# مقایسه آزمایش‌های سرولوژیک (رزبنگال، رایت لوله‌ای و کومبس رایت) و مولکولی (PCR) در تشخیص بروسلوز گوسفند و بز

مصطفی جعفرپور[۱*]، نظرعلی کترا ابراهیمی[۲]، علی ناظمی[۳]، مهدی آسمار[٤]، محمد خاتمی‌نژاد[٥]


## چکیده

بروسلوز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مشترک حیوان و انسان محسوب می‌گردد و در مناطق زیادی از جهان گسترش یافته و در ایران نیز اندمیک است.

امروزه تشخیص بروسلوز بر پایه آزمایش‌های سرولوژی و میکروبیولوژی است.

در این مطالعه آزمایش‌های سرولوژی (رزبنگال، رایت لوله‌ای و کومبس رایت) بر روی ۱۰۰ نمونه انجام شده و سپس بر روی نمونه‌های خون رزبنگال مثبت و نمونه‌های مثبت و منفی رایت لوله‌ای، آزمایش PCR انجام شد. فراوانی نسبی بروسلوز برحسب سرولوژی ۲۰٪ و برحسب PCR ۵٪ شد.

با توجه به اهمیت شناسایی صحیح موارد آلوده در کنترل و پیشگیری برسلوز در جوامع دامی و انسانی ؛ به نظر می رسد استفاده از آزمایش‌های متکی بر تکنولوژی اسیدهای نوکلئیک (PCR) از حساسیت و اختصاصیت مناسبی جهت تشخیص بروسلوز برخوردار می‌باشند.


***واژگان کلیدی:*** *بروسلوز ، سرولوژی ،PCR*

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۵

## مقدمه

بروسلوز یکی از شایع‌ترین بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و دام محسوب می‌گردد. عامل مسبب بروسلوز باکتری‌های گرم منفی درون سلولی اختیاری‌اند که به جنس بروسلا و به گروه آلفا ـ پروتئو باکتر تعلق دارند و بر اساس تمایل میزبانی و بیماریزایی به نُه گونه شامل، بروسلا آبورتوس (گاو و گاومیش)، بروسلاملیتنسیس (بز و گوسفند)، بروسلا اویس (گوسفند)، بروسلا کانیس(سگ)، بروسلا سوئیس (خوک،

[۱*]- گروه آموزشی میکروبیولوژی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران Jafarpoor@yohoo.com- Emill Sina

۲- دانشجوی کارشناس ارشد، رشتهٔ میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.

۳- گروه آموزشی ژنتیک، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

٤- گروه آموزشی میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

٥- گروه آموزشی میکروبیولوژی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

**Comparison of Serological tests (Rosebengal, Tube wright and Coombs wright) with Molecular test (PCR) for Detection of Brucellosis (Goat and Sheep)**

**Gafarpoor, M[1*]., Kotra Ebrahemi, N[2]., Nazemi, A[3]., Assmar, M .[4], khataminezhad, M[5].**

*1- Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran. (Sina Jafarpoor@yohoo.com)*
*2-M..A.Student of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran*
*3- Department of Genetics, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran*
*4- -Ddepartment of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran*
*5-Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran*

Brucellosis Continues to be of great health Significance and economic importance in many contries including Iran.
The current diagnosis of brucellosis is based on the Serological and the microbiological tests.
In this study , 100 sera specimen were taken from Animals (Goat and Sheep) in tonekabon to wnship, then was screening with serological tests and seropositive and seronegative specimens (total peripheral blood) confirm by PCR method.
More over, wright's seroaglutination test had titers within the diagnostic range 20 cases, that 5 samples were positive by PCR.
In this study, prevalence rate disease was 20% Incidence rate disease was by PCR 5%.
Different Serological tests and PCR method due to Serological Methods are not always Sensitive and Specific the PCR techniques have proved tobe Useful to Specificity, Sensitivity and rapidness.

***Key Words:*** *Brucellosis, Serology, PCR*

خرگوش، جوندگان و گوزن)، بروسلا نئوتمه (موش جنگلی)، بروسلا پینی پدیا (خوک آبی)، بروسلا ستاسئا (دلفین‌ها و وال‌ها) تقسیم می‌شوند(۸،۱٤).

