محاولة إنتاج لقاح أمين لمرض البروسيللوسز

أسيل محمد حمزة
كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد

الخلاصة

اجري في هذه الدراسة تحضير لقاح بأنتاج عدة مستضدات ذائبة مستخلصة من عترة البروسيلا المالطية اللقاحية Rev1 بطريقة التكسير بالامواج الفوق الصوتية وبعد إجراء الطرد المركزي اهمل السائل الطافي ومرر المستخلص الخام على عمود الهلام (Sephacryl G200) لتجزئة الووتينات حسب اوزانها الجزيئية وقد نتج عـ نـ ذلـ ك ظهور اربع قمم بروتينية استخدمت في احداث استجابة مناعية خلوية وخلطية حيث تم حقن خمس مجاميع من الفئوان المختبرية وواقع (خمس فأرات لكل مجموعة) مع مجموعة سيطرة حقنت كل مجموعة بذروة (قمة) وبجرعة 100µ/0.1 مل تحت الجلد وبعد مرور اسبوعين اعطيت جرعة منشطة أولى وبعد أسبوعين أعطيت جرعة منشطة ثانية وبعد مرور شهر من الجرعة المشطة الثانية اجري فحص التحدي بحقن جرثومة البروسيلا الماطية الضارية وبجرعة $1x10^6$ /0.1 مل بالخلب لكافة مجاميع الدراسة ولم تعزل جرثومة البروسيلا في الفئران الممنعة فيما تم عزلها من حيوانات مجموعة السيطرة، كما تم استخدام مجموعة من الفئران المختبرية منعت بعترة S19 اللقاحية وبعد مرور أسبوعين استخدمت المستضدات المستخلصة كفحص حساسية جلدي وسجلت القمة الثالثة أعلى استجابة جلدية.

تم قياس المناعة الخلوية وذلك بأجراء فحص الحساسية الجلدي بعد مرور اسبوعين من التمنيع الاول حيث أعط ت القمة الثالثة البروتينية أفضل حماية متوافقة في ذلك مع التغيرات النسيجية.

قيست المناعة الخلطية وذلك بأستخدام تقنية الاليزا حيث تم استخدام مستضد *Br.abortus* المغلف كمستضد إكساء اجري الفحص باستخدام الأمصال الممنعة بعد مرور شهرين من التمنيع حيث اظهرت النتائج افضلية النتائج للقمة الثالثة.

A Trying to produce an safety vaccine against Brucellosis

A. M. Hamzah
Veterinary medicine college\ University of Baghdad

Abstract

In this study, a vaccine was prepared by production of several soluble antigens extracted from Rev1 strain of *Brucella melitensis* by sonicating the bacteria, and after cooling centrifuge the supernatant was discard while the extract passed through sephacryl G200 column to separate protein content according to its molecular weight.

Four peaks were obtained which were used to induce cellular and humeral immunity by using five groups of mice (five mice/group) with control group.

Each one peak injected subcutaneously to one group of mice at 100 µ/0.1 ml then giving one activated pooster dose after two weeks interval. A challenge was done by

injecting intraperitonealy a virulent strain of *Brucella melitensis* of ^{6}10x1/0.1 bacteria/ ml after one month of vaccination.

No bacteria was isolated from the vaccinated animal while isolate from control group.

All four peaks uses as skin test in a group of mice after two weeks of vaccination with S19 vaccine and the best result obtained by the third peak.

Cell mediate immunity was evaluated by using the skin test after two weeks from vaccination, where the third protein peak showed the best result in skin test and supported with histological examination results.

Evaluate of humeral immunity by using of ELISA technique with Br.abortus Ag as coated sensitized antigen done on serum samples after two month of vaccination, also the third peak shown the best results.

