

ارزیابی IgG-ELISA در تشخیص بروسلوزیس حاد

میترا رنجبر^{۱*}، بابک کریمی^۲، علیرضا منصف^۳، خسرومانی کاشانی^۴

۱. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، استادیار دانشگاه علوم پزشکی همدان
۲. دانشجوی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
۳. پاتولوژیست، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی همدان
۴. متخصص آمار حیاتی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی

* نشانی برای مکاتبه: همدان خیابان میرزاده عشقی بیمارستان سینا بخش عفونی، تلفن: ۰۹۱۲۵۰۴۹۹۵۱، ahmaliver@yahoo.com
دریافت مقاله: بهمن ماه هشتاد و چهار پذیرش برای چاپ: تیرماه هشتاد و چهار

چکیده

سابقه و هدف: بروسلوزیس یک مشکل بهداشتی مهم است که در سراسر جهان اتفاق می افتد و نمای بالینی آن غیر اختصاصی می باشد. میزان بروز بروسلوز انسانی در سطح جهان مشخص نمی باشد و این ناشی از تفاوت در کیفیت سیستم گزارش دهی و اطلاع رسانی در کشورهای مختلف است. بر اساس آخرین آمارهای موجود در ایران، استان همدان جزء استانهای با آلودگی شدید محسوب می شود (بروز ۱۰۷/۵ در ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال). این مطالعه با هدف تعیین قدرت IgG-ELISA در تشخیص بروسلوزیس حاد انجام گرفت.

روش کار: این مطالعه تشخیصی روی دو گروه انجام شد. گروه اول شامل مبتلایان به تب مالت حاد از مراجعین به درمانگاه عفونی بیمارستان سینای شهر همدان بوده که بیماری آنان بر اساس معاینه بالینی، مثبت شدن آزمایش Wright در عیار برابر یا بیش از ۱/۸۰ یا آزمایش 2ME در عیار برابر یا بیش از ۱/۴۰ مورد تأیید قرار گرفت. گروه دوم را افراد غیر مبتلا به تب مالت از بین دانشجویان پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان و خانواده های آنان تشکیل می دادند که سالم بودن آنان بر اساس منفی بودن یافته های بالینی، آزمایشات Wright و 2ME مورد قضاوت قرار گرفت. سپس تست IgG-ELISA بر روی افراد هر دو گروه انجام شد و حساسیت و اختصاصیت آن محاسبه گردید.

یافته ها: تعداد ۲۰۰ بیمار مبتلا به بیماری بروسلوزیس (۱۲۰ نفر مرد و ۸۰ نفر زن) و ۲۰۰ نفر گروه غیر بیمار (۹۶ نفر مرد و ۱۰۴ نفر زن) مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی گروه بیمار ۳۸/۷۴ سال (با انحراف معیار ۱۷/۳ ، حداقل ۶ سال و حداکثر ۷۶ سال) و گروه غیر بیمار ۳۳/۳۸ سال (با انحراف معیار ۱۴/۵ ، حداقل ۶ سال و حداکثر ۷۰ سال) بود. نتیجه تست wright و 2ME در همه افراد گروه غیر بیمار منفی گزارش گردید. حساسیت و اختصاصیت تست IgG-ELISA به ترتیب ۹۲٪ و ۱۰۰٪ و ارزش اخباری تست مثبت و ارزش اخباری تست منفی به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۲/۵٪ محاسبه گردید.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه انجام شده می توان چنین نتیجه گیری کرد که تست IgG-ELISA برای تشخیص بیماری بروسلوزیس یک تست سریع، راحت، حساس، دقیق و در دسترس بوده و از جهت هزینه های آزمایشگاهی و وقت مقرون به صرفه است.