بطور کلی پیشگیری، کنترل و ریشه‌کنی بروسلوز نیازمند شناخت سریع و صحیح فراوانی و توزیع مکانی و زمانی آن است. لذا نباید در تعیین اهداف اقدامات مبارزه‌ای صرفاً به درصد پوشش واکسیناسیون و یا درصد اقدام خاص کنترل بسنده شود؛ بلکه کاهش موارد بیماری بعنوان شاخص قابل اندازه‌گیری دوم باید توأمان هدف گذاری شود و معیار دوم است که اثربخشی معیار اول را تعیین می‌نماید.

بنابراین سرعت در شناخت وضعیت بیماری در ارتباط مستقیم با خطر گسترش بیماری است بدین معنی که فاصله زمانی طولانی بین وقوع و لحظه شناخت آن بالطبع در اکثر موارد گسترش بیماری را به دنبال خواهد داشت(۱).

کشت‌های باکتریولوژیکی و آزمایش‌های سرولوژیکی متکی بر آگلوتیناسیون شایع‌ترین آزمون‌های مورد استفاده در تشخیص عفونت‌های انسانی و حیوانی بروسلوز هستند.

از جمله مشکلات موجود در انجام این آزمایش‌ها می‌توان به این موارد اشاره کرد که: تکنیک‌های کشت وقت‌گیر بوده و فاقد حساسیت لازم در تشخیص موارد مزمن می‌باشد و حساسیت نتایج کشت در مواردی که هدف شناسایی گونه‌های بروسلا آبورتوس باشد کاهش می‌یابد.

آزمایش‌های سرولوژیکی به دلیل حضور موارد منفی کاذب حاصل از آنتی بادی‌های بلوکان و حضور موارد مثبت کاذب بدلیل تشابه آنتی ژنی با دیگر باکتری‌های گرم منفی (یرسینیا آنتروکولیتیکا، اشرشیا کلی o:157، سالمونلا اوربانا و ویبریوکلرا) از حساسیت و اختصاصیت کافی برخوردار نمی‌باشند و به تنهایی قادر به تشخیص مرحله حاد و مزمن بیماری نیستند(۱۳ ، ۱۲).

امروزه تکنولوژی تکثیر اسیدهای نوکلئیک متکی بر PCR به جهت تشخیص باکتری‌های مشکل پسند و دیررشد مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاربرد PCR جهت تشخیص DNA بروسلاها به واسطه حساسیت و اختصاصیت و شناسایی زودهنگام ثابت شده است(۱۱ ،۷ ، ۵، ٤، ۳).

هدف این تحقیق مقایسه آزمایش‌های سرولوژی (رزبنگال، رایت لوله‌ای و کومبس رایت) و مولکولی (PCR) در تشخیص بروسلوز در نمونه خون دامی (گوسفند وبز) جهت ارائه یک روش سریع و با قابلیت تشخیص دقیق موارد آلوده می‌باشد.

## مواد و روش کار

**جمع‌آوری نمونه:** تعداد ۱۰۰ نمونه خون از دام‌های اهلی (گوسفند وبز) مشکوک به بروسلوز شهرستان تنکابن در شرایط آسپتیک تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان انجام آزمون در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**آزمایش‌های سرولوژی:**

تشخیص بروسلوز به کمک آزمایش‌های سرولوژیکی (رزبنگال، رایت لوله‌ای و کومبس رایت) صورت گرفت.

طبق برنامه سازمان دامپزشکی تیتر $\frac{۱}{۴۰}$ وبیشتر رایت لوله‌ای و تیتر $\frac{۱}{۲۰}$ و بیشتر، 2ME به عنوان موارد مثبت هستند.

**آزمایش مولکول Polymerase Chain Reaction (PCR)**

*الف) تخلیص DNA:*

DNA ژنومیک از نمونه خون که قبلاً با EDTA جمع‌آوری و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده به کمک کیت استخراج DNA شرکت کیاژن ( Amplisense Brucella SP 460S/ICS-770 ) جدا گردید.

در این کیت ازکنترل منفی(Negative Control NC); که حاوی (DNA- buffer ) است، کنترل مثبت Positive Control (PC) ($۱۰^۳$ کپی از قطعه ٤٦۰ جفت بازی که در بروسلاملیتنسیس، بروسلا آبورتوس، بروسلا سوئیس وبروسلا کانیس حفاظت

شده است) و کنترل داخلی(Internal control sample (ICS (قطعه ۷۷۰ جفت بازی که قسمتی از ژنوم فاژ لامبدا است) استفاده شده است.