المقدمة

استخدمت العديد من اللقاحات لغرض الوقاية من مرض البروسيلوسز في الحيوانات مثل اللقاحات الحية المضعفة، المقتولة، العترة الخشنة وسجلت لكل منها سلبيات فمثلاً اللقاح المضعف يتداخل مع الفحوصات السيرولوجية المستخدمة لتشخيص المرض(1) بينما المقتولة لا توفر الحماية الكافية فضلا عن ذلك يجب استخدام الجرعة المنشطة بعد فترة وذلك يسبب تفاعل موضعي في منطقة الحقن (2) أما اللقاح المحضر من العترة الخشنة فأن معدل انقسامها داخل المضيف لاينخفض (3) فضلا عن ذلك لاتوفر الحماية للاغنام (4) لذلك توالت الدراسات لاستخدام اجزاء من جرثومة البروسيلا لغرض التمنيع كأستخدام طبقة الببتايدوكلايكان (5) او استخدام متعدد السكريد الشحمي (6) او استخدام الاحماض النووية (7) او استخدام البروتين الخلوي الخارجي 31 (omp31)(8).

المواد وطرائق العمل

1. تحضير المستضد.

حضر المستضد بأستخدام عترةالبروسيلا المالطية اللقاحية Rev1 حسب طريقة الباحثه حمزة (8) بطريقة التكسير بالامواج الفوق الصوتية وبعد اجراء الطرد المركزي اهمل السائل الطافي.

2. فصل البروتينات بطريقة الترشيح الهلامي Column chromatography.

استخدم في هذه التجربة عمود ذو ابعاد 2.5x100 ملم ثم استخدم هلام نوع (sephacryl S- 200) حيث كان معدل الفصل لكل انبوب 5مل وبمعدل 35 أنبوب ثم ثبتت سرعة مرور المحلول داخل العمود بمعدل 20−21 مل بالساعة بعد ذلك تم قراءة الامتصاص الضوئي بجهاز قياس شدة الامتصاص الضوئي وبطول موجي قدره 280نانوميتر وتم رسم أشكال القمم أو الذروات التي تمثل قيم الامتصاص الضوئي التي اعطتها كل انبوبة ثم تم جمع سائل الانابيب الحاوية على تركيز عال من البروتين في كل ذروة لقياس نسبة البروتين فيها بطريقة (9).

3. تمنيع حيوانات التجربة.

استخدمت في هذه التجربة 30 من الفئران المختبرية حيث قسمت الى ستة مجاميع المجموعة و بواقع خمسة فئران لكل مجموعة، الأولى حقنت بمستضد البر وسيلا المجهضة عترة S19 بجرعة 0.1/610x1 واجري فحص الحساسية الجلدي لكل ذروة أو قمة بعد مرور اسبوعين لكل حيوان، اما المجاميع الاربع الاخرى فقد منعت بذروة واحدة لكل مجموعة من مستضد البروسيلا المالطية عترة Rev1 وبجرعة 100 مايكروغرام تحت الجلد وأعيدت

الجرعة بعد مرور اسبوعين لكل حيوان، المجموعة السادسة (مجموعة سيطرة) تم حقنها بدارئ الفوسفات الملحي بجرعة 0.1 مل تحت الجلد لكل حيوانو أعيدت الجرعة بعد مرور اسبوعين.

4. فحص الحساسية الجلدي.

تم إجراء الفحص على الفئران المختبرية الممنعة بالذروات (القمم) المفصولة بعملية الهلام و الممنعة بعترة S19 بعد مرور 14 يوم على الجرعة المنشطة الثانية حيث تم حقن الفئران بكل ذروة بتركيز بروتيني 10 مايكوغرام تحت الادمة في منطقة راحة القدم ثم قرأت النتائج بعد مرور 24 ساعة و48 ساعة من الحقن من خلال قياس فرق التثخن بوساطة المسطرة المعدنية المنزلقة وثبتت نتائج القراءات.

5. اجراء فحص التحدي

اجر ي فحص التحدي بعد مرور 30 يوم من التمنيع حيث حقنت الفئران المختبرية بـ 0.1 تحت الخلب بجرعة 106 من عترة البروسيلا المالطية الضارية وكذلك مجموعة السيطرة.

