مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۴، شماره۶ ویژه نامه۳، زمستان ۱۳۹۰، ۷۷-۷۱

اعتبار تشخیصی تست های سرولوژی رایج در بروسلوز

علی اصغر فرازی[۱]، سید داود حسینی[۲*]

۱- استادیار، گروه عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲- استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت ۹۰/۸/۲۴، تاریخ پذیرش ۹۰/۱۰/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز بیماری مشترک بین انسان و دام است که کنترل آن به میزان شیوع بیماری در جمعیت دامی وابسته است. هدف از این مطالعه مقایسه حساسیت و ویژگی تست‌های رایج تشخیص بروسلوز می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی – تحلیلی، ۲۹۷ نمونه سرم از یک گله دام که سابقه سقط جنین داشتند تهیه و از نظر تست‌های رایت، رزبنگال، ۲-مرکاپتواتانل، فیکساسیون کمپلمان و الایزا مورد آزمایش قرارگرفتند. هم‌چنین از نمونه‌های مثبت سرمی، غدد لنفافی و ارگان‌هایی که احتمال آلودگی می‌رفت نمونه کشت میکروبی تهیه گردید.

یافته‌ها: در مجموع از تعداد ۲۹۷ نمونه آزمایش شده با روش‌های فوق، حساسیت تست‌های رایت، رزبنگال، ۲-مرکاپتواتانل، فیکساسیون کمپلمان و الایزا به ترتیب ۸۹، ۸۱/۵، ۷۵/۳، ۸۹/۷ و ۹۳/۲ درصد تعیین گردید و ویژگی تست‌ها به ترتیب ۹۷/۴، ۹۴، ۹۶، ۹۸ و ۹۹/۳ درصد تعیین شد.

نتیجه گیری: این بررسی مشخص می‌کند تست‌های الایزا، فیکساسیون کمپلمان و رایت از سایر تست‌ها حساسیت بیشتری دارند. هم‌چنین در این مطالعه تست الایزا به عنوان حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین تست تشخیصی سرولوژیک بروسلوز شناخته شد.

