المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٣، عدد إضافي ١، ٢٠٠٩ (٥٩-٦٤)
وقائع المؤتمر العلمي الخامس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

استخدام اختبار اليزا الحليب للكشف عن الاضداد الناتجة عن تلقيح النعاج بلقاح البروسيلا المالطية العترة Rev.1

وسام سالم الخفاجي

فرع الطب الباطني والوقائي، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة

تضمنت الدراسة 18 نعجة حلوب محلية، قسمت الى ثلاثة مجاميع متساوية تم تلقيحها بلقاح العترة Rev.1 بلغت النسبة المئوية لحساسية اختبار وردية البنكال 50% و50% و0% في اليوم الرابع في حيوانات المجموعة الاولى التي لقحت بجرعة 1× 10^9 وحدة مكونة للمستعمرات/مل تحت الجلد و المجموعة الثانية التي لقحت بجرعة 1× 10^9 وحدة مكونة للمستعمرات/مل في الملتحمة والمجموعة الثالثة التي لقحت بجرعة 1× 10^7 وحدة مكونة للمستعمرات/مل تحت الجلد على التوالي ثم ارتفعت لتصل إلى 100% في الأيام 7 و 30 و 15 في المجاميع الاولى والثانية والثالثة على التوالي، واستمرت إلى نهاية التجربة وبلغت الحساسية لاختبار التلازن الأنبوبي 100% في الأيام 7 و 15 في المجموعتين الاولى والثالثة على التوالي في حين وصلت الى أعلى نسبة والتي بلغت 80% في اليوم 30 في المجموعة الثانية. سجل اختبار اليزا الحليب نسبة حساسية بلغت 100% من بداية التجربة والى نهايتها في اليوم 60 ولكافة المجاميع الملقحة، ولوحظ من نتائج اختبار التلازن الأنبوبي أن أعلى المعدلات لمعايير الأضداد سجلت في المجموعة الاولى ثم المجموعة الثالثة تليها المجموعة الثانية. لوحظ وجود علاقة معنوية طردية بين قيم الكثافة الضوئية لاختبار اليزا الحليب ونتائج اختبار التلازن الأنبوبي إذ كانت قيمة معامل الارتباط r=0.80 تحت مستوى معنوية P<0.05. كانت نتيجة الزرع الجرثومي سالبة لعينات الحليب والمسحات المهبلية للنعاج في المجاميع الملقحة كافة.

Using of milk ELISA test to investigate the presence of antibodies resulting from vaccination of ewes with *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccine

W. S. Al-Khafaji

Department of Internal and Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

This study was included 18 of native lactating ewes divided into three equal groups which was vaccinated with Rev.1 vaccine. The sensitivity of Rose Bengal test (RB) was 50% ,50% and 0% in the 4th day postvaccination in animals of 1st group which vaccinated with dose 1×10^9 colony forming units(CFU)/ml via subcutaneous route, the 2nd group vaccinated with dose 1×10^9 CFU/ml via conjunctival route the 3rd group vaccinated with dose 1×10^7 CFU/ml via subcutaneous route respectively, then increased to reach 100% in days 7, 30 and 15 in vaccinated animal groups 1st, 2ndand 3rd respectively and continue till the final of experiment, the sensitivity of serum agglutination test (SAT) reached 100% in 7th and 15th day in 1st and 3rd groups respectively, while, it reached the highest value 80% in 30th day in 2nd group. The milk ELISA showed sensitivity reached 100% from the starting of experiment till the final in the 60 day postvaccination in all vaccinated groups, the results of SAT revealed the highest antibody titers was in the 1st and 3rd then 2nd groups. also showed significant correlation between optical density (O.D.) values of milk ELISA and the results of SAT while the correlation coefficient value was r= 0.80 at the level P<0.05. The results of bacterial culture was negative for milk and vaginal swabs of ewes in all vaccinated groups.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

