایران، در ارتباط با جداسازی بروسلا از شیر گاوهای سرم منفی، طی یک سال بررسی گاوها از نظر بروسلوز، در ۶۴۷۲ گاو آزمایشات MRT، RBT، CFT و SAT را انجام داده و تعداد گاوهای MRT مثبت بیشتر از گاوان (SAT, CFT, RBT) مثبت می‌شود (۱۰۵۶ مورد سرم مثبت در مقابل ۱۶۳۲ مورد شیر مثبت). در کشت از ۱۶۳۲ نمونه شیر MRT مثبت ۳۹۷ مورد *B.abortus* جدا شده که ۱۱۹ مورد آن از گاوهای سرم منفی بوده‌اند (۳۴).

مقایسه تستهای سرولوژیکی SAT، RBT و CIEP[9] برای تشخیص عفونت *B. melitensis* را Mahajan و همکاران در سال ۱۹۹۱ گزارش می‌دهند. در این بررسی، نتیجه می‌گیرند که SAT طی مرحلهٔ اولیهٔ عفونت ناقلین بیشتری را تشخیص می‌دهد در حالی که، CLEP در مراحل بعدی عفونت بهتر نتیجه می‌دهد (۲۲)، و بالاخره Chin و همکاران (۱۹۹۱)، در بررسی تغییر سرمی دامهای مبتلا به بروسلوز با CFT، سل - الیزا (CELISA) و ایمنوبلاتینگ گزارش می‌دهند که تست ایمنوبلاتینگ بعنوان یک روش اولیهٔ تشخیص بروسلوز گوسفندی هیچ مزیتی بر CFT و CELISA ندارد (۱۲).

نویسندهٔ مقاله (۱۳۷۲) بررسی سرولوژیکی گوسفندان واکسینه شده (با واکسن ضد بروسلوز Rev.1) را با سه روش RBT، SAT و 2-MET در ۱۰/۵ ماه بعد از واکسیناسیون انجام داد و نتایج نشان داد که درصد موارد مثبت دو آزمایش RBT و SAT برابر (۱۰ درصد) می‌باشند.

ویژگی و حساسیت تستهای آلرژیک در تشخیص بروسلوز

تست آلرژیک جلدی (DTH) را می‌توان در محدودهٔ بیشتری در یک طرح ملی جهت تعیین گله‌ها و دستجاتی که امکان آلودگی دارند به کار برد (۵)، و MaCdiarmid در سال ۱۹۸۸ اشاره می‌کند که انجام تست DTH برای تشخیص ارزانتر از CFT می‌باشد (۲۱).

Duclos و همکاران در سال ۱۹۸۹ در بررسی واکنش تست جلدی به آنتی‌ژن *B.abortus* در دانشجویان دامپزشکی فرانسه، مشاهده کردند که ۱۱ نفر از ۳۲۴ دانشجو واکسیون بین جلدی به تزریق بروسلرژن داشتند. آنها گزارش می‌دهند که تست آلرژیک بین جلدی، ویژگی (۹۴٪) تستهای سرمی دارد اما حساستر (۷۰٪ حساسیت) است (۱۳).

Bercovich و همکارانش در سال ۱۹۸۹ تست DTH را برای تشخیص ۲ گاو آلوده تجربی و ۱۷۶ گاو شیری بروسلوزی به کار برده و نتیجه گرفته‌اند در زمانی که نتایج سرولوژیک مشکوک هستند، تست DTH یک روش مکمل مفید برای تشخیص بیماری بروسلوز است (۹)، ولی واکسن *Salmonella* RV6 *abortus ovis* بر نتایج تستهای آلرژیک جلدی تأثیر گذاشته و حساسیت آنهارا کاهش می‌دهد(۲۷) و DTH روشی با ارزش برای تشخیص بروسلا در گوساله‌های متولد شده از حیوانات آلوده به بروسلوز می‌باشد (۸).

نویسنده مقاله (۱۳۷۲) در مطالعهٔ اثرات ایمنی‌زائی واکسن بروسلوز Rev.1 روی بره‌ها، در جلوگیری از بیماری بروسلوز در ایران روی ۳۰ بره، ۱۰/۵ ماه پس از واکسیناسیون تست DTH را با تزریق ۰/۲۰ میلی‌لیتر ملیتین داخل جلدی بررسی کرده است. این تحقیق حساسیت DTH را ۶۵٪ نشان داد و موارد مثبت این تست ۶/۵ برابر رایت شد.