6. فحص الاليزا

بعد مرور اسبوعين من التمنيع بالجرعة الثانية تم جمع عينات الدم لغرض الحصول على الامصال الممنعة ثم اجري فحص الاليزا باستخدام مستضد Br.abortus محضر لهذا الغرض في مختبر الصحة المركزي كمستضد اكساء ثم تم قراءة نتائج التفاعل لكل حفرة من طبق المعايرة بأستخدام جهاز ELISA Reader اذ سجلت الكثافة الضوئية لكل عينة على طول موجي 450 نانوميتر حيث اعتمدت القراءة 0.934 هي الفاصلة بين النتيجة الموجبة والسالبة.

7. التقطيع النسيجي.

أخذت عينات الأقدام لكل ذروة ووضعت بمحلول الفورمالين 10% لمدة أسبوع ثم مررت بجهاز التقطيع النسيجي الحاوي على تراكيز تصاعدية من كحول الايثانول ثم طمرها بشمع البارافين بعد ذلك تقطع الى شرائح نسيجية بأستعمال جهاز الـ Microtome ثم صبغها بصبغة الهيماتوكسلين و الايوسين.

النتائج

1. قياس تركيز البروتين في الذروات.

تم حساب البروتين في المستخلص الخام وفي الأجزاء المفصولة حسب طريقة (9)وبطول موجي 280 nm حيث استخرجت الكثافة الضوئية لكل أنبوب وكما موضح في جدول (1).

جدول(1) يوضح تركيز البروتين في المستضد الخام وذرواته المختلفة

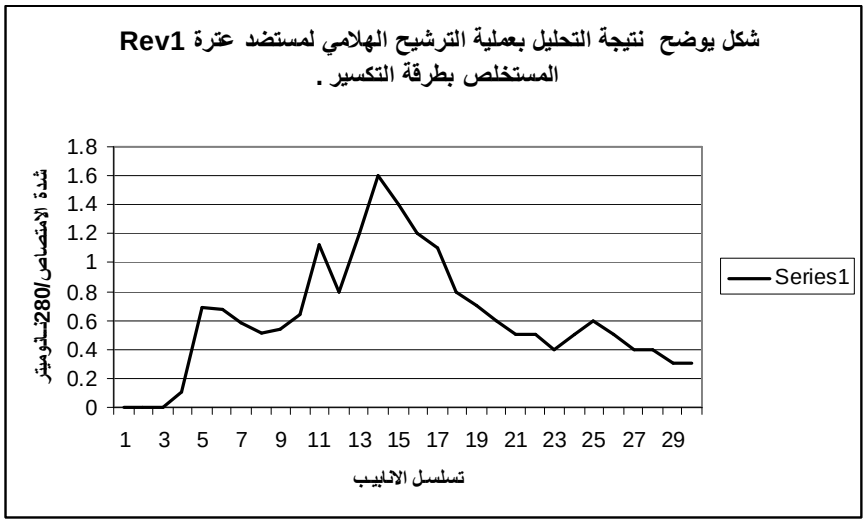
المستضد	الخام	M1	M2	M3	M4
تركيز البروتين مايكوغرام/مل	3943	317.4	364.2	858.4	409.2

2. نقاوة المستضدات.

لم تظهر المستضدات المستخلصة اي تلوث عند زرعها على الاوساط الزرعية المختلفة.

3. نتائج الترشيح الهلامي.

أظهرت نتائج الترشيح الهلامي بأستخدام هلام السيفاكرل Sephacryl S200 وجود اربع ذروا ت في المستضد المحضر بطريقة التكسير بالامواج فوق الصوتية من العترة اللقاحية Rev1 لجرثومة البروسيلا المالطية كما في الشكل (1).



شكل(1) يوضح نتيجة التحليل بعملية الترشيح الهلامي لمستضد العترة Rev1 المستخلص بطريقة التكسير بالأمواج الفوق الصوتية

4. نتائج فحص الحساسية الجلدي.

أظهر ت المعدلات الحسابية لفحص الحساسية الجلدي أعلى النتائج للقمة الثالثة في الفئران الممنعة بالبروسيلا اللقاحية S19 كما في الجدول(2).