يعد مرض البروسيلوسز من الأمراض المستوطنة في معظم دول البحر المتوسط والشرق الأوسط وأجزاء أخرى من العالم (1) يسبب المرض خسائر أقتصادية كبيرة في الإنتاج الحيواني فضلاً عن كونه من الأمراض المشتركة التي تصيب الانسان (2-4) يحتاج التشخيص الدقيق للمرض إلى عزل المسبب المرضي، وبسبب الصعوبات التي تواجه العزل وظهور نتائج سالبة على الرغم من وجود الإصابة لذا اعتمدت الاختبارات المصلية في التشخيص لتسهيل عملية كشف الإصابة (5) ومن الاختبارات المستخدمة لتشخيص المرض هي اختبارات وردية البنكال وتثبيت المتمم والتلازن الانبوبي ولكن ليس باستطاعة هذه الاختبارات التمييز بين الحيوانات الملقحة والحيوانات المصابة طبيعياً (6) فضلاً عن النتائج السلبية الكاذبة التي تظهرها تلك الاختبارات (7) ولهذا تم تطوير العديد من الاختبارات المستخدمة في التشخيص ومنها اختبار الاليزا غير المباشر والاليزا التنافسي واليزا الحليب التي بدورها تسهم في تقليل بعض مساوئ الاختبارات المصلية أنفة الذكر (8-10). يعد اختبار الاليزا غير المباشر من الاختبارات التي تمتلك حساسية عالية للكشف عن تواجد الاضداد الناتجة عن الإصابة او التلقيح (11) وكذلك الكشف عن الإصابات الكامنة والمبكرة بمرض البروسيلوسز في المجترات (13,12). يستخدم لقاح جراثيم البروسيلا المالطية العترة Rev.1 في المناطق الموبوءة بالمرض والذي يعد افضل لقاح متوفر للوقاية من المرض في المجترات الصغيرة (14-16)، و لهذا اللقاح تأثيرات جانبية عديدة اهمها انه يحفز على انتاج الاضداد الخاصة لسلسلة O لمتعدد السكريد الشحمي التي تماثل تلك الاضداد الناتجة عن الإصابة بجراثيم البروسيلا مما يزيد من مشكلة التداخل مع نتائج الاختبارات المصلية المستخدمة للتشخيص وبالتالي تسبب إعاقة للتفريق بين الحيوانات الملقحة عن الحيوانات المصابة بالمرض (18,17) وكذلك يسبب بعض حالات الإجهاض في الحيوانات الحوامل وطرح جراثيم العترة اللقاحية في الحليب والافرازات المهبلية والرحمية والاجنة المجهضة بعد التلقيح (17,16) وكذلك خطورة إصابة الانسان بالمرض عن طريق تناول حليب الحيوانات الملقحة (19)، ولاجل ذلك وضعت هذه الدراسة لتحقيق الاهداف الآتية :

١- التعرف على قدرة اختبار اليزا الحليب في التمييز بين الحيوانات الملقحة والحيوانات المصابة طبيعيا بالمرض.
٢- الكشف عن تواجد اضداد لقاح العترة Rev.1 في حليب النعاج الملقحة بالعترة Rev.1 باستخدام اختبار اليزا الحليب.
٣- محاولة إمكانية عزل جراثيم العترة اللقاحية من حليب النعاج الملقحة بلقاح العترة Rev.1.
٤- إيجاد النسبة المئوية لحساسية الاختبارات (اليزا الحليب ووردية البنكال واختبار التلازن الأنبوبي) لمجاميع النعاج الملقحة.

المواد وطرائق العمل

حيوانات الدراسة وطريقة إعطاء اللقاح: شملت الدراسة (18) نعجة حلوب تابعة لكلية الزراعة والغابات / قسم الثروة الحيوانية، حيث قسمت هذه الحيوانات عشوائياً إلى ثلاث مجاميع بالتساوي اعتماداً على طريقة إعطاء اللقاح والجرعة، إذ تم تخفيف اللقاح حسب تعليمات الشركة المجهزة (CZ Veterinaria ألاسبانية) وذلك بإذابة اللقاح المجفد بالمحلول المخفف الخاص به سعة (50 مل) للحصول على الجرعة القياسية الكاملة 1×10^9 وحدة مكونة للمستعمرات (CFU)/مل وللحصول على الجرعة المخفضة 1×10^7 (CFU)/مل، تم وضع 1 مل من المحلول السابق (ذو التخفيف 10^9 (CFU)) في 99 مل من محلول الملح الفسلجي. إذ تم تلقيح حيوانات المجموعة الأولى بجرعة 1×10^9 (CFU)/مل تحت الجلد و حيوانات المجموعة الثانية بجرعة 1×10^9 (CFU)/مل عن طريق التقطير في ملتحمة العين والمجموعة الثالثة بجرعة 1×10^7 (CFU)/مل تحت الجلد.