واژگان کلیدی: آزمونهای رایج تشخیصی / الایزا / بروسلوز

مقدمه

بروسولوزیس یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان است که از طریق حیوانات آلوده به انسان منتقل می شود. نمای بالینی آن غیر اختصاصی می باشد (۱). این بیماری مشکل بهداشتی مهمی است که در سراسر جهان اتفاق می افتد (۲). میزان بروز بروسولوز انسانی در سطح جهان مشخص نیست و این ناشی از تفاوت در کیفیت سیستم گزارش دهی و اطلاع رسانی در کشورهای مختلف است. گزارشات نشانگر این است که حتی در کشورهای توسعه یافته نیز میزان واقعی بروز بروسولوز تا ۲۶ برابر آن چیزی است که در آمارهای رسمی منعکس می شود. در ایالات متحده در حدود ۲۰۰ مورد جدید در سال گزارش می شود که البته تخمین زده می شود تنها ۴ تا ۱۰ درصد موارد تشخیص داده شده و گزارش می شوند (۱).

در ایران نخستین بار بروسولا توسط کارشناسان انستیتوپاستور ایران در سال ۱۳۱۱ از خون یک بیمار جدا شد و از آن زمان پژوهش های زیادی به منظور بررسی تنگناهای بیماری بروسولوز و مشکل های مربوط به آن صورت گرفته و پیشرفت های قابل ملاحظه ای در زمینه تهیه انواع واکسن های دامی بروسولا بدست آمده است. بر اساس آخرین آمارهای موجود در ایران استان همدان جزء استانهای با آلودگی شدید محسوب می شود (بروز ۲۲۵ در ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال ۱۳۸۰ و ۱۰۷/۵ در ۱۰۰۰۰۰ در سال ۱۳۸۲). بررسی گزارش موارد بروسولوز و ارتباط آن با جنس در کشورهای آندمیک ، آلودگی بیشتر در جنس مذکر گزارش می شود که منعکس کننده عامل خطر وابسته به شغل است (۳).

تولید آنتی بادی های اختصاصی توسط بروسولا در میزبان القاء می شود. IgM (گلوبولین حساس به ۲- مرکاپتواتانل) یک هفته پس از شروع بیماری ظاهر می شود و در ماه سوم به حداکثر رسیده و سپس به تدریج کاهش می یابد. IgG دو تا سه هفته پس از شروع بیماری ظاهر شده و در هفته ششم به حد اکثر می رسد و تا وقتی عفونت فعال باشد در حد بالا باقی می ماند و در صورت کنترل بیماری عیار IgG پائین آمده و محو می شود. با عود بیماری تیتراژ IgG و IgM هر دو افزایش پیدا می کنند (بر خلاف بسیاری از بیماری های عفونی). IgE و IgA نیز در جریان بروسولوز افزایش پیدا می نمایند. عیار IgE ضد بروسولائی کمی پس از IgM و اندکی قبل از IgG در سرم ظاهر می شود. آنتی بادی های بلوکان در جریان بیماری و پس از آنتی بادی های آگلوتینه کننده در سرم پدیدار می شوند. این آنتی بادی ها به حرارت مقاوم بوده و از گروه IgG و آلفا ۲- گلوبولین (IgG) می باشند (۳ و ۲).

با توجه به علائم غیر اختصاصی بروسولوز و تقلید سایر بیماریهای تب دار و ماهیت خود میکروارگانیزم تشخیص بیماری بروسولوز با دشواریهایی همراه است. تشخیص قطعی بروسولوزیس از طریق جدا کردن باکتری از خون ، مایعات یا بافتهای بدن است. اما به دلیل محدودیت هایی که این روش دارد به عنوان تست تشخیصی بروسولوز استفاده نمی شود. از مشکلات عمده روش کشت رشد آهسته میکروارگانیزم، عدم رشد آن در محیط کشت های معمول و احتمال آلودگی کارکنان آزمایشگاه است. برای اطمینان از منفی بودن کشت های خون و مغز استخوان باید حداقل به مدت شش هفته بررسی شوند. در اکثر موارد کشت خون در عفونت های تحت حاد منفی است. حساسیت کشت خون در مطالعات مختلف بین ۱۵ تا ۳۵ درصد گزارش شده است (۵-۱).