جدول (2) يوضح نتائج المعدلات الحسابية لفحص الحساسية الجلدي بالقمم المفصولة في الحيوانات الممنعة بعترةS19

نوع التمنيع	أداة فحص الحساسية الجلدي	المعدلات الحسابية	
		فرق التثخن بعد24 ساعة	فرق التثخن بعد48 ساعة
S19	M1	1.21	0.82
S19	M2	1.04	0.91
S19	M3	2.78	1.44
S19	M4	1.49	0.42

أظهرت النتائج اعلى المعدلات الحسابية للاستجابة الجلدية في الحيوانات الممنعة بالذروة (القمة) الثالثة تليها الممنعة بالذروة (القمة) الرابعة عند استخدام القمة الثالثة في فحص الحساسية الجلدي بينما اظهرت النتائج معدلات حسابية متقاربة في الحيوانات الممنعة بالقمة الثانية و الاولى على التوالي كما في الجدول(2،3،4،5).

جدول (3) يوضح نتائج المعدلات الحسابية لفحص الحساسية الجلدي في الحيوانات الممنعة بالقمة الثالثة وبأستخدام القمة الثالثة في فحص الحساسية الجلدي

نوع التمنيع بالذروة(القمة)	المعدلات الحسابية	
	فرق التثخن بعد24 ساعة	فرق التثخن بعد48 ساعة
M1	1.42	1.21
M2	1.62	1
M3	2.95	1.57
M4	2.83	1.39

جدول (4) يوضح نتائج المعدلات الحسابية لفحص الحساسية الجلدي في الحيوانات الممنعة بالقمة الرابعة وبأستخدام القمة الثالثة في فحص الحساسية الجلدي

نوع التمنيع بالذروة(القمة)	المعدلات الحسابية	
	فرق التثخن بعد24 ساعة	فرق التثخن بعد24 ساعة
M1	1.55	1.32
M2	1.61	1.22
M3	2.66	1.14
M4	2.51	1.51

جدول (5) يوضح نتائج المعدلات الحسابية لفحص الحساسية الجلدي في الحيوانات الممنعة بالقمة الثانية وبأستخدام القمة الثالثة في فحص الحساسية الجلدي

نوع التمنيع بالذروة(القمة)	المعدلات الحسابية	
	فرق التثخن بعد24 ساعة	فرق التثخن بعد24 ساعة
M1	1.0	0.51
M2	1.21	0.94
M3	1.81	1.09
M4	1.51	1.19

جدول (6) يوضح نتائج المعدلات الحسابية لفحص الحساسية الجلدي في الحيوانات الممنعة بالقمة الاولى وبأستخدام القمة الثالثة في فحص الحساسية الجلدي

نوع التمنيع بالذروة(القمة)	المعدلات الحسابية	
	فرق التثخن بعد24 ساعة	فرق التثخن بعد24 ساعة
M1	1.09	0.62
M2	1.19	0.8
M3	1.44	1.21
M4	1.23	1

5. نتائج فحص الاليزا.

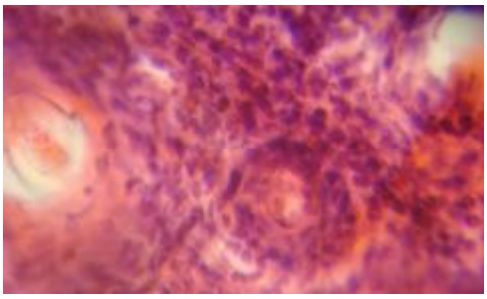
أظهر ت النتائج استجابة خلطية عالية عند استخدام تقنية الاليزا وسجلت أعلى الاستجابة في الحيوانات الممنعة بالقمة الثالثة ثم الممنعة بالقمة الرابعة فيما كانت نتائج القمتين الثانية والاولى متقاربة وبصورة عامة فأن جميع القمم سجلت استجابة خلطية جيدة كما هو موضح في جدول(7).

جدول(7) يوضح شدة الكثافة الضوئية للذروات الأربعة لمصول الفئران الممنعة بالذروات الأربعة

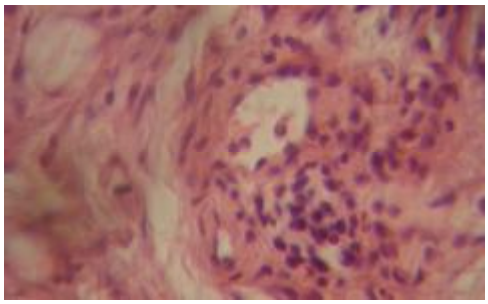
نوع التمنيع (الذروة أوالقمة)	شدة الكثافة الضوئية/نانوميتر
M1	1.039
M2	1.094
M3	1.392
M4	1.333

6. نتائج التقطيع النسيجي.