تم جمع عينات الدم والحليب من حيوانات الدراسة قبل إعطاء اللقاح (للتأكد من خلوها من تواجد أضداد جراثيم البروسيلا) ومن ثم في الأيام 4 و7 و15 و30 و40 و60 بعد إعطاء اللقاح.

وقسمت عينات الحليب إلى قسمين القسم الاول تم إجراء اختبار اليزا الحليب عليه للتحري عن تواجد أضداد جراثيم البروسيلا فيه والقسم الأخر تم تحضيره حسب طريقة (20) للاستنبات الجرثومي المباشر على وسط أكار البروسيلا المحور المجهز من شركة (HIMEDIA) الهندية.

تم جمع المسحات المهبلية من النعاج الملقحة في المجاميع كافة في الايام 4 و7 و15 و30 و40 و60 بعد إعطاء اللقاح وتم وضع المسحات في انابيب زجاجية حاوية على مرق البروسيلا المجهز من شركة (HIMEDIA) الهندية، وتم حضنها بدرجة حرارة 37م لمدة 3-7 أيام ومن ثم تم استنباتها على وسط أكار البروسيلا المحور حسب طريقة (20).

اجري اختبار وردية البنكال المجهز من شركة GOKHAN- التركية على المصل حسب تعليمات الشركة المجهزة للمستضد. كذلك اختبار التلازن الأنبوبي وتم إجراؤه حسب (20)، للكشف عن أضداد البروسيلا في المصل. اختبار اليزا الحليب والمجهز من شركة Svanova- السويدية وتم إجراؤه حسب تعليمات الشركة المجهزة لعدة الاختبار.

تم تحليل البيانات احصائياً باستخدام اختبار One way analysis of variance test (ANOVA) واختبار معامل الارتباط واعتمد مستوى الاختلاف المعنوي للاختبارات تحت مستوى احتمال ($P<0.05$) للتفريق بين النتائج المعنوية وغير المعنوية باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS.

النتائــج

اولاً: نتائج حساسية الاختبارات المستخدمة في مجاميع النعاج الملقحة

أظهرت نتائج الدراسة أن النسبة المئوية لحساسية اختبار وردية البنكال (الحساسية تعني نسبة الحيوانات الملقحة التي أعطت نتيجة موجبة للاختبار) كانت 50% و50% و0% في اليوم الرابع بعد التلقيح في حيوانات المجاميع الأولى والثانية والثالثة على التوالي ثم ارتفعت النسبة المئوية لتصل الى 100% في الأيام 7 و30 و 15 في حيوانات المجاميع الأولى والثانية والثالثة على التوالي واستمرت النسبة المئوية للحساسية والبالغة 100% الى نهاية مدة الدراسة ولكافة المجاميع الملقحة، أما النسبة المئوية لحساسية اختبار التلازن الأنبوبي بلغت 100% في الأيام 7 و15 في حيوانات المجموعتين الأولى والثالثة على التوالي بينما بلغت نسبة الحساسية 80% في اليوم 30 في حيوانات المجموعة الثانية، واستمرت النسبة المئوية للحساسية والبالغة 100% في حيوانات المجموعة الاولى بينما انخفضت إلى نسبة 40% في حيوانات المجموعتين الثانية والثالثة في اليوم 60 بعد التلقيح. في حين سجل اختبار اليزا الحليب أعلى نسبة حساسية من بين الاختبارات المستخدمة حيث بلغت النسبة المئوية 100% بداءت من اليوم الرابع بعد التلقيح واستمرت إلى نهاية مدة الدراسة ولكافة المجاميع الملقحة (جدول 1).