آزمایشات سرولوژیک متنوعی برای تشخیص بروسولا ابداع شده اند. تست SAT (Standard Agglutination Test) به طور معمول استفاده

می شود. آنتی ژنی که در SAT استفاده می شود از B.Abortus گرفته می شود که با آنتی بادهای علیه B.Abortus, B.Suis, B.Melitensis و واکنش می دهد اما با B.Canis واکنش نمی دهد. افتراق عفونت فعال و عفونت قبلی درمان شده با SAT امکان پذیر نیست. برای این منظور از تست 2ME استفاده می شود که در این تست IgM به وسیله ۲- مرکاپتواتانل غیرفعال شده و IgG اندازه گیری می شود. یکی از موارد منفی کاذب شدن تست SAT به دلیل وجود آنتی بادی های بلوکان است (پدیده پروزون) که این مسأله با رقیق کردن سرم بیمار در حد ۱/۱۲۸۰ از بین می رود (۳-۱).

واکنش متقاطع سرولوژیکی بین گونه های بروسولا، یرسینیا، فرانسیلا تولرانسیس، ویبریو کلره و سالمونلا اتفاق می افتد که به دلیل شباهت O-Specific Side در زنجیره لیپو پلی ساکاریدی این ارگانیزم ها می باشد. SAT همچنین با آنتی بادی های بیمارانی که بر علیه این بیماریها واکسینه شده اند نیز واکنش می دهد (۱، ۲ و ۴).

تست ELISA آنتی بادی های تمام گونه های بروسولا که در انسان ایجاد بیماری می کنند را اندازه گیری می کند. این تست تمام سلول میکروارگانیزم و لیپوپولی ساکاریدی که در اثر هر چهار گونه بیماریزای بروسولا ایجاد شده است را مشخص می کند (۱ و ۲).

با توجه به اختلافهای موجود میان حساسیت و اختصاصیت های اشاره شده در مطالعات مختلف برای تست ELISA و همچنین با توجه به این که کشور ایران و بخصوص شهر همدان به عنوان یکی از کانون های بیماری بروسولوزیس در جهان بشمار می رود و تنها الگوی موجود و در دسترس نتایج ضد و نقیض در آزمایشگاه های مختلف می باشد و همچنین با توجه به مشکلات فراوان در راه تشخیص این بیماری که به معدودی از آن ها اشاره شد، لذا این مطالعه با هدف تعیین قدرت تست ELISA در تشخیص تب مالت حاد انجام شد.

روش کار

این مطالعه تشخیصی به مدت ۱ سال روی ۲۰۰ بیمار مبتلا به بروسولوزیس مراجعه کننده به بخش و درمانگاه عفونی بیمارستان سینای شهر همدان و مطب متخصص عفونی و ۲۰۰ فرد سالم انجام گرفت. در این مطالعه شاخص تشخیصی استاندارد تب مالت با یافته های بالینی انجام شده توسط متخصص بیماریهای عفونی و مثبت شدن حداقل یکی از دو تست Wright با عیار ۱/۸۰ و بالاتر یا تست 2ME با عیار ۱/۴۰ و بالاتر تعریف گردید. گروه افراد غیر بیمار این مطالعه را دانشجویان پزشکی شاغل به تحصیل در دانشگاه علوم پزشکی همدان و تعدادی از خانواده های آنان تشکیل دادند. این گروه فاقد سابقه مصرف لبنیات غیر پاستوریزه و تماس شغلی مرتبط و هرگونه یافته بالینی غیر طبیعی در معاینه فیزیکی بوده و هر دو آزمایش Wright و 2ME آنان نیز منفی بود.

با انجام آزمایش IgG-ELISA روی هر دو گروه حساسیت و اختصاصیت آن محاسبه گردید. برای محاسبه اختلاف میانگین تست IgG-ELISA در دو گروه از آزمون t-test استفاده گردید.

برای انجام تست SAT از روش Standard Tube Agglutination Test و آنتی ژن B.Abortus انستیتو پاستور ایران استفاده گردید و برای جلوگیری از پدیده پروزون در این تست نمونه ها تا رقت ۱/۱۲۵۰ مورد بررسی قرار گرفتند.

بحث

در این مطالعه تعداد ۲۰۰ بیمار مبتلا به بیماری بروسلوزیس و ۲۰۰ نفر گروه غیر بیمار مورد بررسی قرار گرفته و حساسیت و اختصاصیت تست IgG-ELISA به ترتیب ۹۲٪ و ۱۰۰٪ و مقدار ارزش اخباری تست مثبت و ارزش اخباری تست منفی به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۲/۵٪ محاسبه گردید.