بحث و نتیجه گیری

کشتهای مثبت بهترین روش اثبات بیماری بوده ولی تستهای سرولوژیکی نیز نقش مهمی را بازی می‌کنند (۵). تشخیص سرولوژیکی ممکن است ساده باشد. خاصیت و روش تست، وضعیت مایه کوبی دام، طول مدت بیماری احتمالی و دیگر عوامل در به دست‌آوردن نوع ایمنوگلوبولین تأثیر می‌گذارند (۱، ۵).

Trap و همکاران معتقدند PCFT به اندازهٔ TCFT اختصاصی است. PCFT در رقتهای پایین و TCFT در رقتهای بالاتر حساستر می‌باشد (۲۳). آزمایش CFT در تشخیص بروسلوز حساستر از SAT (۵، ۳۰) و RBT (۲۰)، و اختصاصی‌تر از SAT است (۲)، اگر چه در چند روز اول بعد از واکسیناسیون، حساسیت SAT و RBT بیشتر از CFT می‌باشد (۲۶). اما، Nicoletti معتقد است RBT برای سونداژ گله‌های گاو و احتمالاً گوسفند و بز بهترین روش می‌باشد مخصوصاً در مواردی که تستهای انفرادی ارزش کمی دارند و در تشخیص بروسلوز خوک عملی‌تر است (۵).

حساسیت ELISA در تشخیص عفونت *B. ovis* ۹۷/۶ درصد بوده و حساستر از تستهای AGID (۹۶/۴٪) و CFT (۹۲/۷٪) می‌باشد. این تست ۱۰۰٪ اختصاصی است (۱۷). Loko و همکاران حساسیت ELISA را ۱۰۰٪ گزارش کرده‌اند (۱۹) و Kerkhofs و همکاران معتقدند IgG1 - ELISA ۲۲ برابر MRT حساس می‌باشد (۱۷). به نظر Albert و همکاران تست EIA ساده، دقیق و قابل اعتماد و خیلی حساستر از تستهای SAT و CFT است و آن را برای ارزیابی روشهای روزمره، توصیه می‌کنند (۶). Reynolds تست ELISA را کارآمدترین تست برای مشخص کردن عفونت اولیه می‌داند (۲۸).

تست کومبس سرم شیر و CFT، اختصاصی‌تر از آگلوتیناسیون سرم شیر و MRT هستند (۵). Rojas و همکاران حساسیت EIA روی غشاء نیتروسلولز را برای تشخیص *B. ovis* ۹۸/۱٪ و Alonso و همکاران ۵۰٪ گزارش کرده‌اند (۷، ۲۹)، و Chin و همکاران گفته‌اند تست ایمنوبلاتینگ هیچ مزیتی بر CFT و CELISA ندارد (۱۲).

تست 2-ME برای تمایز بروسلوز فعال از غیرفعال، در اشخاص بیماری که کشت خونی آنها استریل است خیلی مفید می‌باشد (۱، ۱۸).

CFT, Nicolletti را دقیق‌تر از تست‌های آلرژیک می‌داند (۵). Bercovich & Terlack در ۹۳ گاو منفی، مشکوک یا مثبت به ترتیب با آزمایش SAT، CFT یا MRT حساسیت و ویژگی DTH را به ترتیب ۸۱٪ و ۸۳٪ گزارش داده‌اند (۱۰).

نتایج تحقیقات ما حساسیت تست آلرژیک جلدی (DTH) را ۱۰/۵ ماه بعد از واکسیناسیون ۶۵٪ نشان می‌دهد، و درصد موارد مثبت این تست ۶/۵ (۶۵٪ به ۱۰٪) برابر SAT می‌گردد(۲).

در صورت استفاده از تست آلرژیک، تهیهٔ بروسلرژن از مخلوط انواع مختلف بروسلا نتیجهٔ بهتری گرفته می‌شود (۱۰). Jawets و همکاران معتقدند که استفاده از این تست ممکن است تیتراً گلوتینین را تحریک نماید (۱۵)، و به نظر Duclos و همکاران تست آلرژیک داخل جلدی، یک ویژگی (۹۴٪) مشابه تستهای سرولوژیکی دارد اما حساستر (۷۵٪ حساسیت) می‌باشد (۱۳)، استفاده از تست جلدی DTH یک واکنش مکمل مفید برای تشخیص بیماری بروسلوز است، در زمانی که نتایج سرولوژیک مشکوک هستند (۹) و روش با ارزشی برای تشخیص بروسلا در گوساله‌های متولد شده از مادران آلوده به بروسلوز می‌باشد (۸).