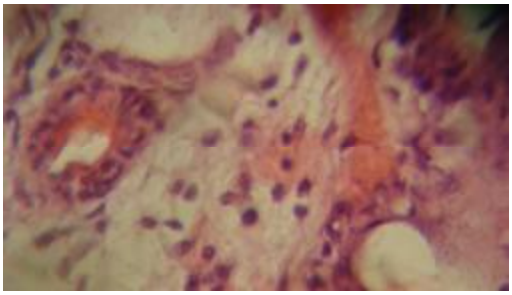
بين الفحص المجهري تكفيف حول الاوعية لدموية المكونة من خلايا لمفية وبلعمية وكان أكثر شدة في المستضد المحقون للقمة الثالثة كما في صورة (1) وكان الارتشاح اقل في القمة الرابعة صورة (2) فيما كان الارتشاح طفيف في كلا القمتين الثانية صورة (3) والأولى صورة (4).



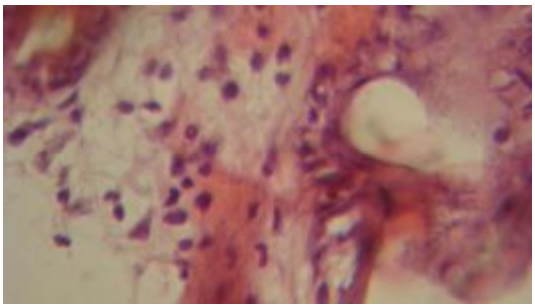
صورة (1) يوضح التكفيف اللمفاوي الكثيف لخلايا وحيدة النواة و الخلايا اللمفاوية لفحص الحساسية الجلدي باستخدام القمة الثالثة للحيوانات الممنعة بالقمة الثالثة 40X



صورة (2) يوضح التكفيف اللمفاوي الكثيف لخلايا وحيدة النواة و الخلايا اللمفاوية لفحص الحساسية الجلدي باستخدام القمة الثالثة للحيوانات الممنعة بالقمة الرابعة 40X



صورة (3) يوضح التكفيف اللمفاوي الطفيف لخلايا وحيدة النواة و الخلايا اللمفاوية لفحص الحساسية الجلدي باستخدام القمة الثالثة للحيوانات الممنعة بالقمة الثانية 40X



صورة (4) يوضح التكفيف اللمفاوي الطفيف لخلايا وحيدة النواة و الخلايا اللمفاوية لفحص الحساسية الجلدي باستخدام القمة الثالثة للحيوانات الممنعة بالقمة الأولى 40X

المناقشة

تسبب اللقاحات الحية المضعفةRev1 وS19 المستخدمة في الوقت الحالي الكثير من المشاكل حيث تسبب الاجهاض في الحيوانات وتعطي نتائج موجبة كاذبة في الفحوصات السيرولوجية فضلا عن ذلك تعد ضارية بالنسبة للانسان و قد تسبب المرض في الحيوان(11،10) كذلك ا ذ هذه اللقاحات تكون اضداد ضد سلسلة O لطبقة متعدد السكريد الشحمي (13,12,10) و بالتالي فأن التشخيص السيرولوجي بالفحوصات التقليدية و التي تعتمد على معيار الاجسام المضادة المتكونة ضد طبقة متعدد السكريد الشحمي لايمكن ان تميز الحيوانات الملقحة من المصابة (13,10) وبما ان استخدام اجزاء الجرثومة ممكن ان تسبب حدوث المناعة (16,15) حيث استخدم بعض الباحثين بروتينات الغشاء الخارجي كلقاح (13) ولكون البروتينات الداخلية للجرثومة واغلبها سايتوبلازمية لاتظهر ضدها اجسام مضادة الا في حالة استخدامها (16) لهذه الأسباب اجري هذا البحث لاستخلاص مستضد خاص لجرثومة البروسيلا يوفر الحماية ضد المرض ولا يتداخل مع نتائج الفحوصات السيرولوجية وليس له علاقة استضدادية مع جراثيم اخرى تمتلك مستضدات مشابهه لجرثومة البروسيلا (حمزة، بحث غير منشور) اذ تعد طبقة متعدد السكريد الشحمي المصدر الرئيسي للعلاقة التصالبية بين جرثومة البروسيلا و جراثيم اخرى(10) إذ ا ذ البروتين السايتوبلازمي ذو الوزن الجزيئي 20 كيلودالتون المستخلص بطريقة التكسير يكشف عن الحيوانات

