Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
سال دهم ، شماره سوم ، پاییز ۱۳۸۱ ، ص ۵۷

مقایسهٔ نتیجهٔ تستهای سرولوژی با آنتی‌ژن انستیتوپاستور وانستیتورازی در بیماران مشکوک به بروسلوز

دکتر سیدمحمود قریشیان[۱] - دکتر محمدرضا شریفی[۲]

چکیده

با توجه به گزارش نتایج متفاوت از آزمایش رایت (Wright) با آنتی ژنهای انستیتوپاستور و انستیتورازی برای تشخیص بروسلوز برآن شدیم تامقایسه این دو آنتی‌ژن را با سرم بیماران مشکوک تب مالتی مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکزی یزد طی سال ۱۳۷۹ انجام دهیم. تعداد ۳٤۵ نفر که ۵۰ نفر از آنها با یکی یا هردو آنتی‌ژن رایت آنها مثبت بود سرم آنها مورد بررسی قرار گرفت .این مطالعه از نوع توصیفی و به روش مقطعی انجام شد .روش مطالعه شامل مصاحبه وتکمیل پرسشنامه حاوی ویژگیهای افراد مورد بررسی از قبیل : سن، شغل، جنس،سابقه قبلی تب مالت، سابقه مصرف لبنیات غیر پاستوریزه بود ومقدار ۵cc خون از افراد مورد مطالعه گرفته وپس ازجداسازی سرم تستها سرولوژی رایت سریع و لوله ای با آنتی ژن انستیتوپاستور وانستیتورازی به روش آگلوتیناسیون و شیوه دوسوکور انجام گرفت . از ۵۰ نمونه ۲۷ نمونه (٥٤درصد) از مردان و ۲۳ نمونه (٤٦ درصد) از خانمها بود . دامنه سنی افراد بین ۸ تا ٦۰ سال بود وتفاوت نتیجه رایت راپید بین آنتی‌ژن انستیتوپاستور و انستیتورازی معنی دار بود (PV=0.001) ونیز تفاوت نتایج تست رایت لوله‌ای با آنتی ژن انستیتوپاستور وانستیتورازی معنی دار بود (PV = 0) . با توجه به نتایج تحقیق روش راپید آنتی ژنهای انستیتوپاستور دارای پدیده ذون نسبت به راپید انستیتورازی می‌باشند وروش لوله‌ای با آنتی‌ژن انستیتوپاستور تیتر بالائی از آنتی‌بادی را نشان می‌دهد.

واژه های کلیدی : بروسلوز ، آزمایش رایت ، انستیتوپاستور ، انستیتورازی

مقدمه

بیماری بروسلوز بوسیله میکروبهای متعلق به Brucella که کوکوباسیل‌های گرم منفی هستند بوجود آمده و از حیواناتی نظیر گاو، گوسفند، بز و خوک از طریق تماس و یا خوردن شیر و یا فرآورده‌های شیری به انسان منتقل می شود و ایجاد بیماری می‌کند [۳] . بیماری حاد غالبا با تب بدون علائم موضعی و بیماری مزمن با تب، ضعف و ناراحتی‌های مبهم که ممکن است ماهها و یا سالها دوام یابد، مشخص می‌گردد .این بیماری به اسامی دیگری نظیر تب مواج، تب شیربز و تب مدیترانه‌ای نیز نامیده می‌شود .بیماری بروسلوز در تمام دنیا وجود دارد[٤] و چندین صد هزار نفر را در سال مبتلا می‌کند و در کشورهای در حال توسعه بروسلوز مشکل اقتصادی عظیمی بشمار می‌آید زیرا

۱- استادیار گروه پاتوبیولوژی
۲- استادیار گروه بیماریهای عفونی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی — درمانی شهید صدوقی یزد

www.SID.ir

Archive of SID

موجب کاهش گوشت، شیر، پشم و سایر محصولات دامی می‌شود .

معمولا تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز براساس جداسازی عامل بیماری و واکنشهای سرولوژی انجام می‌پذیرد .کشت عامل مسبب بیماری ، تنها روش دقیق تشخیص بوده که همیشه امکان‌پذیر نیست . از اینرو، بررسیهای سرولوژی عملی‌ترین روش شناخته شده و در واکنشهای سرمی تعیین تیتر آنتی‌بادی سرم معیار و ملاک تشخیص است [۵] .