واژگان کلیدی: بروسلوز، حساسیت، سرولوژی، ویژگی

***نویسنده مسئول:** اراک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اراک

Email:hosseinida@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

تب مالت بیماری مشترک بین انسان و دام و ناشی از عفونت با باکتری‌های جنس بروسلا است. انتقال این بیماری به انسان از طریق تماس با جنین سقط شده، جفت جنین، مدفوع، خون و ترشحات واژینال حیوان آلوده، مصرف فراورده‌های لبنی غیر پاستوریزه، مصرف گوشت یا فرآورده گوشتی خام و یا تماس با نمونه بافتی یا محیط کشت‌های آلوده در آزمایشگاه و از طریق عبور از مخاط یا پوست آسیب دیده یا حتی سالم صورت می‌گیرد(۱). سالیانه ۵۰۰ هزار بیمار مبتلا به بروسلوز در دنیا گزارش می‌شود که به عقیده بعضی از محققین به ازای هر مورد ثابت شده بروسلا ۲۶ مورد تشخیص داده نشده وجود دارد که گزارش نمی‌شوند(۲). علیرغم بهبود وضعیت بهداشتی مواد غذایی هنوز این بیماری یکی از مشکلات اقتصادی بهداشتی مطرح در بسیاری از نقاط دنیا از جمله خاورمیانه، اسپانیا، یونان، ترکیه، مکزیک، هند، پرو و غیره است(۳). شرایط جغرافیایی ایران، وابستگی غذایی به مواد لبنی غیر پاستوریزه و ارتباط شغلی کارگران کشتارگاه‌ها، قصاب‌ها، دامپزشکان، کادر آزمایشگاه و غیره بروسلوز را به عنوان بیماری شغلی مطرح می‌سازد. بر اساس آمار اداره مبارزه با بیماری‌های واگیر کشور سالیانه حدود ۵۰ هزار مورد بروسلوز گزارش می‌شود(۴). نظر به اهمیت این بیماری روش‌های مختلفی برای تشخیص، درمان و پی‌گیری درمان ابداع شده است که کشت میکروب روش اصلی و قطعی تشخیص بیماری است(۵). تست‌های سرولوژی معمول برای تشخیص تب مالت در ایران شامل رزبنگال، رایت سریع و رایت لوله‌ای و تست الیزا است. در مطالعه سید نوزادی در مشهد حساسیت تست رایت بر مبنای تیتر ۱/۸۰ و ۱/۱۶۰ به ترتیب ۹۱/۸ و ۸۰/۶ درصد و ویژگی تست رایت بر اساس تیتر ۱/۸۰ و ۱/۱۶۰ به ترتیب ۹۷/۵ و ۱۰۰ درصد گزارش شد(۶). در مطالعه وکیلی در کاشان حساسیت آن به ترتیب ۹۳/۷ و ۱۲/۵ درصد، ویژگی آزمون الایزای IgG و IgM به ترتیب ۷۰/۶ و ۱۰۰ درصد، ارزش اخباری مثبت آزمون الایزای IgG و IgM به ترتیب ۱۹/۴ و۱۰۰ درصد و ارزش اخباری منفی آزمون الایزای IgG و IgM به ترتیب ۹۹/۳ و ۹۴ درصد گزارش گردید(۷). در بررسی باغچه سرایی در زنجان قدرت تشخیصی، حساسیت، ویژگی، ارزش پیش بینی مثبت و منفی آزمون روزبنگال در مقایسه با آزمون انتخابی ایمونوگلبولین M الایزا به ترتیب برابر ۱۰۰، ۹۵/۶، ۷۰/۸ و ۱۰۰ درصد و در مقایسه با آزمون ایمونوگلبولین G الایزا به ترتیب برابر ۳۶/۹، ۱۰۰،۱۰۰ و ۷۳ درصد بود(۸). در مطالعه محرز و همکاران در ایران حساسیت و ویژگی الایزا به ترتیب ۹۳ و ۱۰۰ درصد گزارش شد(۹). در مطالعه مارین و همکاران که با استفاده از سه نوع فرآورده آنتی ژنتیکی مختلف، حساسیت و اختصاصیت سه تست فیکساسیون کمپلمان، ژل دیفویوژن و الایزا را برای عفونت بروسلوز دام‌ها بررسی کردند و گزارش دادند که حساسیت الایزا از همه بیشتر بود (۹۷/۶ درصد) در حالی که حساسیت تست‌های ژل دیفویوژن ۹۶/۴ درصد و فیکساسیون کمپلمان ۹۲/۷ درصد بودند(۱۰). لاکو و همکاران در مطالعه خود حساسیت تست‌های سرولوژیکی رزبنگال، رایت و الایزا را به ترتیب ۸۶/۶، ۱۰۰ و۱۰۰ درصد تعیین کردند(۱۱). آلبرت و همکاران برای تشخیص بروسلوز در ۱۵۰ رأس دام روش آنزیم ایمونواسی را به کار برده و با فیکساسیون کمپلمان و رایت مقایسه کردند و به عقیده آنان روش ایمونواسی ساده، دقیق، قابل اعتماد و خیلی حساس‌تر از تست‌های مرسوم است(۱۲). هم‌چنین در مطالعه اراج و همکاران در لبنان حساسیت الایزا ۹۱ درصد و ویژگی آن ۱۰۰ درصد گزارش شد(۱۳). هدف این تحقیق بررسی اعتبار تشخیصی آزمون‌های سرولوژی شامل آگلوتیناسیون لوله‌ای استاندارد، الایزا، فیکساسیون کمپلمان، رزبنگال و ۲-مرکاپتواتانول (2ME) و مقایسه آنها می‌باشد.