تست SAT شایعترین تست آزمایشگاهی است که برای تشخیص بیماری بروسلوزیس به کار می رود. اما در مطالعات مختلف نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب برای این تست گزارش شده است. تیتري که به عنوان آستانه تیتري مثبت قلمداد گردد در کشورهای مختلف متفاوت است و بستگی به بومی بودن بروسلوزیس در منطقه و درجه مواجهه با گونه های بروسلا دارد. در کشورهای مختلف تیتريهای متفاوتی بین ۱/۴۰ تا ۱/۳۲۰ با یا بدون مثبت شدن کشت خون به عنوان بروسلوزیس فعال در نظر گرفته شده است. در این مطالعه تیتري تست Wright بصورت ۱/۸۰ و بالاتر و تیتري تست 2ME بصورت ۱/۴۰ و بالاتر به عنوان آستانه تست مثبت در نظر گرفته شدند(۵).

اگرچه در تعدادی از مقالات کشت خون را به عنوان استاندارد طلایی تشخیصی برای مطالعه خود انتخاب کرده اند اما این روش به دلیل محدودیت و کاستی هایی که دارد به عنوان تست تشخیصی استفاده نمی شود و حساسیت این تست در مقالات مختلف در بیماری فعال بین ۱۵ تا ۳۵ درصد گزارش شده است. در تعدادی از مقالات ترکیبی از موارد تاریخیچه مثبت از برخورد با حیوانات اهلی و علائم بالینی به علاوه نتایج تستهای سرولوژی مختلف به عنوان استاندارد طلایی تعریف شده اند. در این مطالعه همه ۲۰۰ بیماری که وارد مطالعه گردیدند در پیگیری های بعدی پاسخ مناسبی به درمان ضد بروسلا از خود نشان دادند که این موضوع می تواند بیانگر این واقعیت باشد که تشخیص بیمار بودن با استفاده از تعریف استاندارد طلایی ارائه شده در این طرح به درستی انجام شده است(۵و۷).

در مطالعه ای در عربستان که توسط Memish و همکاران (سال ۲۰۰۲) بر روی ۶۸ بیمار مبتلا به بروسلوزیس با کشت خون مثبت و ۷۰ نفر گروه شاهد انجام شده است حساسیت تست SAT برای بیماران بروسلوزی ۹۵/۶٪ و اختصاصیت آن ۱۰۰٪ گزارش شده است. در حالی که حساسیت تست IgG- ELISA ۴۵/۶٪ و اختصاصیت آن ۹۷/۱٪ و حساسیت تست IgM- ELISA ۷۹/۱٪ و اختصاصیت آن ۱۰۰٪ بوده است و حساسیت و اختصاصیت IgG و IgM ترکیبی به ترتیب ۹۴/۱٪ و ۹۷/۱٪ می باشد. حساسیت IgG ELISA یا IgM ELISA پایین تر از SAT بوده، ولی IgG و IgM ترکیبی حساسیت و اختصاصیت مشابهی با SAT داشت (۵).

در مطالعه دیگری که توسط Osoba (سال ۲۰۰۱) بر روی ۸۳ بیمار مبتلا به بروسلوزیس و ۴۴ نفر گروه شاهد انجام شد حساسیت کشت خون ۳۶/۱٪ گزارش شده است و حساسیت و اختصاصیت تست IgG- ELISA به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۴٪ گزارش شده است. وی معتقد است ELISA تست تشخیصی عالی، قابل اعتماد، حساس، سریع و آسان برای تشخیص بیماری بروسلوزیس می باشد (۷).

Mongini (سال ۱۹۹۰) که دو روش ELISA و Dot ELISA را در بیماری بروسلوزیس مورد بررسی قرار داده است هر دو تست را حساس و اختصاصی برای کشف آنتی بادی های ضد بروسلا گزارش کرده است (۸).

Sippel (سال ۱۹۸۲) و Gad-El-rab (سال ۱۹۹۸) و Mathai (سال ۱۹۹۶) و Araj (سال ۱۹۸۶) نیز در مطالعات خود تست ELISA را تستی حساس و اختصاصی برای تشخیص بیماری بروسلوزیس گزارش کرده اند (۹-۱۲).