در آزمایشهای سرولوژی کاربرد روشهای استاندارد ارائه شده بوسیله سازمان جهانی بهداشت با استفاده از آنتی‌ژنهای استاندارد بین‌المللی مورد تأکید می‌باشد [۶] .

متداولترین تستی که در میان تستهای سرولوژیکی برای تشخیص بروسلوز مورد استفاده قرار می‌گیرد تست رایت می‌باشد حدود ۹۷٪ موارد بروسلوزی که از طریق کشت به اثبات رسیده است بوسیله این تست عیار افزاینده چهار برابر یا بیشتر را نشان می‌دهد .

آنتی‌ژنی که در این تست استفاده می‌شود از بروسلا آبورتوس تهیه می‌شود، زیرا این آنتی‌ژن با آنتی‌بادیهای ضد بروسلا آبورتوس، ملی تنسیس و سوئیس واکنش نشان می‌دهد ولی قادر به ایجاد واکنش با آنتی‌بادیهای ضد بروسلا کانیس نمی‌باشد، لذا در بروسلا کانیس باید از تستهای سرولوژیک ویژه این بروسلا استفاده شود [۸،۷] .

استفاده از آنتی‌ژن بروسلا آبورتوس در آزمایشات سرولوژیک بنظر می‌رسد در صورت وجود علایم بالینی منطبق بر بروسلوز، عیارهای پایین‌تر هم با ارزش باشد زیرا هیچگاه نمی‌توان انتظار داشت با آنتی‌ژن بروسلا آبورتوس، عیار واقعی آنتی‌کرهای ضد بروسلا ملی تنسیس سنجیده شود [۴] .

از طرفی در حال حاضر بطورکلی از آنتی‌ژن بروسلا آبورتوس برای تشخیص انواع بروسلوز استفاده می‌شود، ولی غیراز بروسلوز ناشی از گونه آبورتوس انواع دیگر بروسلوز، عیار کمتری را نشان می‌دهد و در صورتیکه از آنتی‌ژنهای اختصاصی استفاده شود، عیار آگلوتینین بالاتری را نشان خواهد داد [۷،۳] .

در بررسی سرولوژی بروسلوز تعیین تفاوت تیتر آنتی‌بادی دو نمونه سرم در حداقل به فاصله دو هفته بسیار با ارزش است [۱۱،۹] .

آزمایش رزبنگال که با آنتی‌ژن بروسلا آبورتوس به صورت راپید تست یا راپید اسلاید تست انجام می‌شود [۱۲] و برطبق روش استاندارد بین‌المللی توصیه شده WHO بوسیله انستیتو رازی تهیه شده است [۱۱،۹] .

آزمایش سروآگلوتیناسیون رایت که یک آنتی‌ژن آن از بروسلا آبورتوس و متداولترین آزمایشی است که جهت تشخیص بروسلوز بکار می‌رود و توسط انستیتوپاستور و انستیتورازی ساخته می‌شود و جهت آزمایش رقت‌های مختلف سرم تهیه شده و آنتی‌ژن به غلظت مناسب به آن اضافه گردیده و پس از ۱۸ تا ۲۴ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرائت می‌گردد و در مورد تفسیر آزمایش رایت و تعیین تیتر عفونت در کتب غربی نوشته‌اند ۹۰٪ بیماران تیتری حداقل $\frac{1}{16}$ بعنوان عفونت درنظر گرفته شود [۱۰] .که باید خاطرنشان ساخت که در آن کشورها بروسلوز ناشی از بروسلا آبورتوس و بروسلا سوئیس است ولی عفونت بروسلا ملی‌تنیس بیشتر مشکل خاورمیانه و کشورهای مدیترانه است [۱۳] .

در اسپانیا تیتر $\frac{1}{80}$ برای جمعیت شهری و تیتر $\frac{1}{32}$ ر برای جمعیت روستایی مثبت تلقی می شود و در هندوستان تیتر $\frac{1}{40}$ به بالا ملاک عفونت می باشد ولی درکشور ما گزارش شده است که تیتر قبل از درمان در حد $\frac{1}{80}$ به بالا مثبت تلقی شده ولی تیترهای پایین‌تر بویژه $\frac{1}{20}$ و $\frac{1}{40}$ بایستی مشکوک تلقی شود تا خلاف آن به ثبوت برسد [۴] .

