

DOI: 10.7251/VETJ1401011Z

UDK 636.2.09:616.981.42

A. Zorić,¹ I. Krdžić¹*Originalni rad***UPOREDNA ANALIZA SEROLOŠKIH METODA
U DIJAGNOSTICI BRUCELOZE GOVEDA****Kratak sadržaj**

Bruceloza je zarazno oboljenje domaćih, divljih životinja i ljudi, rašireno u celom svetu. Dijagnostika bruceloze putem izolacije uzročnika je veoma teška, dugotrajna i predstavlja rizik od infekcije. Iz tih razloga, serološke metode predstavljaju metode izbora.

Cilj rada je bila uporedna analiza specifičnosti i osetljivosti testova za dijagnostiku bruceloze koji se rutinski koriste na teritoriji Republike Srbije.

Ukupno je ispitano 120 uzoraka krvnog seruma goveda na prisustvo specifičnih antitela protiv *Brucella spp.* Svi serumi su prvo ispitani primenom Rose Bengal testa. Uzorci koji su pokazali pozitivnu reakciju su zatim ispitivani primenom iELISA i cELISA testa. Izračunavanje osetljivosti i specifičnosti seroloških testova je sprovedeno na osnovu dobijenih rezultata.

Analizom osetljivosti i specifičnosti zaključeno je da su obe metode (Rose Bengal test, iELISA test) visoko osetljive (100%, 92%) sa razlikom od 8% u korist iELISA testa, koji se pokazao i kao daleko specifičnija metoda (91%) u odnosu na *Rose Bengal* test (69%).

Uporednom analizom rezultata dobijenih u ispitivanju osetljivosti i specifičnosti Rose Bengal testa i indirektno imunoenzimske metode (iELISA) u otkrivanju specifičnih antitela protiv *Brucella spp.* u krvnim serumima goveda, utvđena je veća osetljivost i specifičnost metode iELISA u odnosu na *Rose Bengal* test.

Ključne reči: bruceloza, serološki testovi, osetljivost, specifičnost.

¹ Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18, Republika Srbija.
Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade, Bulevar oslobođenja 18, Republic of Serbia.

E-pošta korespondentnog autora/ E-mail of the corresponding author: krki.kv@gmail.com

A. Zorić,¹ I. Krdžić¹

Original paper

A COMPARATIVE EXAMINATION OF SEROLOGICAL METHODS IN DIAGNOSTICS OF BOVINE BRUCELLOSIS

Abstract

Brucellosis is a contagious disease that occurs worldwide, affecting a large number of domestic and wild animals along with people. Isolation of the causative agent is arduous, time-consuming and hazardous. For these reasons, serological tests are normally preferred.

The aim of this study was to compare the specificity and sensitivity of diagnostic tests for brucellosis commonly used in Serbia.

A total of 120 bovine serum samples were used in order to detect the presence of anti - *Brucella* antibodies. All sera were firstly examined using the Rose Bengal test. Sera that demonstrated positive reactions were additionally tested using indirect ELISA and competitive ELISA. Based on the analysis of the results obtained, evaluation of sensitivity and specificity of these tests was conducted.

Both Rose Bengal and iELISA tests demonstrated to be highly sensitive (100%, 92%), while iELISA test proved to be markedly more specific (91%) than Rose Bengal test (69%).

By comparison of the results of Rose Bengal test and iELISA, iELISA proved to be more sensitive and specific.

Key words: brucellosis, serological tests, sensitivity, specificity.

UVOD/ INTRODUCTION

Бруцелоза је заразно обољење домаћих, дивљих животиња и људи које представља глобално значајну зооантропонозу са више од 500.000 оболелих људи годишње (Matović i sar., 2008; Seleem i sar., 2010). Код животиња се најчешће манифестује репродуктивним сметњима. Абор-

тус, често само након прве гестације, или рађање мртвих, слабо виталних младунца су најчешћи клинички симптоми код женки, док се код мушких животиња развијају орхитис и епидидимитис са последичном појавом стерилитета (Rahman i sar., 2006; Godfroid i sar., 2010). С обзиром на хроничан ток болести који је уобичајен код