تقدیر و تشکر

با سپاس و تشکر از آقایان دکتراحمد مرشدی و دکترسیدمرتضی علوی شوشتری اعضاء محترم هیأت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه.

پاورقی

1. Reactor= حیوانی که نسبت به عوامل خارجی عکس‌العمل مثبت نشان می‌دهد
2. Plate Complement Fixation Immuno Assay=PCFIA
3. Automated Complement Fixation = ACF
4. Enzyme Immunoassay
5. Plate Complement Fixation Test
6. Tube Complement Fixation Test
7. Plate Seroagglutination Test
8. Tube Seroagglutination Test

منابع مورد استفاده

۱- زینالی - عسگر ۱۳۷۰ بررسی اثرات ایمونولوژیکی واکسن بروسلا ملی تنسیس Rev.1 در بره‌ها. پایان نامه دکترای دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، شماره ۱۹۷.

۲- زینالی - عسگر و علوی شوشتری - سیدمرتضی (۱۳۷۲). مطالعهٔ اثرات ایمنی‌زائی واکسن بروسلوز Rev.1 روی بره‌ها در جلوگیری از بیماری بروسلوز در ایران، خلاصه مقالات کنگرهٔ ملی دامپزشکی، تهران ۱۳۷۲، سازمان دامپزشکی کشور. صفحهٔ ۸۵.

۳- عربشاهی - مسعود (۱۳۶۵). بررسی اپیدمیولوژیکی بروسلوز در شهرستان قم. پایان‌نامهٔ دکترای دامپزشکی، دانشگاه تهران، شمارهٔ پایان‌نامه ۱۵۴۷. صفحات ۵، ۶، ۱۲ و ۱۳.

۴- مرکز اطلاعات آمار سازمان دامپزشکی کشور (۱۳۷۰). وضعیت واکسیناسیون گله‌های گوسفندی - بزی و گاوی با واکسنهای بروسلوزی در ۱۵ سالهٔ اخیر (۱۳۵۶ تا ۱۳۶۹) در ایران و وضعیت سرمی آنها.

۵- نیکولتی - پل (۱۹۸۲). تشخیص و واکسیناسیون به منظور کنترل بروسلوز در خاور نزدیک. نشریهٔ بهداشت و تولیدات دامی WHO/FAO برگردان: نسرین مظفری، کارشناس سازمان دامپزشکی کشور. صفحات: ۳۳-۱.

6. Albert, K. and Bohm, R.(1989). Simple enzyme immunoassay for brucellosis in cattle and sheep serum samples. Vet. Bulletin, 59 (4)277, Abstr. 2003.

7. Alonso, U.B., Moriyon, I., Diaz, R. and Blasco, J.M., 1988. Enzyme linked immunosorbent with Brucella native hapten polysaccharide and lipopolysaccharide. Journal of Clinical Microbiology, 26(12) 2642-2646.

8. Bercovich, Z., Haagsma, J., and Terlack, E.A., 1990. Use of delayed type hypersensitivity test to diagnosing brucellosis in calves born to infected dams, Vet. Quarterly, Oct., 12(4)231-237.

9. Bercovich, Z., Lagendijk, W. and Bokhout, B.A. 1989. The delayed type hypersensitivity test (DTH) for diagnosis of *Brucella abortus* infection in cattle. Vet. Immuno. Immunopathl., Jun.; 21(2)213-218.

10. Bercovich, Z. and Terlack, E.A., 1990. An evaluation of the delayed type hypersensitivity test for diagnosing of brucellsis in individual cattle: A field study. Vet Microbiology, 22(2-3) 257-248.

11. Blood, D.C. and Radostites, 1989. Veterinary Medicine. 7th edition. P: 687, 695, 698.

12. Chin, J.C., Page, B. and Carrigan, M., 1991. Comparison of reactivity of rams with brucellosis in a complement fixation test, whole cell ELISA and immunoblotting. Vet. Micribiology, 26(3)297-299.

13. Duclos, PIJ., Bentejac, M.C., Serre, A. and Basuouls, S., 1989. Skin test reactions to a phenolsoluble antigen of *Brucella abortus* among veterinary students. International Journal of Epidemiology, 185(2)446 -450.