مواد وروش‌ها

در یک بررسی مقطعی - تحلیلی تعداد ۳۰۰ راس گوسفند مورد بررسی قرار گرفته و در مجموع ۲۹۷ دام وارد مطالعه شدند. این دام‌ها هیچ کدام سابقه واکسیناسیون علیه بروسلوز را نداشتند. در مجموع از این تعداد ۱۴۶ راس دام

Archive of SID

www.SID.ir

بر اساس علائم و آزمایشات سرولوژی و نتایج کشت در گروه بیمار قرار گرفتند و ۱۵۱ راس که فاقد علائم بودند و نتایج کشت و سرولوژی آنها منفی بود در گروه سالم قرار گرفتند. در این مطالعه از کیت‌های انسانی با اعمال تغییراتی استفاده شد و بر روی سرم ۲۹۷ دام آزمایشات ذیل انجام گرفت.

۱-آزمایش رزبنگال: در این آزمایش مطابق روش معمول با پی پت اتوماتیک ۳ درصد میلی لیتر سرم مورد نظر را با ۳ درصد میلی‌لیتر آنتی ژن رزبنگال که بر اساس استاندارد بین المللی و با سویه بروسلا آبورتوس ۹۹ و ۱۹ در انستیتورازی ساخته می‌شود، بر روی صفحه‌ای مجاور نموده و به مدت ۴ دقیقه در دستگاه متحرک قرار داده و پس از انقضای زمان فوق، نتیجه قرائت و ثبت گردید در این تست IgM و IgG سنجش می‌شود(۱۴).

۲-آزمایش آگلو تیناسیون رایت لوله ای: در این آزمایش طبق روش معمول از رقت $\frac{1}{10}$ تا $\frac{1}{640}$ با استفاده از آب نمک ۵ در صد به منظور کاهش پدیده پروزن انجام شد. ۵۰ درصد آگلوتیناسیون یا بیشتر در رقت $\frac{1}{10}$ در مخلوط سرم و آنتی ژن و یا بالاتر رآکتور محسوب گردید. تست رایت IgM و IgG را مورد ارزیابی قرار می‌دهد(۱۵).

۳-آزمایش ۲-مرکاپتواتانول: این آزمایش یک تست آگلوتیناسیون است که در حضور ۲-مرکاپتواتانول مولکول‌های IgM موجود در سرم شکسته شده و فقط IgG سنجش می‌شود، روش کار این آزمایش شبیه تست داخل لوله‌ای است به جز این که ماده رقیق کننده محلول ۱ درصد مول در لیتر ۲-مرکاپتواتانول می‌باشد. محلول رقیق کننده به صورت تازه و برای مصرف ۲ تا ۳ هفته تهیه شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود(۱۶).

۴-آزمایش فیکساسیون کمپلمان: این تست که نشان دهنده آنتی بادی‌های کلاس IgG می‌باشد. بر اساس روش اصلاح شده کولمر با فیکساسیون سرد که توسط آلتون و جونز توصیف گردیده است انجام و برای تهیه رقت‌ها از تامپون ورونال استفاده شد. سرم‌های مورد آزمایش در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت غیر فعال شده و آنتی ژن بروسلا آبورتوس سویه ۹۹ و ۱۹ که به نسبت $\frac{1}{100}$ رقیق شده بود مورد استفاده قرار گرفت. سرم‌هایی که حداقل ۵۰ درصد در رقت $\frac{1}{5}$ یا بالاتر واکنش نشان می‌دادند به عنوان راکتور منظور گردید(۱۷).

۵-آزمایش الایزا: نشان دهنده هر دو ایمونوگلوبولین M و G می‌باشند، اساس آزمایش الایزا بر واکنش آنزیم نشان دار شده آنتی ژن و آنتی بادی است که می‌توان برای تشخیص آنتی ژن و یا آنتی بادی استفاده نمود لذا جهت بررسی یک کلاس به خصوص ایمونوگلوبولین در سرم هم می‌توان از این تست استفاده کرد. این تست با استفاده از کیت انسانی (ساخت Automatic INC) پس از تغییرات لازم در آن انجام شد(۱۸).