животinja i atipičnu kliničku sliku, ovu bolest je teško kako kontrolisati, tako i dijagnostikovati. Kontrola bruceloze je naročito značajna u zemljama mediteranskog endemskog područja, kojima pripada i Srbija (Matović i sar., 2008). Dijagnostika bruceloze putem izolacije uzročnika je veoma teška, dugotrajna i predstavlja rizik od infekcije (Poester i sar., 2010). Ovi patogeni su jedni od najčešćih uzročnika laboratorijskih infekcija i predstavljaju profesionalni hazard u veterinarskoj praksi (Agasthya i sar., 2007; Seleem i sar., 2010). Iz tih razloga, serološke metode predstavljaju metode izbora i najčešće se koriste za dijagnostiku bruceloze говеда i malih преживара на nivou запата (Poester i sar., 2010). Metоd brze aglutinacije, odnosno *Rose Bengal* test se koristi kao *screening* test s obzirom na svoju jednostavnost i brzinu, a pre svega senzitivnost. Reakcija vezivanja komplementa (RVK) jeste metoda preporučena od strane OIE-a (*Office International des Epizooties*) kao referentni test. Nedostaci ove metode su što za njeno izvođenje mora postojati specijalizovana laboratorija, teško se standardizuje, vreme izvođenja je dugo i nepogodna je za ispitivanje velikog broja uzoraka, tako da je ista sve više potisnuta upotrebom imunoenzimskih (ELISA) testova (Godfroid i sar., 2010). Imunoenzimske metode se dele u dve kategorije: indirektni ELISA test (iELISA) i kompetitivni ELISA test (cELISA). Indirektna imunoenzimska metoda – iELISA kao antigen sadrži *Brucella*-LPS (lipopolisaharid, endotoksin) i predstavlja visoko senzitivан test, međutim, moguća je unakrsna reakcija sa nekim vrstama gram-negativnih

mikroorganizama (soj O3 i O9 *Yersinia enterocolitica*, soj OX19 *Proteus vulgaris* i dr.), što ima za posledicu dobijanje lažno pozitivnih rezultata koji mogu da dovedu do nanošenja ozbiljnih ekonomskih šteta, s obzirom na to da se bruceloza eradikuje pomoću striktnih veterinarsko-sanitarnih mera. Povećanju specifičnosti seroloških testova znatno je doprineo razvoj cELISA testa, u kome se koriste monoklonska antitela specifična za epitope *Brucella*-LPS (lipopolisaharidni antigen). Kompetitivni imunoenzimski test (cELISA) specifičniji je u odnosu na iELISA i *Rose Bengal* test (Matović i sar., 2008; Godfroid i sar., 2010). S obzirom na moguće greške u dijagnostici bruceloze sa ozbiljnim posledicama, dijagnostičke procedure se moraju konstantno ispitivati i unapređivati (Nicoletti, 1976; Matović i sar., 2008).

Cilj ovog rada je bila uporedna analiza specifičnosti i osetljivosti testova za dijagnostiku bruceloze koji se rutinski koriste na teritoriji Republike Srbije.

MATERIJAL I METODE/ MATERIAL AND METHODS

Ukupno je ispitano 120 uzoraka krvnog seruma говеда на prisustvo specifičnih antitela protiv *Brucella* spp.

Navedeni uzorci krvnog seruma su ispitivani *Rose Bengal* testom, indirektnim (iELISA) testom i kompetitivnim (cELISA) testom. Svi serumi su prvo ispitani primenom *Rose Bengal* testa. Uzorci koji su pokazali pozitivnu reakciju su zatim ispitivani primenom iELISA i cELISA testa.

Za reakciju brze aglutinacije korišćen je antigen BAB-VZ ANTIGEN® proizvođača Veterinarski zavod Zemun, Srbija. Pri izvođenju iELISA testa, korišćen je set kit Prio-CHECK *Brucella* Ab i-ELISA proizvođača Prionics, Švajcarska. Za izvođenje cELISA testa je korišćen set kit Svanovir *Brucella*-Ab cELISA proizvođača Svanova, Švedska.

Rose Bengal test je sproveden po proceduri propisanoj od strane Međunarodne organizacije za epizootije (OIE Manual, 2009). Izvođenje iELISA i cELISA testova i interpretacija rezultata su sprovedeni prema uputstvu proizvođača. Izračunavanje osetljivosti i specifičnosti seroloških metoda izvršeno je prema modelu prikazanom u tabeli 1.