ثانياً: نتائج معيار الاضداد

بينت نتائج اختبار التلازن الأنبوبي لمجاميع النعاج الملقحة بأن أعلى مستوى لمعيار الأضداد كان في اليوم السابع بعد التلقيح في المجموعة الأولى وبلغ (320.0 ± 0.0) اما في المجموعتين الثانية والثالثة كان في اليوم15 بعد التلقيح وبلغ (80.0 ±22) و (88.0±19.6) على التوالي، ثم انخفض معيار الأضداد تدريجياً في الأيام التالية ليصل إلى أدنى مستوى له في اليوم 60 بعد التلقيح ولكافة المجاميع الملقحة، وسجلت اعلى المعدلات لمعايير الأضداد في المجموعة الأولى تلتها المجموعة الثالثة ومن ثم المجموعة الثانية وعلى امتداد مدة الدراسة (جدول 2).

لوحظ من نتائج الدراسة وجود علاقة طردية معنوية بين نتائج اختباري اليزا الحليب والتلازن الأنبوبي حيث كانت قيمة معامل الارتباط بينهما r = 0.80 وتحت مستوى معنوية P<0.05 وهذا يدل أن العينات ذات الكثافة الضوئية العالية باختبار الاليزا تمتلك معيار عالي للأضداد ايضاً والعكس صحيح (الشكل 1).

الجدول (1) النسب المئوية لحساسية الاختبارات المستخدمة في مجاميع النعاج الملقحة بلقاح Rev.1.

الأيام بعد التلقيح	الأولى (لقحت بجرعة 10^9 تحت الجلد)			الثانية (لقحت بجرعة 10^9 في الملتحمة)			الثالثة (لقحت بجرعة 10^7 تحت الجلد)		
	وردية البنكال	التلازن الأنبوبي	اليزا الحليب	وردية البنكال	التلازن الأنبوبي	اليزا الحليب	وردية البنكال	التلازن الأنبوبي	اليزا الحليب
4	50	50	100	50	0	100	0	0	100
7	100	100	100	60	0	100	60	60	100
15	100	100	100	80	60	100	100	100	100
30	100	100	100	100	80	100	100	80	100
40	100	100	100	100	60	100	100	60	100
60	100	100	100	100	40	100	100	40	100

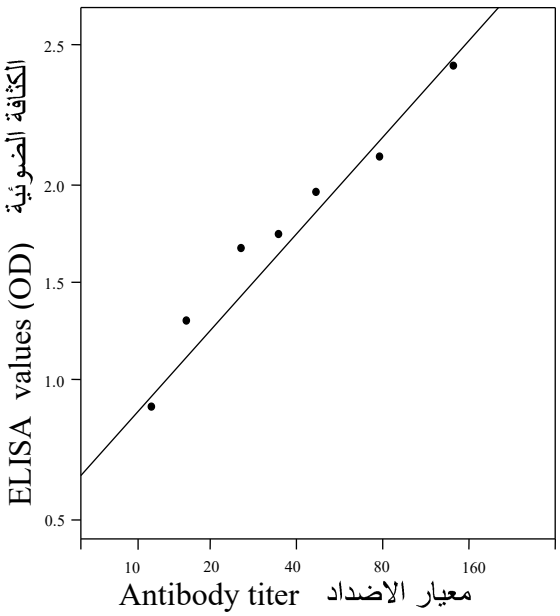
• القيم تمثل النسبة المئوية (عدد الحيوانات 6 في كل مجموعة).
• الحساسية : نسبة الحيوانات الملقحة التي أعطت نتيجة موجبة للاختبار التشخيصي.

الجدول (2) معدلات معيار الأضداد المتكونة في النعاج بعد التلقيح بلقاح Rev. 1 باستخدام اختبار التلازن الأنبوبي.

الايام بعد التلقيح	الأولى (لقحت بجرعة 10^9 تحت الجلد)	الثانية (لقحت بجرعة 10^9 في الملتحمة)	الثالثة (لقحت بجرعة 10^7 تحت الجلد)

A 2.0 ±18.0	A 0.0 ±10.0	A 6.0 ±16.0	4
B, C, c 9.8 ± 44.0	A, b 0.0 ±10.0	A,.a 0.0 ± 320.0	7
B, b 19.6 ± 88.0	B, b 22 ± 80.0	B, a 0.0 ± 160.0	15
b 12.0 ± 52.0	C, b 9.8 ± 44.0	C, a 0.0 ± 80.0	30
C 11.0 ± 40.0	A, C, b 12.0± 38.0	C, a 8.0 ± 72.0	40
C 11.6 ± 36.0	A, b 0.0 ± 10.0	D, a 9.7 ± 56.0	60

• القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي.
• المعدلات التي تحتوي على الحروف الانكليزية الصغيرة المختلفة أفقيا والحروف الانكليزية الكبيرة المختلفة عموديا ً تدل على وجود اختلافات معنوية عند مستوى معنوية ($P<0.05$).