نتایج تمام آزمایشات در نرم افزارEXCEL نسخه ۲۰۱۰ ذخیره شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و محاسبه فراوانی، میانگین، انحراف معیار و فاصله اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد و p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای تعیین حساسیت از تقسیم مقدار مثبت واقعی بر مجموع مقادیر منفی کاذب با مثبت واقعی ضرب در ۱۰۰ و برای تعیین ویژگی از تقسیم مقدار منفی واقعی بر مجموع مقادیر منفی کاذب با منفی واقعی ضرب در ۱۰۰ استفاده شد.

یافته ها

نتایج حاصل از آزمایش الایزا، رزبنگال، رایت، فیکساسیون کمپلمان و ۲-مرکاپتواتانول بر روی دام‌ها در جدول‌های ۱و۲ خلاصه شده است، در این بررسی حساسیت آزمایش الایزا معادل ۹۳/۲ درصد و حساسیت تست فیکساسیون کمپلمان ۸۹/۷ درصد، رایت ۸۹ درصد، رزبنگال ۸۱/۵ درصد و ۲-مرکاپتواتانول ۷۵/۳ درصد تعیین شد. هم‌چنین ویژگی تست‌های الایزا ۹۹/۳ درصد، فیکساسیون کمپلمان ۹۸ درصد، رایت ۹۷/۴ درصد، رزبنگال ۹۴ درصد و۲-مرکاپتواتانول ۹۶ درصد محاسبه گردید. ارزش اخباری مثبت آزمایشات در مورد الایزا ۹۹/۳، فیکساسیون کمپلمان ۹۷/۸، رایت ۹۷، رزبنگال ۹۳ و

Archive of SID

www.SID.ir

۲-مرکاپتواتانول ۹۴/۸ و ارزش اخباری منفی نیز برای الایزا ۹۳/۸، فیکساسیون کمپلمان ۹۰/۸، رایت ۹۰/۲، رزبنگال ۸۴ و ۲-مرکاپتواتانول ۸۰/۱ تعیین شد.

جدول ۱. فراوانی مطلق و نسبی نتایج تست ها در دو گروه سالم و بیمار

نوع ازمایش	مثبت گروه سالم	منفی گروه سالم	مثبت گروه بیمار	منفی گروه بیمار
الایزا توتال	۱(٪۰/۳)	۱۵۰(٪۵۰/۵)	۱۳۶(٪۴۵/۸)	۱۰(٪۳/۴)
فیکساسیون کمپلمان	۳(٪۱)	۱۴۸(٪۴۹/۸)	۱۳۱(٪۴۴/۱)	۱۵(٪۵/۱)
رایت	۴(٪۱/۴)	۱۴۷(٪۴۹/۵)	۱۳۰(٪۴۳/۸)	۱۶(٪۵/۴)
رزبنگال	۹(٪۳)	۱۴۲(٪۴۷/۸)	۱۱۹(٪۴۰/۱)	۲۷(٪۹/۱)
دومرکاپتو اتانول	۶(٪۲)	۱۴۵(٪۴۸/۸)	۱۱۰(٪۳۷/۱)	۳۶(٪۱۲/۱)

جدول ۲. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری منفی و ارزش اخباری مثبت تستهای مختلف

نوع ازمایش	میزان حساسیت (درصد)	میزان ویژگی (درصد)	ارزش اخباری منفی (درصد)	ارزش اخباری مثبت (درصد)
الایزا توتال	۹۳/۲	۹۹/۳	۹۳/۸	۹۹/۳
فیکساسیون کمپلمان	۸۹/۷	۹۸	۹۰/۸	۹۷/۸
رایت	۸۹	۹۷/۴	۹۰/۲	۹۷
رزبنگال	۸۱/۵	۹۴	۸۴	۹۳
2ME	۷۵/۳	۹۶	۸۰/۱	۹۴/۸