کنترل داخلی به تمام میکروتیوپ نمونه‌های مورد آزمایش، نمونه کنترل منفی و مثبت افزوده شده و نتیجه منفی کاذب را کنترل می‌کند بطور مثال اگر در ژل الکتروفورز یک نمونه هیچ باندی (قطعه ۷۷۰ جفت بازی و ٤٦٠ جفت بازی) مشاهده نشد؛ نشان دهنده عدم صحت مراحل انجام آزمایش مولکولی است و یک بار دیگر آزمایش مولکولی نمونه باید انجام شود.

*ب) تکثیر DNA*

تکثیر DNA به کمک روش کار کیت فوق در دستگاه ترموسایکلر انجام شد در این مطالعه توالی های ٤٦٠ و ۷۷۰ جفت بازی مورد تکثیر قرار گرفتند.

**ژل الکتروفورز:**

محصول PCR در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز گردید ، باندهای موردنظر در دستگاه ترانسلومیناتور مجهز به دوربین تحت نور UV مشاهده و مورد عکسبرداری قرار گرفت.

## نتایج

آزمایش رز بنگال بر روی ۱۰۰ نمونه سرم دامی انجام شد که ٤٠ نمونه آزمایش رز بنگال آنها مثبت شد. بر روی ٤٠ نمونه که آزمایش رز بنگال آنها مثبت شد؛ آزمایش رایت لوله‌ای، کومبس رایت و مولکولی انجام شد. ۲۰ نمونه آزمایش رایت لوله‌ای آنها مثبت شد؛ ٦ نمونه تیتر $\frac{۱}{۴۰}$، ۷ نمونه تیتر $\frac{۱}{۸۰}$، ۳ نمونه تیتر $\frac{۱}{۱۶۰}$ و ٤ نمونه تیتر $\frac{۱}{۵۱۲۰}$ را نشان دادند و ۲۰ نمونه آزمایش رایت لوله‌ای آنها منفی (تیتر $\frac{۱}{۲۰}$) شد.

۲ نمونه (تیتر $\frac{۱}{۲۰}$ و $\frac{۱}{۸۰}$ رایت لوله‌ای) آزمایش کومبس رایت آنها مثبت (تیتر $\frac{۱}{۵۱۲۰}$) شد؛ ۵ نمونه آزمایش مولکولی آنها مثبت شد، که شامل ۳ نمونه با تیتر رایت لوله‌ای $\frac{۱}{۵۱۲۰}$، ۱ نمونه با تیتر رایت لوله‌ای $\frac{۱}{۸۰}$ و تیتر $\frac{۱}{۵۱۲۰}$ کومبس رایت و ۱ نمونه با تیتر $\frac{۱}{۲۰}$ رایت لوله‌ای و تیتر $\frac{۱}{۵۱۲۰}$ کومبس رایت بودند.

میزان فراوانی بروسلوز در دام‌های اهلی (گوسفند و بز) شهرستان تنکابن برحسب آزمایش رزبنگال٤٠ ٪ ، رایت لوله‌ای ۲۰٪، کومبس رایت ۲٪، مولکولی ۵٪ شد (جدول ۲،۱).

**جدول ۱ـ** میزان فراوانی نسبی بروسلوز در دام‌های اهلی (گوسفند و بز) شهرستان تنکابن برحسب آزمایش رزبنگال، رایت لوله‌ای، کومبس رایت و مولکولی

| تعداد دام مورد بررسی | آزمایس رزبنگال | | آزمایش رایت لوله‌ای | | آزمایش کومبس رایت | | آزمون مولکولی (PCR) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | موارد مثبت | درصد موارد مثبت | موارد مثبت | درصد موارد مثبت | موارد مثبت | درصد موارد مثبت | موارد مثبت | درصد موارد مثبت |
| ۱۰۰ | ٤٠ | ٪٤٠ | ۲۰ | ٪۲۰ | ۲ | ٪۲ | ۵ | ٪۵ |

**جدول شماره ۲**- مقایسه نتایج PCR و سرولوژی

| آزمایش / نمونه | رایت لوله‌ای | کومبس رایت | PCR |
|---|---|---|---|
| ۱* | + | - | + |
| ۲ | + | - | + |
| ۳ | + | - | + |
| ٤ | - | + | + |
| ٥ | + | + | + |
| ٦-۲٤ | - | - | - |
| ۲٥-۳۰ | + | - | - |
| ۳۱-۳٦ | + | - | - |
| ۳۷-۳۹ | + | - | - |
| ٤۰ | + | - | - |

*) ٤۰-۱ شماره نمونه‌ها را نشان می‌دهد.

