

Diagnostic validity of the conventional brucellosis serological tests in

Farazi AA(MD)¹, Hoseini SD(Ph.D)^{2*}

1- Department of Infectious Diseases, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Arak, Iran

Received: 15 Nov 2011 , Accepted: 11 Jan 2012

Abstract

Background: Brucellosis is a zoonotic disease in humans and animals that its control is dependent on the prevalence of diseases in animal populations. The purpose of this study was to compare the sensitivity and specificity of common diagnostic tests for brucellosis.

Materials and Methods: In an analytical cross-sectional study, 297 serum samples from an infected herd that had a history of abortion were prepared and evaluated through standard tube agglutination, Rose Bengal, 2-Mercaptoethanol, complement fixation, and ELISA tests. In addition, microbial culture was done for positive serum samples, lymph nodes, and infected organs.

Results: Based on the total 297 serum samples tested, the sensitivities for standard tube agglutination, Rose Bengal, 2-Mercaptoethanol, complement fixation, and ELISA tests were 89, 81.5, 75.3, 89.7, and 93.2% , whereas specificities were determined to be 97.4, 94, 96, 98, and 99.3%, respectively.

Conclusion: The findings of this study show that the standard tube agglutination test, complement fixation test, and ELISA are more sensitive than other tests. Moreover, ELISA test was the most sensitive and specific serological test for diagnosis of brucellosis in the present study.

Keywords: Brucellosis, Sensitivity, Serologic, Specificity

*Corresponding author:

Address: Razi Vaccine and Serum Research Institute, Arak, Iran

Email: hosseinida@yahoo.com

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 تست های رایج تشخیص بروسلوز می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی - تحلیلی، ۲۹۷ نمونه سرم از یک گله دام که سابقه سقط جنین داشتند تهیه و از نظر تست های رایت، رزینگال، ۲-مرکاپتواتانل، فیکساسیون کمپلمان و الایزا مورد آزمایش قرار گرفتند. همچنین از نمونه های مثبت سرمی، غدد لنفاوی و ارگان هایی که احتمال آلودگی می رفت نمونه کشت میکروبی تهیه گردید.

یافته ها: در مجموع از تعداد ۲۹۷ نمونه آزمایش شده با روش های فوق، حساسیت تست های رایت، رزینگال، ۲-مرکاپتواتانل، فیکساسیون کمپلمان و الایزا به ترتیب ۸۹، ۸۱/۵، ۷۵/۳، ۸۹/۷ و ۹۳/۲ درصد تعیین گردید و ویژگی تست ها به ترتیب ۹۷/۴، ۹۴، ۹۶، ۹۸ و ۹۹/۳ درصد تعیین شد.

نتیجه گیری: این بررسی مشخص می کند تست های الایزا، فیکساسیون کمپلمان و رایت از سایر تست ها حساسیت بیشتری دارند. همچنین در این مطالعه تست الایزا به عنوان حساس ترین و اختصاصی ترین 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

مقدمه

تب مالت بیماری مشترک بین انسان و دام و ناشی از عفونت با باکتری های 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 فراورده های لبنی غیر پاستوریزه، مصرف گوشت یا فرآورده گوشتی خام و یا تماس با نمونه بافتی یا محیط کشت های آلوده در آزمایشگاه و از طریق عبور از مخاط یا پوست آسیب دیده یا حتی سالم صورت می گیرد (۱). سالیانه ۵۰۰ هزار بیمار مبتلا به بروسلوز در دنیا گزارش می شود که به عقیده بعضی از محققین به ازای هر مورد ثابت شده بروسلا ۲۶ مورد تشخیص داده نشده وجود دارد که گزارش نمی شوند (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 کشتارگاه ها، قصاب ها، دامپزشکان، کادر آزمایشگاه و غیره بروسلوز را به عنوان بیماری شغلی مطرح می سازد. بر اساس آمار اداره مبارزه با بیماری های واگیر کشور سالیانه حدود ۵۰ هزار مورد بروسلوز گزارش می شود (۴). نظر به اهمیت این بیماری روش های مختلفی برای تشخیص، درمان و پی گیری درمان ابداع شده است که کشت میکروب روش اصلی و قطعی تشخیص بیماری است (۵). تست های سرولوژی معمول برای تشخیص تب مالت در ایران شامل رزبنگال، رایت سریع و رایت لوله ای و تست الیزا است. در مطالعه سید نوزادی در مشهد حساسیت تست رایت بر مبنای تیتراژ ۱/۸۰ و ۱/۱۶۰ به ترتیب ۹۱/۸ و ۸۰/۶ درصد و ویژگی تست رایت بر اساس تیتراژ 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 الیزای IgG و IgM به ترتیب ۷۰/۶ و ۱۰۰ درصد، ارزش اخباری مثبت آزمون الیزای IgG و IgM به ترتیب ۱۹/۴