بحث

اگرچه در بیماری بروسلوز کشت مثبت بهترین روش اثبات وجود بیماری می‌باشد و تشخیص قطعی بروسلوز، با یافتن ارگانیسم‌ها در نمونه خون، مایعات بدن و نمونه‌های بافت، حاصل می‌شود ولی در مبتلایان به بروسلوز حاد ناشی از گونه بروسلا ملی تنسیس کشت خون فقط در ۷۰ درصد موارد و کشت مغز استخوان در ۹۰ درصد موارد، مثبت می‌گردد. شایان ذکر است که کشت مغز استخوان، حتی در صورت منفی بودن کشت خون، ممکن است مثبت باشد و تا مدتی پس از دریافت آنتی بیوتیک نیز مثبت باقی بماند(۱۹). البته کشت خون در مبتلایان به بروسلوز تحت حاد و مزمن ناشی از گونه بروسلا ملیتنسیس، با شیوع چندانی مثبت نمی‌شود ولی انجام آن قابل توصیه است. ضمناً در عفونت ناشی از بروسلا آبورتوس، کشت خون حتی در بهترین شرایط، در درصد کمی مثبت می‌شود. اما جدا سازی بروسلا از خون بسته به مرحله بیماری و روش کشت به علت دیر رشد بودن و نیاز به محیط استاندارد مشکل است(۲۰). با گسترش روش‌های مولکولی مثل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به خصوص در درگیری منتشر و موارد پیچیده و مزمن بیماری که تعداد میکرواورگانیسم کمتر است امکان تشخیص بیشتر می‌شود. از طرفی روش‌های باکتری شناسی در موارد تحت حاد و مزمن با موارد منفی کاذب فراوان همراه است و تشخیص‌های مولکولی هنوز در همه جا قابلیت انجام ندارد. لذا ساده‌ترین و ارزان‌ترین راه‌های تشخیص تب مالت امروزه روش‌های مبتنی بر آزمایش‌های سرولوژیک می‌باشد(۲۱). در مطالعات مختلف در کشور ما و سایر کشورها حساسیت و ویژگی تست‌های سرولوژیک با ارزش‌های متفاوتی آورده شده است. در مطالعه ما حساسیت تست الایزا توتال در مقایسه با روش فیکساسیون کمپلمان و در مقایسه با رایت لوله‌ای تفاوت معنی‌داری نداشت اما در مقایسه با روش رزبنگال و ۲-مرکاپتواتانول به طور معنی‌داری بیشتر بود. هم‌چنین در این مطالعه ویژگی تست الایزا توتال در مقایسه با تست فیکساسیون کمپلمان و در مقایسه با تست رایت لوله‌ای و ۲-مرکاپتو اتانول تفاوت معنی‌داری نداشت اما در مقایسه با روش رزبنگال به طور معنی‌داری بیشتر بود. در این مطالعه تست الایزا بیشترین حساسیت و ۲-مرکاپتواتانول کمترین حساسیت را در تشخیص بیماری داشتند و ویژگی هم در الایزا از بقیه بیشتر و در رزبنگال از همه کمتر بود. ارزش اخباری منفی در الایزا از همه بیشتر و در ۲-مرکاپتواتانول کمتر بود و بیشترین ارزش اخباری مثبت هم مربوط به الایزا و کمترین آن در رزبنگال مشاهده شد.

نتیجه گیری

در این مطالعه با توجه به عدم تفکیک در الایزا جهت بررسی IgG و IgM و هم‌چنین ضرورت تفکیک بیماری به فاز حاد و تحت حاد و مزمن و از طرفی تفاوت در