بطور معمول در عفونت فعال بروسلوز نقش برتر را IgGایفا می‌نماید همچنین به دنبال درمان ، تیتر IgG بسرعت کاهش یافته بیش از ۹۰٪ افراد پس از ۶ ماه نتیجه آنها منفی می‌شود درحالی که تیتر IgM ممکن است تا دوسال دوام داشته باشد و بطورمعمول هر سه ماه یک رقت کاهش یابد [۱۰،۹] ولی بهرحال تشخیص بروسلوز با درنظر گرفتن اطلاعات توأم اپیدمیولوژی، بالینی و آزمایشگاهی عملی است [۱۴] .

www.SID.ir

Archive of SID

روش بررسی

در این تحقیق ۳۴۵ از نفر افراد مشکوک به بروسلوز مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکزی یزد طی سال ۱۳۷۹ مورد مطالعه قرار گرفتند وبرای هر بیمار پرسشنامه ای حاوی ویژگیهای افراد مورد بررسی از قبیل : سن ، جنس ، شغل ، سابقه قبلی تب مالت ، سابقه مصرف لبنیات غیر پاستوریزه تکمیل نموده و جهت تست رایت Wright ، ۵cc خون از بیمار گرفته شد و پس از لخته شدن سانتریفوژ نموده و سرمها را جدا نمودیم و برای هر بیمار سرم در دو لوله آزمایش ریخته شده و شماره گذاری گردید . سرمهای تهیه شده در فریز ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد و هر هفته یک نفر سرمها را با آنتی ژن انستیتوپاستور و یک نفر سرمها را باآنتی ژن انستیتورازی آزمایش نمودند و با هر نمونه سرم بیمار تست رایت راپید و لوله‌ای با هریک از آنتی ژنها (انستیتوپاستور و انستیتورازی) به روش آگلوتیناسیون انجام گرفت.

جهت روش آگلوتیناسیون سریع (Rapid) روی یک کاشی تمیز و پاک با مداد شمعی مربع هائی به ابعاد ۱/۵ × ۱/۵ سانتی متر می کشیم و بعد با سمپلر ۵۰ میکرولیتر سرم بیمار را در خانه ریخته و بعد آنتی ژن نوع راپید رابه مقدار ۵۰ میکرولیتر یک قطره روی سرم مورد نظر اضافه می کنیم مخلوط آنتی ژن و سرم را توسط اپلیکاتور پلاستیکی بخوبی به هم می زنیم کاشی را به مدت یک دقیقه تکان داده و بعد نتیجه آگلوتیناسیون را ثبت می نمائیم.

روش آگلوتیناسیون لوله ای : تعداد ده لوله کوهن را در جا لوله ای قرار داده و در لوله اول ۰/۸ میلی لیتر سرم فیزیولوژی و در کلیه لوله های بعد ۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ می ریزیم .به لوله اول ۰/۲ میلی لیتر سرم مورد آزمایش را اضافه نموده و بعد از مخلوط نمودن آن بوسیله پی پت ۰/۵ میلی لیتر از آنرا به لوله دوم و ۰/۵ میلی لیتر از لوله دوم را به لوله سوم و به ترتیب تا لوله نهم انتقال می دهیم و ۰/۵ میلی لیتر مایع اضافه لوله نهم را دور می ریزیم به هریک از لوله ها ۰/۵ میلی لیتر از آنتی ژن برای روش لوله ای را اضافه نموده و بعد از بهم زدن به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرا می دهیم و بعد از انکوباسیون نتیجه آگلوتیناسیون را یادداشت می کنیم و رقت سرم مورد آزمایش در لوله ها به ترتیب برابر $\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{20}$ ، $\frac{1}{40}$ ، $\frac{1}{80}$ ، $\frac{1}{16}$ ، $\frac{1}{32}$ ، $\frac{1}{128}$ ، $\frac{1}{256}$ خواهد شد .در این روش تیتر آنتی بادی مورد آزمایش برابر است با عکس بالاترین رقتی که با مقایسه لوله شاهد (لوله ده)آگلوتیناسیون از خود نشان می دهد.

مطالعه فوق به شیوه دوسوکور اجراگردید و محقق و کسی که تیتر آنتی بادیها را می‌خواند نسبت به اینکه کدام تست با آنتی ژنهای تولید شده مؤسسه رازی و یا مؤسسه پاستور است اطلاعی نداشت .بعد از انجام آزمایشات برای پی بردن به وجود اختلاف معنی‌دار بین آنتی ژنهای دو شرکت با استفاده از آزمونهای Chi - square و Gamma test و Sign test و برنامه نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل انجام گرفت.