جهت انجام آزمایش IgG-ELISA از کیت های سرولوژی IBL آلمان (Immuno Biological Laboratories) استفاده گردید. نمونه های پلاسمايي که در دمای ۸ - ۲ درجه سانتی گراد نگهداری می شدند به نسبت ۱:۱۰۱ با رقیق کننده رقیق شدند و یک ساعت در دمای اتاق اینکوبه شدند. سپس ۱۰۰ μl آنزیم کونژوگاسیون اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق اینکوبه شد سپس ۱۰۰ μl از محلول TMB اضافه شد و ۲۰ دقیقه اینکوبه گردید. سپس ۱۰۰ μl محلول پایانی TMB اضافه گردید و جذب آن در طول موج ۴۵۰ nm خوانده شد. مقادیر بزرگتر و مساوی ۰/۹ به عنوان نتیجه تست مثبت و مقادیر کمتر از ۰/۹ به عنوان نتیجه تست منفی قلمداد گردیدند.

یافته ها

در این مطالعه تعداد ۲۰۰ بیمار مبتلا به بیماری بروسلوزیس و ۲۰۰ نفر گروه غیر بیمار مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی گروه بیمار ۳۸/۷۴ سال (با انحراف معیار ۱۷/۳، حداقل ۶ سال و حداکثر ۷۶ سال) و گروه غیر بیمار ۳۳/۳۸ سال (با انحراف معیار ۱۴/۵، حداقل ۶ سال و حداکثر ۷۰ سال) بود. از ۲۰۰ نفر افراد گروه بیمار ۸۰ نفر زن و ۱۲۰ نفر مرد و از ۲۰۰ نفر گروه غیر بیمار ۱۰۴ نفر زن و ۹۶ نفر مرد بودند.

نتیجه آزمایش wright و 2ME برای همه افراد گروه غیر بیمار منفی گزارش گردید. در افراد گروه بیمار حداقل عیار آزمایش wright ۱/۸۰ و حداکثر آن ۱/۱۲۸۰ و حداقل عیار آزمایش 2ME ۱/۴۰ و حداکثر آن ۱/۶۴۰ گزارش گردید.

میانگین عیار آزمایش IgG-ELISA در گروه غیر بیمار ۰/۲۸۳۶ (با انحراف معیار ۰/۱۳، حداقل ۰/۱۰ و حداکثر ۰/۷۰) بود. طبق تعریف هیچیک از افراد این گروه نتیجه تست مثبت ($\geq 0/9$) نداشتند. میانگین عیار آزمایش IgG-ELISA در گروه بیمار ۱/۷۸ (با انحراف معیار ۰/۷۸، حداقل ۰/۲۶ و حداکثر ۳/۴۰) بود. از میان این افراد ۱۶ نفر نتیجه تست منفی داشتند ($< 0/9$). اختلاف میانگین عیار آزمایش IgG-ELISA در گروه غیر بیمار و بیمار از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0/05$). حساسیت و اختصاصیت تست IgG-ELISA به ترتیب ۹۲٪ و ۱۰۰٪ بدست آمد. مقدار ارزش اخباری تست مثبت و ارزش اخباری تست منفی به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۲/۵٪ محاسبه گردید (جدول ۱).

جدول ۱: توزیع فراوانی نتیجه تست IgG-ELISA در بیماران مبتلا به بروسلوزیس و در غیر مبتلایان به بروسلوزیس

نتیجه تست IgG-ELISA	مبتلا به بروسلوز	غیر مبتلا به بروسلوز	جمع
مثبت	۱۸۴ (۹۲)	۰ (۰)	۱۸۴
منفی	۱۶ (۸)	۲۰۰ (۱۰۰)	۲۱۶
جمع	۲۰۰ (۱۰۰)	۲۰۰ (۱۰۰)	۴۰۰

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه انجام شده می توان چنین نتیجه گیری کرد که تست IgG-ELISA برای تشخیص بیماری

بروسلوزیس یک تست سریع ، راحت ، حساس ، دقیق و در دسترس بوده و از جهت هزینه های آزمایشگاهی و وقت تستی با صرفه (cost-effective) می باشد.