المصابة بالبروسيلا ولايعطي نتائج خاطئة ناتجة عن العلاقة التصالبية عند استخدامه بالفحوصات السيرولوجية (17) ولكون جرثومة البروسيلا المالطية العترة اللقاحيةRev1 تمتلك بروتينات مشتركة بين العتر وتعد أكثر شمولية بين العتر (18) لذلك استخدمت في هذه الدراسة.

أظهر ت النتائج أعلى المعدلات الحسابية للقمة الثالثة وذلك يعود الى الاختلاف في التراكيب الكيميائية للبروتينات فبعد تكسرها تعطي ببتيدات ذات محددات مما يمنح مستضد هذه القمة خصوصية بالتفاعل فضلا عن المحتوى البروتيني العالي (19) تليها القمة الرابعة من حيث شدة التفاعل وذلك يعود الى المحتوى البروتيني العالي قارنة بالقمتين الثانية و الأولى كذلك بالنسبة لفحص الحساسية الجلدي حيث اظهرت النتائج اعلى استجابة جلدية للقمة الثالثة تليها القمة الرابعة وسجلت اعلى القراءات لفحص الحساسية الجلدي بالقمة الثالثة في الحيوانات الممنعة بالقمة الثالثة وذلك نتيجة سرعة تكاثر خلايا الذاكرة اللمفاوية عند حقن نفس المستضد في فحص الحساسية الجلدي وبالتالي افراز المدورات اللمفية وجذب خلايا الالتهاب وحيدة النواة (18) وقد توافقت نتائج التقطيع النسجي مع نتائج فحص الحساسية حيث تمثلت بشدةتفاعل و تجمع للخلايا اللمفية و خلايا وحيدة النواة للقمة الثالثة ويتفق ذلك مع ما وجدته الباحثة (8).

أما بالنسبة للمناعة الخلطية فقد تم استخدام فحص الاليزا للخصوصية و الحساسية العالية حيث تصل 99.7%و96.2% على التوالي (20) فضلا عن تحديد الاجسام المضادة نوع IgA,IgM,IgG (21) أظهر ت النتائج ارتفاعا واضحا للقمة الثالثة وذلك يعود الى التركيز العالي للاجسام المضادة المتوافقة تماما مع المستضد في هذه الذروة اذ تعد هذه الذر وة المسببة لحدوث الاستجابة المناعية بصورة رئيسية و بصورة عامة فقد اظهرت جميع القمم نتائج جيدة من حيث تحفيز المناعة الخلطية بسبب محتواها البروتيني وتوافقها مع الاجسام المضادة بدرجات متفاوتة (17).

References

1.Duerden, B. I.; Old, D. C.; Hasting, J. G. M. & Towner, K. J. (1997). Vaccines against bacterial zoonoses. J. Med. Microbiol., 64(4): 267-269.

2. OIE Manual. (2000). Bovine brucellosis in manual of standards for diagnostic test and vaccine.

3. Refai, M. (2003). Incidence and control of brucellosis in the near east region. Vet. Microbiol., 90(1-4):81-110.

4. El-Idrissi, A. H.; Benkirane, A.; El-Maadoudi, M.; Bouslikhane, M.; Berrada, J. & Zerouali, A. (2001). Comparison of the efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 and *Brucella melitensis* Rev1 live vaccine against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. Rev. Sci. Tech. off. int. Epiz., 20(3):741-747.