الشكل (1) يوضح العلاقة بين قيم الكثافة الضوئية (OD) لاختبار الاليزا ومعيار الاضداد باستخدام اختبار التلازن الأنبوبي.

المناقشة

أظهرت نتائج الدراسة أن النسبة المئوية لحساسية اختبار وردية البنكال كانت 50 % و 50% و0% في اليوم الرابع بعد التلقيح في حيوانات المجاميع الاولى والثانية والثالثة على التوالي ثم ارتفعت النسبة لتصل إلى 100% في الأيام 7 و30 و 15 بعد التلقيح في حيوانات المجاميع الاولى والثانية والثالثة على التوالي، وتفسر هذه الاختلافات إلى أن اختبار وردية البنكال يمتلك حساسية عالية ونوعية واطئة (النوعية specificity هي نسبة الحيوانات الملقحة التي تعطي نتائج سالبة للاختبار التشخيصي) وعدم قدرته على التفريق مابين الحيوانات الملقحة والحيوانات المصابة طبيعيا ً (22,21)، اما سبب انخفاض النسبة في الأيام الاولى بعد التلقيح في المجاميع الملقحة كافة الى ان هذا الاختبار يكون اكثر فاعلية في الكشف عن الأضداد من النوع IgG_1 مقارنة ً بالأضداد من النوعين IgM و IgG_2 (23) حيث ان الأضداد من نوع IgM تكون سائدة في المراحل المبكرة بعد التلقيح (25,24) وهذه النتائج مقاربة لما لاحظه (11) إذ أشار أن الضأن الملقحة بلقاح العترة Rev.1 عن طريق الملتحمة بالجرعة القياسية الكاملة أصبحت موجبة جميعها لاختبار وردية البنكال بعد ثلاثة أسابيع من التلقيح، وكذلك مقاربة للنتائج التي حصل عليها (26) الذي اشار ان الحيوانات الملقحة بلقاح Rev.1 اظهرت نسبة مئوية لحساسية اختبار وردية البنكال بلغت 96.7% عند تلقيحها بالملتحمة بالجرعة القياسية الكاملة، وبنسبة 100% عند تلقيحها تحت الجلد وبالجرعة القياسية الكاملة بعد شهر واحد من التلقيح. في حين سجل (27) نسبة مئوية لحساسية اختبار وردية البنكال بلغت 97.4% بعد 15 يوم من تلقيح حملان بلقاح Rev.1 تحت الجلد وبالجرعة القياسية الكاملة. أظهرت نتائج الدراسة أن النسبة المئوية لحساسية اختبار التلازن الأنبوبي كانت 50% و0%و0% في اليوم الرابع بعد التلقيح في حيوانات المجاميع الاولى والثانية والثالثة على التوالي ثم ارتفعت النسبة المئوية لتصل إلى 100% في الأيام 7 و15 بعد التلقيح في حيوانات المجاميع الاولى والثالثة على التوالي وبنسبة 80% في اليوم 30 في حيوانات المجموعة الثانية، وقد يعزى الاختلاف في هذه النسب بين المجاميع الملقحة الى أن اختبار التلازن الأنبوبي هو الأقل حساسية من اختباري وردية البنكال وتثبيت المتمم وهذا ما أشار اليه (28)، وانه غير حساس للكشف عن الأضداد في المراحل المبكرة وبعض الحالات المزمنة عندما يكون مستوى الأضداد من مستوى نمطي ضعيف للتلازن (29). كما بينت نتائج الدراسة ان النسبة المئوية لحساسية اختبار اليزا الحليب كانت 100% في مجاميع النعاج الملقحة كافة وعلى طول مدة الدراسة، إذ أن اختبار الاليزا غير المباشر يمتلك حساسية عالية ولكنه يفتقد للنوعية ولايستطيع التفريق بين الحيوانات الملقحة والحيوانات المصابة بصورة طبيعية (30-32) واختبار الاليزا غير المباشر اكثر حساسية من اختباري وردية البنكال وتثبيت المتمم (32) إذ يستخدم اختبار وردية البنكال معلق جرثومي من خلايا كاملة من جراثيم