14. Global estimates for health situation and projections, 1990. WHO/FAO/90/2. Division of Epidemiological Surveillance and Health Situation and Trend Assessment, World Health Organization, Geneva, P.:21.

15. Jawetz, Z.; Melnik, J.L., and Adelberg, E.A., 1987. Review of medical microbiology. 7th edition, P.: 267.

16. Karaman, Z. and Goler, E., 1988. Comparative serological studies on brucellosis using human and animal serum samples. Etilik Veteriner Microbioloji Dergest, 6(3) 55-68, Vet. Bull. 1989, Vol. 59, Abstr. 1996.

17. Kerkhofs, P.; Bottom, Y.; Thiange, P.; Liment, J.N., 1990. Diagnosis of bovine brucellosis by Enzyme Immunoassay of milk Vet. Micribiology, 24(1)73080.

18. Klein, G.C.. and Behen, K.A., 1981, Determination of Brucella immunoglobulin G agglutinating antibody titer with dithiothreitol, Journal of Clinical Microbiology, 14(1)73-80.

19. Lako, B., Asanin, R., Lalic, M., Sovice, M. and Marcovic, S. 1989. Diagnostic value of various serological tests for detecting brucellosis. Veterinaryki Glasnik, 43(5)427-430, (Vet. Bull., 1990, Vol. 60, Abstr. 1372).

20. Larsen, J.W.A., Webber, J. and Edwards, L.D., 1988. A field outbreak of bovine brucellosis- comparison of CFT, ELISA and culture results, Australian Veterinary Journal, 65(1)30-31.

21. McDiarmid, S.C., 1988. Future options for brucellosis surveillance in New Zealand beef herds. New Zealand Veterinary Journal, 36(1)39-42.

22. Mahajan, N.K. and Kulshreshtha, R.C., 1991. Comparison of serological tests for *Brucella melitensis* infection in sheep. Tropical animal health and production, 23(1)39-42.

23. Marin, C.M., Bagues, M.P.J., Blasco, J.M., Gamazo, C. and Moriyon, I. 1989. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. Vet. Record, 125(20)504-508.

24. Nicoletti, P., 1985. In: Current veterinary therapy, food animal practice 2. (J.L. Howard ed.), P.: 589-594, W. B. Saunders company, London.

25. Pappous, H. and Hontou, A.(1988), Serological control of brucellosis by the Rose bengal and complement fixation tests, Deltion Tes Ellenikes Kteniatrikes, Etaireias, 39(1)45-60 (Vet. Bull.(1988), Vol. 59, Abstr. 12).

26. Pappous, H. and Hontou, A. (1989), Serological control of sheep vaccinated with Rev.1 Brucella Vaccine, Vet. Bulletin, 59(1)6, Abstr. 14

27. Pardon, P.; Sanchis, R.; Molenat, G.; Marly, G. and Renard, D. 1990. Serological and allergic reactions of ewes after simultaneous vaccinations with two living attenuated strains of brucella and salmonella, Annales des Recherches Veterinaires, 21 (2)1530160.

28. Reynolds, S.L. (1987), The use of portable field enzyme linked immunosorbent assay in managing *Brucella abortus* infection in range cattle, Proceeding the united states animal health association, 91, 266-282.

29. Rojas, X.; Alons, O.; Uribe, C.; Rosenfeld, C.; Henrquenz, O.; Wright, P. and Gall, K. 1991. Diagnosis of ovine brucellosis by enzyme immunoassay on nitrocellolose membrane, Vet. Bulletine, 61(6)502, Abste. 3896.

30. Smith, L.D. and Ficht, T.A. 1990, Pathogenesis of brucella. Critical Reviews in Microbiology, 17(3)209-224.

31. Tadjbackhche, H. and Gatel, A. 1972, Incidence serologique des anticorps brucellosis ches les animux domestiques I, home on Iran. Rev. et de med vet des pays trop. 25:521.

32. Tizard. I. 1982, An introduction to veterinary immunology. Second edition, P:182.

33. Trap. D. & Garin, B.B. 1990. Plate complement fixation test for diagnosis of brucellosis in animals: Comparison with the official tube CF test, Vet. Microbiology, 24(1)73-80.

34. Zowghi, E., Ebadi, A. and Mohseni, B. 1990. Isolation of brucella organisms from the milk of seronegative cows. Revue Scientique-Orifice International des Epizootics, 9(4)1175-1178 (Vet. Bull., 1990, Vol. 61, Abstr. 3891).