۳و۲و۱) رایت لوله‌ای $\frac{۱}{۵۱۲۰}$

٥) رایت لوله‌ای $\frac{۱}{۸۰}$ و کومبس رایت $\frac{۱}{۵۱۲۰}$

۳۰-۲٥) رایت لوله‌ای $\frac{۱}{۴۰}$

۳۹-۳۷) رایت لوله‌ای $\frac{۱}{۱۶۰}$

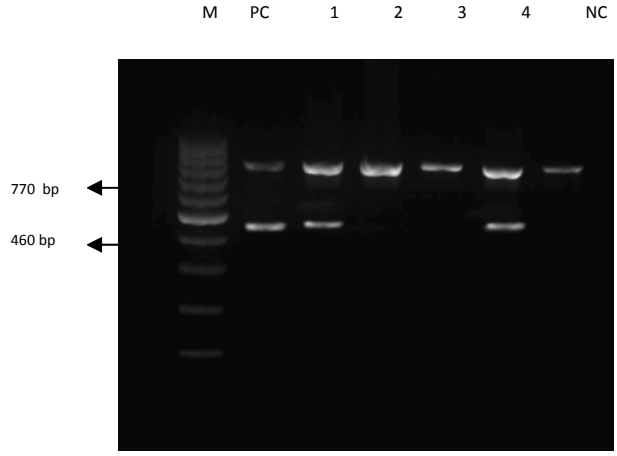
٤) رایت لوله‌ای $\frac{۱}{۲۰}$ و کومبس رایت $\frac{۱}{۵۱۲۰}$

٦-۲٤) رایت لوله‌ای $\frac{۱}{۲۰}$

۳٦-۳۱) رایت لوله‌ای $\frac{۱}{۸۰}$

٤۰) رایت لوله‌ای $\frac{۱}{۵۱۲۰}$

محصولات تکثیر DNA در نمونه‌های خون مطالعه شده در شکل (۱) نشان داده شده است. تمام نمونه‌ها (NC، ۱، ۲، ۳، ٤، PC) باند ۷۷۰ جفت بازی مربوط به کنترل داخلی را نشان دادند که نشان دهنده صحت انجام مراحل PCR است و باند ٤٦۰ جفت بازی در نمونه‌های کنترل مثبت (PC) و نمونه‌های مثبت (٤،۱) مشاهده شد.




**شکل ۱ـ** الکتروفورز بر روی ژل آگاروز و رنگ‌آمیزی به وسیله اتیدیوم برماید

M: شناساگر ملکولی (100 bP)

PC : کنترل مثبت (460bp)

NC : کنترل منفی (DNA – buffer)

1,4 : نمونه‌های مثبت (460bp)

2,3 : نمونه‌های منفی

NC,1,2,3,4,PC : کنترل داخلی (770pb)

## بحث

با توجه به اینکه دام‌های اهلی( گوسفند، بز و گاو) مخزن اصلی عامل بیماری هستند در نتیجه افزایش آلودگی در جوامع انسانی نسبت مستقیمی با شیوع گسترش یافته بیماری در دام‌ها دارد.

برنامه سازمان دامپزشکی در مقابله با بیماری کنترل و پیشگیری عامل بیماری می‌باشد.

کنترل بیماری به واسطه واکسیناسیون دام‌های حساس و دو اقدام تشخیص موارد آلوده و کشتار آنها جهت پیشگیری انجام می‌شود(۱).

شناسایی موارد آلوده توسط آزمایش‌های سرولوژیک رزبنگال، رایت لوله‌ای و 2ME انجام می‌شود و این آزمایش‌ها به علت حساسیت و اختصاصیت پایین، قادر به تشخیص صحیح موارد آلوده نمی‌باشند.