الكثافة الضوئية

البروسيلا الملساء كمستضد للكشف عن الأضداد (33)، في حين يستخدم مستخلص متعدد السكريد الشحمي أو مايعرف بسلسلة O كمستضد لتشخيص الأضداد في اختبارات الاليزا غير المباشرة مما يجعلها أكثر حساسية في التشخيص (34,27) وهذا ما ظهر في نتائج الدراسة. وهذه النتيجة مقاربة للنتائج التي ذكرها (26) الذي اشار الى ان الحيوانات الملقحة بلقاح Rev.1 اظهرت نسبة مئوية عالية لحساسية اختبار الاليزا غير المباشر بلغت 100% عند تلقيحها بالملتحمة بالجرعة القياسية الكاملة، وبنسبة 95% عند تلقيحها تحت الجلد وبالجرعة القياسية الكاملة بعد شهر واحد من التلقيح، في حين اختلفت النسبة المئوية للحساسية مع دراسة (11) إذ سجل نسبة حساسية لاختبار الاليزا غير المباشر بلغت 77.4% بعد ثلاثة أسابيع من تلقيح الضأن بالتقطير في ملتحمة العين وبالجرعة القياسية الكاملة، ويعزى السبب إلى الاختلافات في القدرة التمنيعية (Immunogenicity) بين مختلف لقاحات عتر Rev.1 المنتجة عالمياً وكذلك لوجود الاختلافات بين اللقاحات التجارية المستخدمة (15)، وكذلك الاختلاف في أعمار الضأن المستخدمة في الدراسات السابقة عن الدراسة الحالية إذ أن الاستجابة المصلية تعتمد على عمر الحيوان عند التلقيح بلقاحRev.1 (11). لوحظ من نتائج الدراسة بأن التلقيح بلقاح Rev.1 أدى الى تحفيز الأضداد حيث سجلت أعلى المعدلات لمعايير الأضداد في الحيوانات الملقحة تحت الجلد بالجرعة القياسية الكاملة (المجموعة الاولى) ثم المجموعة الثالثة تلتها المجموعة الثانية وهذه مقاربة للنتائج التي سجلها كل من (36,35) إذ أن معايير الأضداد المتكونة في الحيوانات الملقحة تعتمد على جرعة اللقاح وطرائق إعطاءه (38,26)، ومن نتائج الدراسة لوحظ وجود علاقة معنوية بين قيم الكثافة الضوئية لاختبار اليزا الحليب ومعايير الأضداد باستخدام اختبار التلازن الأنبوبي وهذا يعني أن العينات ذات الكثافة الضوئية العالية باختبار الاليزا تمتلك معيار عالي للأضداد ايضاً والعكس صحيح وهذا يطابق ماشار إليه (27) إذ اشار الى وجود علاقة معنوية مابين قيم الكثافة الضوئية لاختبار الاليزا غير المباشر ومعايير الأضداد باستخدام اختبار تثبيت المتمم، وكذلك تشابه النتائج التي لاحظها (35) الذي اشار الى وجود علاقة مترابطة بين نسب التثبيط لاختبار الاليزا التنافسي ومعايير الاضداد باستخدام اختبار التلازن الأنبوبي. اما نتائج الزرع الجرثومي فكانت سالبة للعينات المأخوذة من النعاج وعلى طول مدة الدراسة لكافة المجاميع الملقحة وهذا يطابق ماشار اليه (39) إذ لم يتم عزل جراثيم العترة اللقاحية بعد تلقيح النعاج بالجرعة القياسية الكاملة بلقاحRev.1 تحت الجلد خلال الشهر الأول من التلقيح، وكذلك يشابه ما لاحظه (40) إذ اشار إلى النتيجة السالبة للزرع الجرثومي بعد تلقيح المعز الحلوب بلقاح Rev.1 بجرعة 1×10^5 (CFU) تحت الجلد خلال ثلاثة اشهر من التلقيح. نستنتج من هذه الدراسة بأن اختبار اليزا الحليب غير قادر على التمييز بين الحيوانات الملقحة بلقاح البروسيلا المالطية العترة Rev.1والحيوانات المصابة بالمرض طبيعياً.