REFERENCES

1. Monir Madkour M, Dennis L.Kasper. Brucellosis. In: Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jamesom, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. 15th ed. Mc Graw Hill; 2001, p: 986-90.
2. Denis J.Mikolich, John M.Boyce. Brucella Species. In: Gerald L. Mandell, R.Gordon Douglas, John E. Bennet, editors. Principles & Practice of Infectious Disease. 3rd ed. Newyork, Edinburgh, London, Melburne: Churchill Living Stone; 1990: P. 1735-42.
۳. پناهی محمود، تب مالت، در کتاب اپیدمیولوژی کنترل بیماریهای شایع در ایران، مؤلفین: عزیزی فریدون، حاتمی حسین، جانقربانی محسن. چاپ دوم، تهران، نشر اشتیاق، ۱۳۸۰، صفحات ۵۴۱-۵۳۲.
4. Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC. Occurrence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between Brucella and other alpha-proteobacteria. Clin Diagn Lab Immunol. 2004 Sep; 11(5): 868-73.
5. Memish ZA, Almuneef M, Mah MW, Qassem LA, Osoba AO, Comparison of The Brucella Standard Agglutination Test with The ELISA IgG & IgM in Patients with Brucella Bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis 2002 Oct; 44 (2): 129-32.
6. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Lopes G. Sencitivity & Specificity of an Indirect Enzyme- Linked Immuno Assay for The Diagnosis of Brucella Canis Infection in Dogs. J Med Microbiol 2002 Aug; 51 (8): 656-60.
7. Osoba AO, Balkhy H, Memish Z, Khan MY, Al-Thagafi A, Al Shareef B, Al Mowallad A, Oni GA. Diagnostic value of Brucella ELISA IgG and IgM in bacteremic and non-bacteremic patients with brucellosis. J Chemother. 2001 Apr; 13 Suppl 1:54-9.
8. Mongini C, Fernandez T, Turovetzky A, Hajos SE. Comparative study of cell-immunoenzymatic methods for the estimation of IgG and IgM anti-Brucella antibodies in the diagnosis of human brucellosis. J Appl Bacteriol. 1990 Jul; 69(1): 86-91.
9. Sippel JE, El-Masry NA, Farid Z. Diagnosis of human brucellosis with ELISA. Lancet. 1982 Jul 3; 2(8288): 19-21.
10. Gad El-Rab MO, Kambal AM. Evaluation of a Brucella enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. J Infect. 1998 Mar; 36(2): 197-201.
11. Mathai E, Singhal A, Verghese S, D'Lima D, Mathai D, Ganesh A, Thomas K, Moses P. Evaluation of an ELISA for the diagnosis of brucellosis. Indian J Med Res. 1996 Jun; 103:323-4.
12. Araj GF, Lulu AR, Mustafa MY, Khateeb MI. Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. J Hyg (Lond). 1986 Dec; 97(3): 457-69.

13. Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P. Comparison between LightCycler Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. *Clin Infect Dis*. 2005 Jan 15; 40(2): 260-4. Epub 2004 Dec 20.
14. Sirmatel F, Turker M, Bozkurt AI. [Evaluation of the methods used for the serologic diagnosis of brucellosis] *Mikrobiyol Bul*. 2002 Apr; 36(2): 161-7.
15. Saz JV, Beltran M, Diaz A, Agulla A, Merino FJ, Villasante PA, Velasco AC. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis. *Eur J Clin Microbiol*. 1987 Feb; 6(1): 71-4.
16. Geraci D, Locorotondo G, Parlato A, Cocchiara R, Caracappa S, Scarlata F, Cascio A. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella melitensis*-associated antigens. *Microbiologica*. 1988 Jul; 11(3): 213-8.
17. De Klerk E, Anderson R. Comparative evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the laboratory diagnosis of brucellosis. *J Clin Microbiol*. 1985 Mar; 21(3): 381-6.
18. Thakur SD, Thapliyal DC. Seroprevalence of brucellosis in man. *J Commun Dis*. 2002 Jun; 34(2): 106-9.
19. Serra J, Vinas M. Laboratory diagnosis of brucellosis in a rural endemic area in northeastern Spain. *Int Microbiol*. 2004 Mar; 7(1): 53-8.