Archive of SID

www.SID.ir

نوع وگونه بروسلا نتایج حاصله چندان قابل مقایسه با سایر مطالعات نیست اما به طور کلی می‌توان گفت در مقایسه با سایر مطالعات در خصوص ارزش بالای تشخیصی الایزا و رایت و حتی تست فیکساسیون کمپلمان نتایج تقریباً مشابهی دارد اما در مورد ارزش تشخیصی تست رزبنگال ارزش اعتباری به دست آمده در مطالعه ما تا حدودی کمتر از ارزش به دست آمده در مطالعات دیگران می‌باشد. بر اساس این بررسی‌ها به نظر می‌رسد استفاده از روش الایزا در تشخیص بروسلوز بهتر است جایگزین روش اگلوتیناسیون لوله‌ای استاندارد یا همان تست رایت شود و به خصوص این موضوع در مراکز آموزشی درمانی در کشور بایستی به عنوان اولین تست در خواستی برای تشخیص بروسلوز به جای تست رایت استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کمک و مساعدت مدیریت و کارکنان سازمان دامپزشکی استان مرکزی و مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام سازمان جهاد کشاورزی استان مرکزی انجام شده که از همه آنها تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Young E. Brucella species. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 7th ed. California: Churchill Livingstone/Elsevier; 2010.
2. Gad El-Rab MO, Kambal AM. Evaluation of a Brucella enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. J Infect. 1998;36(2):197-201.
3. Al-Attas RA, Al-Khalifa M, Al-Qurashi AR, Badawy M, Al-Gualy N. Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. Ann Saudi Med. 2000;20(3-4): 224-8.
4. Ajami A, Nasrolahi M, Sharif M. Comparison of serological methods for diagnosis of brucellosis. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2006; 14(56): 74-9.
5. FAO. *Brucella melitensis* in Eurasia and the Middle East. FAO Animal Production and Health Proceedings. No. 10. Rome, 2010. Available from: http://www.fao.org/docrep/012/i1402e/i1402e00.htm Accessed: August 5, 2010.
6. Seyednozadi M, Erfanian M. Evaluation of diagnostic validity of Wright's serologic test in Brucellosis. Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2009;16(3):28-32.
7. Vakili Z, Momen Heravi M, Sharif A, Masoomi M. Sensitivity and specificity of ELISA test in diagnosis of brucellosis. Kowsar Medical Journal. 2010;15(2):95-8.
8. Baghchesaraie H, Esmaielzadeh A. Barrasie ghodrat-e tashkhisi-e azmoon-e Rose bengal dar moghayese ba Elisa dar brucellosis hadd va mozmen. ZUMS. 2003;2:25-9.
9. Mohraz M, Kariminia A, Sarafnejad A, Almaee Z. Evaluation of DOT-ELISA in diagnosis of brucellosis in Imam Khomeini hospital, 2000. Iran J Infec Dis Trop Med. 2003; 23(8): 10-3.
10. Marín CM, Jiménez de Bagués MP, Blasco JM, Gamazo C, Moriyón I, Díaz R. Comparison of three serological tests for Brucella ovis infection of rams using different antigenic extracts. Vet Rec. 1989; 125(20):504-8.
11. Lako B. Examination of sensitivity and specificity of some serological tests in diagnostics of bovine brucellosis. Vet Bulletin. 1992; 60(3): 427-30.
12. Albert k, Boehm R. Enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine and ovine brucellosis. Tieraerztliche Umschau. 1988; 43(10): 665-71.
13. Araj GF, Azzam RA. Seroprevalence of brucella antibodies among persons in high-risk occupation in Lebanon. Epidemiol Infect. 1996;117(2):281-8.
14. Gómez MC, Nieto JA, Rosa C, Geijo P, Escribano MA, Muñoz A, et al. Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic. Clin Vaccine Immunol. 2008; 15(6):1031-3.
15. Sirmatel F, Türker M, Bozkurt AI. [Evaluation of the methods used for the serologic diagnosis of brucellosis]. Mikrobiyol Bul. 2002; 36(2):161-7.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Kerkhofs P, Botton Y, Thiange P, Dekeyser P, Limet JN. Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. Vet Microbiol. 1990; 24(1): 73-80.
17. Agasthya A, Isloor S, Prabhudas K. Evaluation of brucella indirect enzyme linked immunosorbent assay in comparison with conventional serological tests in pyrexia of unknown origin cases. Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci. 2009;11(3):671-5.
18. Alişkan H. [The value of culture and serological methods in the diagnosis of human brucellosis]. Mikrobiyol Bul. 2008; 42(1):185-95.
19. Alton GG, Jones LM, Pietz DE. Laboratory techniques in brucellosis: World Health Organization; 1975.
20. Pakzad P. [Osool va tafsir-e azmayesh-haye serology balini]. 12nd ed. Tehran: Nooredanesh Pub; 2010.

Archive of SID

www.SID.ir