شكر وتقدير

يشكر الباحث عمادة كلية الطب البيطري لما قدمته من مساعدات وتسهيلات ودعم لانجاز البحث.

المصادر

1. Songer JG, Post KW. Veterinary Microbiology Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease. Elsevier Saunders, Missouri 2005; 200-206.
2. Radostits, OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th ed. Elsevier Saunders, London 2007; 966-994.
3. Chand P, Rajpurohit BS, Malhotra AK, Poonia JS. Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Vet Microbiol. 2005; 108: 305-311.
4. Memish Z, Mah MW, AlMahmoud S, AlShaalan M, Khan MY. *Brucella* bacteremia: clinical and laboratory observations in 160 patients. J Infect. 2002; 40: 59-63.
5. Garrido F, Duran M, Macmillan A, Minas A, Nicoletti P, Vecchi G. Brucellosis in sheep and goats (*Br. melitensis*). European Commission, Report of scientific committee on animal health and animal welfare. 2001.
6. Omer MK, Skjerve E, MacMillan AP, Woldehiwet Z. Comparison of the three serological tests in the diagnosis of *brucella* infection in unvaccinated cattle in Eritrea. Prev Vet Med. 2001; 48: 215-222.
7. Kolar J. Control of brucellosis in developing countries. Annales de l'Institute Pasteur Microbiol. 1987; 138: 122-126.
8. Nielsen K, Smith P, Yu WL, Elmgren C, Nicoletti P, Perez B, Bermudez R, Renteria T. Second generation competitive enzyme immunoassay for detection of bovine antibody to *Brucella abortus*. Vet Microbiol. 2007; 124: 173-177.
9. Portanti O, Tittarelli M, Di-Febo T, Luciani M, Mercante MT, Conte A, Lelli R. Development and validation of a competitive ELISA kit for the serological diagnosis of ovine, caprine and bovine brucellosis. J Vet Med 2006; 53: 494-498.
10. Cloeckaert A, Baucheron S, Vizcaino N, Zybmunt MS. Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Clinic Diag Lab Immunol 2001; 8: 772-775.
11. Stournara A, Minas A, Bourtzi-Chatzopoulou E, Stack J, Koptopoulos G, Petridou E, Sarris K. Assessment of serological response of young and adult sheep to conjunctival vaccination with Rev.1 vaccine by fluorescence polarization assay (FPA) and other serological tests for *B. melitensis*. Vet Microbiol. 2007; 119: 53-64.
12. Reynolds SL, Lindstrom JL, Fancher TL. Use of ELISA in predicting latent calfhood brucellosis infection. Proc U.S. Anim Hlth Assoc. 1985; 89: 150-158.
13. Heck FC, Williams JD, Pruett J, Sanders R, Zink DL. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Brucella abortus* in bovine milk and serum.Am J Vet Res. 1980; 41: 2082-2084.
14. Minas A. Control and eradication of brucellosis in small ruminants. Small Rum Res 2006; 62: 101-107.
15. Cloeckaert A, Jacques I, Grillo MJ, Marin CM, Grayon M, Blasco JM, Verger JM. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. Vaccine 2004; 22: 2827-2835.