نتایج

از ۳۴۵سرم مشکوک بررسی شده ۵۰ سرم دارای تست رایت مثبت با استفاده از هردو آنتی ژن بودند که ۵۴ درصد (۲۷ از ۵۰) این سرم‌های مثبت از مردان و ۴۶درصد (۲۳ از ۵۰) از زنان تهیه شده بود .دامنه سن افراد مورد مطالعه ۶۰-۸ سال بود. ۹۰٪ نمونه‌ها ساکن یزد و ۱۰٪ ساکن غیر یزد بودند ۴۵ از ۳۲٪ (۵۰ خانه‌دار) ، ۱۶ از ۲۸٪ (۵۰کشاورز) ۱۴ از ۲۰٪ (۵۰کارگر) ۱۰ از ۱۰٪ (۵۰کارمند) ۵ از ۱۰٪ (۵۰محصل از ۵۰)و ۹۶٪ دارای سابقه مصرف لبنیات غیرپاستوریزه بودند ۴۸ از ۵۰ با توجه به علیئم و یافته‌های کلینیکی ۴۰ درصد تب بیش از ۲۰ (۳۸ از ۵۰) و ۵۸٪ لرز (۲۹ از ۵۰) ۶۶ درصد درد عضلات (۳۳ از ۵۰) و ۶۰ درصد درد مفاصل (۳۰ از ۵۰) و ۸ درصد اسپلنومگالی(۴ از ۵) و ۱۶درصد آدنوپاتی (۸ از ۵۰) داشتند . نتیجه آزمایش تست رایت راپید با استفاده از دو آنتی‌ژن که بر روی سرم‌های مثبت انجام شد در جدول (۱) نشان داده شده است و چنانکه مشاهده می شود شانزده نمونه با آنتی ژن راپید انستیوپاستور مثبت ۳۲٪ است .همچنین شانزده نمونه هم با آنتی ژن انستیتورازی مثبت (۳۲درصد) است ۱۸نمونه ۳۶٪ با هر دو آنتی ژن مثبت بودند که

www.SID.ir

Archive of SID

این اختلاف نتایج بین آنتی ژنهای هر دو شرکت با تستX2 معنی دار می باشد (PV= 0.001 df= 1 X2 = 11.07) .در صورتی که سرم بیمار را رقیق نموده و با آن تست رایت راپید انستیوپاستور انجام دهیم این تفاوت معنی دار نبود .

نتایج تست رایت لوله‌ای با آنتی ژنهای انستیتوپاستور و انستیتورازی در جدول (۲) مشخص شده است .

همانطور که مشاهده می شود تیترآنتی بادی با آنتی ژنهای انستیتوپاستور بیشتر از انستیتورازی است که با sign testآزمون شد اختلاف معنی دار بود (PV = 0). نتایج تست رایت لوله‌ای و راپید انستیتوپاستور و انستیتورازی در جدول (۳) باهم مقایسه شده‌اند .

همانطور که مشاهده می شود تفاوت نتایج تست رایت لوله‌ای با راپید انستیتوپاستور باGama test آزمون شد که Gama = - 0.716 وPV = 0 و نشان می دهد همبستگی بین نتایج آزمون لوله‌ای و راپید انستیتوپاستور منفی است بعبارتی همبستگی مثبت وجود ندارد و بین نتایج تست رایت لوله‌ای و راپید انستیتورازی با Gama test بررسی شد که (Gama= 1 و PV=0) و نشان دهنده همبستگی بین آنتی ژن لوله‌ای و راپید انستیتورازی می باشد .ضمنا آنتی ژن انستیتورازی دارای دقت ۹۰ درصد، حساسیت ۸۰ درصد و اختصاصی بودن ۱۰۰ درصد و ارزش اخباری مثبت ۱۰۰ درصد بود و آنتی ژن انستیوپاستور دارای دقت ۱۰۰درصد و حساسیت ۱۰۰درصد و اختصاصی بودن ۱۰۰درصد و ارزش اخباری مثبت ۱۰۰درصد بود.