و ۱۰۰ درصد و ارزش اخباری منفی آزمون الیزای 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 رزبنگال در مقایسه با آزمون انتخابی ایمونوگلوبولین M الیزا به ترتیب برابر ۱۰۰، ۹۵/۶، ۷۰/۸ و ۱۰۰ درصد و در مقایسه با آزمون ایمونوگلوبولین G الیزا به ترتیب برابر ۳۶/۹، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۷۳ درصد بود (۸). در مطالعه محرز و همکاران در ایران حساسیت و ویژگی الیزا 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 دیفیوژن و الیزا را برای عفونت بروسلوز دام ها بررسی کردند و گزارش دادند که حساسیت الیزا از همه بیشتر بود (۹۷/۶ درصد) در حالی که حساسیت تست های ژل دیفیوژن ۹۶/۴ درصد و فیکساسیون کمپلمان ۹۲/۷ درصد بودند (۱۰). لاکو و همکاران در مطالعه خود حساسیت تست های سرولوژیکی رزبنگال، رایت و الیزا را به ترتیب ۸۶/۶، ۱۰۰ و ۱۰۰ 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 حساس تر از تست های مرسوم است (۱۲). هم چنین در مطالعه اراج و همکاران در لبنان حساسیت الیزا ۹۱ درصد و ویژگی آن ۱۰۰ درصد گزارش شد (۱۳). هدف این تحقیق بررسی اعتبار تشخیصی آزمون های سرولوژی شامل آگلوتیناسیون لوله ای استاندارد، الیزا، فیکساسیون کمپلمان، رزبنگال و ۲- مرکاپتاتانول (2ME) و مقایسه آنها می باشد.

مواد و روش ها

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

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 افزار EXCEL 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 معنی دار 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 ۱ و ۲ 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 و ۲-مرکاپتواتانول ۹۶ درصد محاسبه گردید. ارزش اخباری مثبت آزمایشات در مورد الایزا ۹۹/۳، فیکساسیون کمپلمان ۹۷/۸، رایت ۹۷، رزبنگال ۹۳ و

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 بی پت اتوماتیک ۳ درصد میلی لیتر سرم مورد نظر را با ۳ درصد میلی لیتر 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 IgG و IgM 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 درصد به منظور کاهش پدیده پروزن انجام شد. ۵۰ درصد آگلو تیناسیون یا بیشتر در رقت $\frac{1}{10}$ در مخلوط سرم و آنتی ژن و یا بالاتر راکتور محسوب گردید. تست رایت IgG و IgM را مورد ارزیابی قرار می‌دهد (۱۵).

۳- آزمایش ۲-مرکاپتواتانول: این آزمایش یک تست آگلو تیناسیون 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 سانتی گراد 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 سانتی گراد به مدت نیم ساعت غیر فعال شده و آنتی

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 پلیمرز (PCR) به خصوص در درگیری منتشر و موارد پیچیده و مزمن بیماری که تعداد میکرواورگانیزم 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-مرکاپتواتانول 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

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 آزمایش	مثبت گروه سالم	مثبت سالم	مثبت گروه بیمار	مثبت گروه بیمار
الایزا توتال	۱ (۰/۴٪)	۱۵۰ (۵/۵٪)	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٪)
دومرکاپتواتانول	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 آزمایش	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 بروسوز کشت مثبت بهترین روش اثبات وجود بیماری می‌باشد و تشخیص قطعی بروسوز، با یافتن ارگانیزم‌ها در نمونه خون، مایعات بدن و نمونه‌های بافت، حاصل می‌شود ولی در مبتلایان به بروسوز 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 بروسوز تحت حاد و مزمن ناشی از گونه بروسلا ملیتنسیس، با شیوع چندانی مثبت نمی‌شود ولی انجام آن قابل توصیه است. ضمناً در

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, Esmailzadeh 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.

نوع و گونه بروسلا نتایج حاصله چندان قابل مقایسه با سایر مطالعات نیست اما به طور کلی می توان گفت در مقایسه با سایر مطالعات در خصوص ارزش بالای تشخیصی الایزا و رایت و حتی تست فیکسسیون 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 می باشد. بر اساس این بررسی ها به نظر می رسد استفاده از روش الایزا در تشخیص بروسلوز بهتر است جایگزین روش اگلوتیناسیون لوله ای 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 می شود.

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.

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.