همچنین تشخیص دام مبتلا از طریق کشت میکروبی محدود به موارد خاص بوده و امکان نمونه‌برداری جهت کشت میکروبی در حجم وسیع انجام نمی‌شود(١٤ ، ١٣، ١).

چندین مطالعه استفاده PCR را برای تشخیص بروسلوز ارزیابی کردند(١٤، ١١، ٥،٤ ،٣ ، ٢ ).

در مطالعه‌ای که در شهرستان‌های نور، بابل، قائمشهر صورت گرفت(٢)، از ٤٠٥ نمونه خون انسانی مشکوک به بروسلوز؛ (٥/٧٪) ٢٣ نمونه آزمایش رایت لوله‌ای و 2ME مثبت داشتند که از این ٢٣ نمونه (٣/٢٪) ١٣ نمونه آزمایش مولکولی آنها مثبت شد اختلاف آزمایش سرولوژی و مولکولی به علت درمان بیماری وجود مهارکننده‌ها (ترکیبات هِم و DNA کامل میزبان) بیان شد .

به منظور جلوگیری از منفی کاذب آزمایش مولکولی، کنترل وجود ترکیبات بازدارنده (هِم و DNA کامل میزبان) در نمونه‌های خون اهمیت دارد.

در تحقیق حاضراز ١٠٠ نمونه خون دامی مشکوک به بروسلوز؛ ٢٠ نمونه آزمایش رایت لوله‌ای مثبت و ٥ نمونه آزمایش مولکولی مثبت داشتند که اختلاف فراوانی (١٥٪) بین آزمایش سرولوژی و مولکولی مشاهده می‌گردد.

که به منظور جلوگیری از موارد منفی کاذب آزمایش رایت لوله‌ای، به علت وجود آنتی بادی‌های بلوکان (IgG , IgA) و پدیده پرو زون (میزان بالای آنتی بادی در سرم) آزمایش کومبس رایت انجام شده همچنین نوع آنتی بادی یعنی IgM از IgG در بروسلوز توسط آزمایش کومبس رایت مشخص شد.

موارد منفی کاذب آزمایش مولکولی با عدم تشکیل باند مربوط به قطعه ٧٧٠ جفت بازی و ٤٦٠ جفت بازی مشخص شد.

مثبت بودن آزمایش مولکولی سه نمونه با تیتر رایت لوله‌ای $\frac{١}{٥١٢٠}$ و کومبس رایت منفی نشان دهنده حساسیت آزمایش مولکولی جهت تشخیص موارد حاد بیماری می‌باشد.

مثبت بودن آزمایش مولکولی ، دو نمونه با تیتر $\frac{١}{٢٠}$ و $\frac{١}{٨٠}$، که کومبس رایت آنها $\frac{١}{٥١٢٠}$ شد نشان دهنده حساسیت آزمایش مولکولی جهت تشخیص موارد مزمن می‌باشد.

اختلاف فراوانی نسبی سرولوژی نسبت به آزمایش مولکولی، ١٥٪ شد در نتیجه ١٥٪ از دام‌ها که آلوده نیستند به کشتارگاه اعزام می‌شوند و طبق روال غرامتی به آنها تعلق می‌گیرد؛ و از طرفی موارد منفی کاذب آزمایش‌های سرولوژی (رایت لوله‌ای و 2ME) در دامداری‌ها باقی مانده و سبب انتقال آلودگی در دام‌ها و انسان می‌گردد و واکسیناسیون در چنین دامداری‌هایی ثمره بخش نخواهد بود.

با توجه به اهمیت تشخیص صحیح موارد آلوده در کنترل و پیشگیری بیماری در جوامع دامی و انسانی بنظر می‌رسد استفاده از آزمایش‌های متکی بر تکنولوژی اسیدهای نوکلئیک (PCR) از حساسیت و اختصاصیت مناسبی جهت شناسایی موارد آلوده برخوردار می‌باشند.

و امید است با تداوم سیستم مراقبت اپیدمیولوژیکی با شناخت بموقع و بهنگام بیماری‌های دامی از جمله بروسلوز و ارائه روند آنها در مناطق و زمان‌های مختلف و با بکارگیری راهکارهای ضروری به اهداف این سیستم که قطعاً پیشگیری، کنترل و ریشه کنی بیماری‌ها است دست یابیم.