جدول ۱ : توزیع فراوانی و تطابق نتیجه تست رایت راپید با آنتی ژنهای انستیتوپاستور و انستیتورازی

راپید پاستور / راپید رازی	منفی	مثبت	جمع
-	۰	۱٦	۱٦
+	۱٦	۱۸	۳٤
جمع	۱٦	۳۲	۵۰

P. Value = 0.001 Chi- square

جدول ۲ : توزیع فراوان نتایج تست رایت لوله‌ای با آنتی ژنهای انستیتوپاستور و انستیتورازی

مؤسسه تولید کننده / تیتر آنتی بادی	آنتی ژن انستیتوپاستور		آنتی ژن انستیتورازی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۲۰	–	–	۲	٤
٤۰	۱۱	۲۲	–	–
۸۰	٦	۱٤	۵	۱۰
۱٦۰	۵	٦	۱۲	۲٤
۳۲۰	۷	۱٤	۱۱	۲۲
٦٤۰	۱۷	۳٦	٤	۸
۱۲۸۰	٤	۸	–	–
جمع	۵۰	۱۰۰	۳٤	٦۸

P.value = 0 sign test

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳ : مقایسه‌نتایج تست‌رایت لوله‌ای و راپیدانستیتوپاستور وانستیتوررازی

راپید / لوله ای تیتر آنتی بادی	آنتی ژن انستیتو پاستور				آنتی ژن انستیتو رازی			
	موارد منفی		موارد مثبت		موارد منفی		موارد مثبت	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۰	۰	۰	۰	۰	۱٦	۳۲	۰	۰
۲۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲	٤
٤۰	۰	۰	۱۱	۲۲	۰	۰	۰	۰
۸۰	۰	۰	٦	۱۲	۰	۰	۵	۱۰
۱٦۰	۳	٦	۲	٤	۰	۰	۱۲	۲٤
۳۲۰	۲	٤	۵	۱۰	۰	۰	۱۱	۲۲
٦٤۰	۷	۱٤	۱۰	۲۰	۰	۰	٤	۸
۱۲۸۰	٤	۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰
جمع	۱٦	۳۲	۳٤	٦۸	۱٦	۳۲	۳٤	٦۸

بحث

در این مطالعه نتیجه تست رایت در ۵۰ مورد از ۳٤۵ سرم مشکوک به بروسلوز با استفاده از هر دو آنتی‌ژن استاندارد تازه تهیه شده مثبت گردید .این تست‌ها با استفاده از هر دوآنتی‌ژن روش سریع و لوله‌ای انجام گردید .در این بررسی بین داده‌های بدست آمده از آزمایش رایت انستیتوپاستور و انستیتورازی با روش راپید تفاوت معنی‌داری دیده شد(جدول ۱) و همچنین بین نتایج بدست آمده با آنتی‌ژن رایت لوله‌ای انستیتورازی و انستیتوپاستور تفاوت معنی‌دار آن است (جدول ۲) با مقایسه نتایج بدست آمده با آنتی‌ژن لوله‌ای انستیتوپاستور و راپید انستیتوپاستور همستگی مثبت وجود ندارد . این تفاوت معنی دار بود (PV = 0) . بین نتایج رایت لوله‌ای انستیتورازی و راپید همبستگی وجود دارد(جدول ۳) .

در روش اسلاید تست تعداد ٦ نمونه با آنتی‌ژن راپید انستیتوپاستور منفی و با روش لوله‌ای مثبت شد که نشان‌دهنده پدیده پروزن است ولی ۳۲ نمونه با آنتی ژن انستیتورازی با روش لوله‌ای و راپید هر دو مثبت شد که پدیده پروزون مشاهده نشده ولی در مقایسه بین دو آنتی‌ژن راپید که نشان می‌دهد با آنتی‌ژن انستیوپاستور پدیده وزن بطور معنی‌داری بیشتر تا آنتی‌ژن انستیتورازی می باشد که این تفاوت معنی‌داری بود ولی با تست لوله‌ای که بین دو آنتی‌ژن انستیتوپاستور و انستیتورازی انجام شد با آنتی‌ژن انستیتوپاستور تیتر بالایی را نشان می‌دهد اما با آنتی‌ژن انستیتورازی تیتر کمتری را نشان می‌دهد که بین این دو تفاوت معنی‌داری مشاهده شد PV = 0 بنابراین با آنتی‌ژن انستیتوپاستور برحسب نتایج بدست آمده حتماً باید چه در روش راپید و چه در روش لوله‌ای که در رقت‌های پایین ممکن است واکنش ضعیف یا منفی نشان دهد و در واقع پاسخ کاذب منفی به بار آورد باید نمونه مورد بررسی به اندازه کافی رقیق شده تا مقادیر زیادی آنتی‌بادی که در آن وجود خواهد داشت واکنش قابل رؤیتی مشاهده شودوجواب منفی‌کاذب حذف‌شود (پدیده پروذون .) همانگونه که گفته شد تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز براساس جداسازی عامل بیماری و واکنشهای سرولوژی انجام می‌پذیرد[۱٤] . کشت عامل مسبب بیماری تنها روش دقیق