16. Blasco JM. A review of the use of *Br. melitensis* Rev. 1 vaccine in adult sheep and goats. Prev Vet Med 1997; 31: 275-283.
17. Banai M. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine : laboratory aspects and field observations. Vet Microbiol. 2002; 90: 497-519.
18. Hamdy MER, El-Gibaly SM, Montasser AM. Comparison between immune responses and resistance induced in BALB/c mice vaccinated with RB51 and Rev.1 vaccines and challenged with *Brucella melitensis* bv. 3. Vet Microbiol. 2002; 88: 85-94.
19. Blasco JM, Diaz R. *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine as a cause of human brucellosis. Lancet 1993; 342, 805.
20. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris. 1988.
21. Samartino L, Gall D, Gregoret R, Nielsen K. Validation of enzyme-linked immuno-sorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet Microbiol. 1999; 70: 193-200.
22. Garin-Bastuji B, Blasco JM, Grayon M, Verger JM. *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. Vet Res. 1998; 29: 255-274.
23. MacMillan A. Conventional serological test. In: Nielsen K, Duncan J R, eds. Animal Brucellosis. CRC Press Inc. Boca Raton. 1990; 153-198.
24. Butler JE, Seawright GL, Mcgiven PL, Gilsdorf M. Preliminary evidence for a diagnostic immunoglobulin G1 antibody response among culture positive cows vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 and challenge exposed with strain 2308. Am J Vet Res. 1986; 1258-1264.
25. Tizard IR. Veterinary Immunology, an Introduction. 6th ed. Saunders, Philadelphia, 2000; pp260.
26. Marin CM, Moreno E, Moriyon I, Diaz R, Blasco JM. Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays gel immuno precipitation with native hapten polysaccharide and standard serological tests in diagnosis sheep brucellosis. Clinic Diag Lab Immunol. 1999; 6: 269-272.
27. Delgado S, Fernandez M, Carmenes P. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of sheep infected and vaccinated with *Brucella melitensis*. J Vet Diag Invest. 1995a; 7: 206-209.
28. Waghela S, Wandera JG, Wagner. Comparison of four serological tests in the diagnosis of caprine brucellosis. Res Vet Sci 1980; 28: 168-171.
29. Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D, Nielsen K. Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. J Clinic Microbiol. 1999; 37(10): 3245-3248.
30. Macmillan AP, Greiser-Wilke I, Moennig V, Mathias LA. A competitive enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis. Dtsch Tierarztl Wochenschr.,1990; 97: 83-85.
31. Nielsen KH, Cherwonogrodzky J, Duncan JR, Bundle DR. Enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain 19. Am J Vet Res. 1989; 50: 5-9.
32. Burriel AR, Christodoulopoulos G, Bisias G, Fthenakis GC. Comparison of fluorescence polarization assay, indirect ELISA and competitive ELISA methods for diagnosis of *Brucella melitensis* infection in small ruminants. Small Rum Res. 2004; 54: 243-247.
33. Munoz PM, Martin CM, Monreal D, Gonzalez D, Garin-Bastuhi B, Diaz R, Mainar-Jaime R, Moriyon I, Blasco JM. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. Clinic Diag Lab Immun. 2005; 12(1): 141-151.
34. Nielsen K. Diagnosis of Brucellosis by Serology. Vet Microbiol. 2002; 90: 447-459.
٣٥. الخفاجي، وسام سالم حسن. تشخيص مرض الإجهاض الساري (البروسيللوسز) في الضأن باستخدام الاختبارات المصلية مع تقييم كفاءة لقاح Rev.1 (رسالة ماجستير). الموصل: جامعة الموصل، 2008.
36. Delgado S, Fernandez M, Carmenes P. Influence of age and stage of gestation on serological response to subcutaneous or conjunctival *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccination in ewes. Small Rum Res. 1996; 19: 63-68.
37. Delgado S, Carmenes P, Fernandez M. Seroprevalences and lack of abortions after vaccination of Churra sheep with reduced doses of Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine by subcutaneous or conjunctival routes. Prev Vet Med. 1995b; 23: 153-161.
38. Diaz-Aparicio E, Marin C, Alonso B, Aragon V, Perez S, Pardo M, Blasco JM, Diaz R, Moriyon I. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Br. melitensis* infection of goats. J Clinic Microbiol. 1994; 32: 1159-1165.
39. Entessar F, Ardalan A, Ebadi A, Jones LM. Effect of living Rev. 1 vaccine in producing long-term immunity against *Brucella melitensis* infection in sheep in Iran. J Comp Path. 1967;(77):367-377.
40. Martinez OL, De la Rosa RP, Diaz-Aparicio E, Hardwicke CS, Andrade LH, Güemes FS. Shedding of *Brucella melitensis* Rev. 1 strain in the milk of reduced dose-vaccinated goats.Tec Pecu Méx. 2005;43(3):399-404.