**تشکر و قدردانی**

با تشکر از ریاست محترم شبکه دامپزشکی تنکابن جناب آقای دکتر شمسی‌پور و پرسنل شبکه آقای دکتر سادات و آقای شریفی که در این پژوهش همکاری قابل توجه داشته‌اند.

## فهرست منابع


۱. سازمان دامپزشکی کشور. (۱۳۸۸): *برنامه اجرایی بررسی، مبارزه و مراقبت بیماری های دامی*: ۱۰-٤ و ۹۱-٦۷.

۲. ملکی. م. (۱۳۸٦): اپیدمیولوژی مولکولی بروسلا در مبتلایان به تب مالت استان مازندران، شهرستان‌های نور، بابل، قائمشهر. پایانامه کارشناسی‌ارشد: ٦۱- ۵۳.

3. Al Dahouk, S. Nockler, K., Scholz, H.C. Pfeffer, M. Neubauer, H. Tomaso, H. (2007): Evaluation of genus-specific and specific real- time PCR assays for the identification of Brucella spp. Clin. Chem. Lab. Med.45:1464-1470.

4. Bogdanovich, T. Skurnik, M. Lubeclek. P.S. Ahrens. P. Hoorfar, J. (2004): validated

5'. Nuclease PCR Assay for rapid identification of the genus Brucella. J. Clin. Microbiol. 42: 2261-2263.

5. Bounaadja, L. Albert, B. Chenais , B. Henault, S. Zygmunt,M. poliak , S.Garin-Bastuji,B. (2009): Real- time PCR for identification of Brucella spp: Acomparative study of Is 711 , bcsp 31 and per target genes. Vet. Mic. 137: 156-164.

6. Bricker, B.J. (2002):. PCR as diagnostic tool for brucellosis. Vet. Microbiol.90:435-446.

7. Cloeckaert, A: Grayon, M. Grepinet, O. (2000):. An IS711 element down stream of the bp26 gene is a specific of Bractlla spp. Isolated from marine mammals. Clin . Diagn. Lab. Immunol. 7: 835-839.

8. Foster, G. Osterman, B.S. Godfroid, J. Jacques, I. Cloeckaert, A. (2007): Brucella ceti sp. nov. and Brucella pinnipedialis sp. nov. for Brucella strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2680-2693.

9. Godfroid, J. Saegerman, C. Wallemans, V. Walravens, K. Letesson, J.J. Tibor, A. Mc. Millan, A. Spencer, S., Sanna. M., Bakker, D. 2002.How to substantiate eradication of bovine brucellosis when a specific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. Vet. Micro boil. 90:461-477.

10. Godfroid, J. Cloeckaert, A. Liautard, J.P Kohler, S. Fretin, D . walravens, K. GarinBastuji, B. Letesson, J.J. (2005): From the discovery of the Malta fever's agent to the brucellosis of a marine mammal reservoir, bnjrelloais has Continuosly been a reemerging zoonosis. Vet. Res. 36:313-326.

11. Lihan, z. Aksakal, A. Ekin, I.H Guihan, A. Solmaz, H. Erdenlig, S.(2008): Conparison Of Cultur and PCR for the Detection of Brucella melitensis in blood and Lymphoid Tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. lett appl Microbiol. 46:301-306.

12. Lübeck, P.S. Skurnik, M. Ahrens, P. Hoorfar, J. (2003): A multiplex PCR detection assay for Yersinia enterocolitica serotype 0:9 and Brucella spp. based on the perosamine synthetase gene. Application to Brurella diagnostics. Adv. Exp. Med. Biol. 529, 451 - 453.

13. Nielsen, K. Smith, P. Widdison, J. Gall, D. Kelly, L. Kelly, W. Nicoletti, P. (2004): Serological relationship between cattle exposed to Brucella abortus, Yersinia enterocolitica O:9 and Escherichia O157: H7. Vet. Microbial. 100:25-30.

14. Scholz, H.C. Hubalek, Z. Sedlácek, I. Vergnaud, G. Tomaso, H. Al Dahouk, S. Melzer, F. Kampfer, P. Neubauer, H. Cloeckaert, A. Maquart, M. Zygmunt, MS.Whatmore, AM. Falsen, E. Bahn, P. Gollner, C. Pfeffer, M. Huber, B. Busse H.J Nockler, K. (2008): Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole Microtus arvalis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 59: 375-382.