www.SID.ir

Archive of SID

تشخیص بوده که متأسفانه همیشه امکان‌پذیر نیست .از اینرو بررسیهای سرولوژیک عملی‌ترین روش شناخته شده و در واکنشهای سرمی تعیین تیتر آنتی‌بادی سرم و علائم کلینیکی معیار و ملاک تشخیص است [۸،۷] . در آزمایشهای سرولوژی نیز کاربرد روشهای استاندارد ارائه شده بوسیله سازمان جهانی بهداشت با استفاده از آنتی‌ژنهای استاندارد بین‌المللی مورد تأکید می‌باشد [٦] . لذا با توجه به نتایج بدست آمده می توان گفت آنتی ژن تهیه شده هر دو شرکت قابل اطمینان و مورداستفاده در سطح آزمایشگاهها می باشد و در صورتیکه آزمایشگاهها در روش راپید جواب مریض می دهند با آنتی ژن انستیتورازی تست کیفی بهتر است (چون پدیده ذون مشاهده نشد) و اگر می خواهند روش راپید با آنتی ژن انستیتوپاستور انجام دهند می بایست از رقتهای مختلف سرم استفاده کنند تا پدیده ذون مشاهده نشود .ولی در صورتیکه تست را روش لوله ای انجام می دهند با آنتی ژن انستیتوپاستور بهتر می باشد و حساسیت بالاتری را دارد .

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

١- سازمان بهداشت جهانی، تشخیص ،درمان و پیشگیری بروسلوز، دکترذوقی (مترجم) انتشارات دانش پژوه -تهران ١٣٦٥ ص ٢٨-٣٤و ١٦٩-١٩٨ .

٢- ملک زاده - رضا -نبض - ماهنامه پزشکی-سال ششم - شماره ششم - اسفندماه ١٣٧٥صفحه ٢٨ .

3- Jawetz E etal. Medical microbiology, London. Appleton and lange. 1991 : 244-247.

4- Beheshtis et al. ***Brucellosis in Iran:*** The province experience. Medical jornal of the Islamic Republic of Iran. 2001: 67-71.

5- Young .E.J. ***Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination test and review of the literature.*** Rev Infec Dis 1991; 13: 359-372.

6- Gotuzzo.E . ***An evalution of diagnostic methods for brucellosis,*** J infect Dis 1989,153 (1): 122-125.

7- Gazapo .E . ***Change in IgM and IgG antifbody concentration in Brucellosis overtime,*** J Infect Dis 1989, 159(2) : 219 - 225.

8- Stevens .G.M , etal . ***Serologic responses in diagnostic test for Brucellosis in cattleraccinated with Brucella abortus.*** J . Clin Microb 1994 32(4) : 1060- 1066.

9- Alton .G.G, etal . ***Laboratory Techniqus in Brucellosis WHO,*** Geneva, 1975: 86-89.

10- Draz R. etal. ***Laboratory Techniques in the diagnosis of human brucellasis.Clinical and Laboratory aspects.*** Edited by young etal CRC press 1989:146

11- Alton . G.G ,etal. ***Techniques for the Brucellosis laboratory I NRA Paris*** 1989.68

12- Jornt FAO\WHO. ***Expert committee anBrucellosis.Fifth Report Technique reportservies 464.*** WHO, Genera 1970: 187.

13- Wallach .J. ***Interpretation of diagnostic test,*** Fifth edition 1992 : 628 .

14- **Joint FAO\WHO.** ***Expert committes on Brucellosis.*** **Sixth Report,Technical Reportseries 740, WHO, Genera 1986: 70-73.**

www.SID.ir