5. Protocol Institute Merieux. (1986). Vaccine against brucellosis for human use lyon.

6. Lopez, M. A.; Asselineau, J.; Serre, A.; Roux, J.; Bascouf, S. & Lacave, C. (1976). Immunization by an insoluble fraction from *Brucella melitensis* immunological and characterization of the active substances. Inf. Immun., 31:311-321.

7. Kurar, E. & Splitter, G. A. (1997). Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response, Vaccine., 15(17-18):1851.

8. حمزة، أسيل محمد. (2003). دراسة مقارنة لكفاءة البروسلينات المحضرة محليا في الكشف عن الاصابة بمرض البروسيلوسز. رسالة ماجستير. أمراض مشتركة. كلية الطب البيطري. جامعة بغداد.

9. Lowery, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the follin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265.

10. Monreal, D.; Grillo, M. J.; Gonzales, D.; Marin, C. M.; Miguel, M. J.; Lopez-Goni, I.; Blasco, J. M.; Cloeckaert, A. & Moriyon, I. (2003). Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core Lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in mouse model. Inf. Immun., 71(6):3261-3271.
11. Moriyon, I.; Grillo, M. J.; Monreal, D.; Gonzales, D.; Marin, C. M.; Lopez-Goni, I.; Jaime, R. C.; Moreno, E. & Blasco, J. M. (2004). Rough vaccines in Animal brucellosis :structural and genetic basis and present status.Vet. Res.,35:1-38.
12. Rittig, M. G.; Kuafmann, A.; Robins, A.; Shaw, B.; Sprenger, H.; Gemsa, D.; Foulongne, V.; Rouot, B. & Dornand, J. (2003). Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. J. of Leukocyte Biol., 74:1045-1055.
13. Onurdag, F. K.; Degim, T.; Değim, Z.; Kutlu, I.; Gunes, G. & Abbasoglu, U. (2008). The humeral immune response of mice to liposomes containing *Brucella melitensis* outer membrane fragments.7(8):991-995.
14. Cloeckaert, A.; Kerkhofs, P. & Limet, N. J. (1992). Antibody response to brucella outer membrane protein in bovine brucellosis: immunoblot analysis and competitive ELISA using monoclonal antibody. J. Clin. Microbiol., 30(12):3168-3173.
15. Jimenes de Bagües, M. P.; Elzer, P. H.; Blasco, J. M.; Marin, C. M.; Gamazo, C. & Winter, A. J. (1994). Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccine. Inf. Immun., 62(2):632-638.
16. Mostafaie, A.; Abdolalizadeh, J.; Nomanpour, B.; Karimi, R.; Bahrami, Y. (2005). Immunogens of *Brucella Abortus* S19 Identified By Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Immunoblotting. Iran J. Med. Sci., 30 (1): 10-15.
17. Zygmunt, M. S.; Gilbert, F. B. & Dubray, G. (1992). Purification, Characterization and seroactivity of a 20-kilodalton protein antigen. J. Clin. Microbiol., 30(10): 2662-2667.
18. الزبيدي، إبراهيم عبد الحسين. (2006). تحضير و تجربة مستضد مستخلص من بعض عتر البروسيلا اللقاحية. رسالة دكتوراه.الطب الباطني و الوقائي البيطري. كلية الطب البيطري. جامعة بغداد.
19. شعلان، واثق عبد الجبار. (2003). دراسة لتحضير بعض مستضدات عصية السل لتشخيص مرض السل بأستخدام الفحوصات المناعية. رسالة ماجستير. امراض مشتركة. كلية الطب البيطري. جامعة بغداد.
20. Karnjanamala, W.; Nuamjit, M.; Supa, P.; Phokrasung, P. & Chakmongkhol, S. A. (2008). Study on antibody against *Brucella melitensis* infection in meat goat. Proceedings, The 15th Congress of FAVA, FAVA-OIE Joint Symposium on Emerging Disease.
21. Gómez, M. C.; Nieto, J. A.; Rosa, C.; Geijo, P.; Escribano, M. A.; Muñoz, A. & López, C. (2008). Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic. Clin. and Vaccine Immunol.,15(6):1031-1033.