Tabela 1. Računanje osetljivosti i specifičnosti seroloških testova korišćenih u dijagnostici

Testiranje i rezultati		Status životinje (Referentni test)		Zbir rezultata Σ
		Inficirana životinja (Poz. (+) vrednost)	Neinficirana životinja (Neg. (-) vrednost)	
Rezultati	Poz. (+)	TP	FP	TP + FP (manifestna prevalenca)
	Neg. (-)	TN	FN	TN + FN
Zbir rezultata Σ		TP + FN (stvarna prevalenca)	TN + FP	N
Osetljivost (Se) Specifičnost (Sp)		Se= TP / (TP+FN)	Sp= TN / (TN + FP)	

TP – stvarno pozitivni uzorci; FP – lažno pozitivni uzorci; FN – lažno negativni uzorci; TN – stvarno negativni uzorci; N – ukupan broj uzoraka oba testa; Se – osetljivost testa; Sp – specifičnost testa

REZULTATI/ RESULTS

Rezultati ispitivanja uzoraka krvnog seruma goveda prikazani su u tabeli 2. i tabeli 3.

Od 120 ispitanih uzoraka seruma, 45 je pokazalo pozitivnu reakciju brze aglu-

tinacije *Rose Bengal* testom, a u 12 uzoraka su pomoću iELISA testa detektovana antitela protiv *Brucella spp.* (tabela 2). Procenat pozitivnih seruma ispitanih *Rose Bengal* testom je za 27,5% veći od procenta pozitivnih na iELISA testu.

Tabela 2. Rezultati Rose Bengal testa i iELISA testa

Test	Broj ispitanih seruma	Broj pozitivnih	Broj negativnih	% pozitivnih
Rose Bengal	120	45	75	37,5
iELISA	120	12	108	10

Od ukupno 45 uzoraka krvnog seruma ispitanih iELISA testom, odbačeno je 22 uzorka, od kojih je 12 bilo pozitivnih, a 10 sumnjivo na prisustvo specifičnih antitela protiv *Brucella spp.*

Od 22 uzorka seruma ispitanih cELISA testom, ustanovljeno je 11 pozitivnih uzoraka seruma, što je za 4,54% manje od vrednosti dobijenih iELISA testom (tabela 3).

Tabela 3. Rezultati iELISA i cELISA testa

Test	Broj ispitanih seruma	Broj pozitivnih	Broj negativnih	% pozitivnih
iELISA	22	12	10	54,54
cELISA	22	11	9	50

Izračunavanje osetljivosti i specifičnosti metoda korišćenih u ispitivanjima izvršeno je primenom jednačina navedenih u poglavlju Metode (tabela 1).

Osetljivost i specifičnost *Rose Bengal* testa su izračunati na osnovu rezultata dobijenih pomoću iELISA testa kao referentnog. Rezultati su prikazani u tabeli 4.

$$\text{Osetljivost, Se} = TP / (TP+FN) = 12 / (12+1) = 12/13 = 0,92 \times 100 = 92\%$$

$$\text{Specifičnost, Sp} = TN / (TN+FP) = 74 / (74+33) = 74/107 = 0,69 \times 100 = 69\%$$

Tabela 4. Osetljivost i specifičnost Rose Bengal testa

iELISA			
RBT	Pozitivni	Negativni	Ukupno
Pozitivni	12	33	45
Negativni	1	74	75
Ukupno	13	107	120
Osetljivost RBT			0.923076923
Specifičnost RBT			0.691588785

Осетљивост и специфичност iELISA testa јених помоћу cELISA testa као референ-
 су израчунати на основу резултата доби- тог. Резултати су приказани у табели 5.

$$\text{Осетљивост, } Se = TP / (TP+FN) = 11 / (11+0) = 11/11 = 1 \times 100 = 100\%$$

$$\text{Специфичност, } Sp = TN / (TN+FP) = 10 / (10+1) = 10/11 = 0,91 \times 100 = 91\%$$

Табела 5. Осетљивост и специфичност iELISA testa

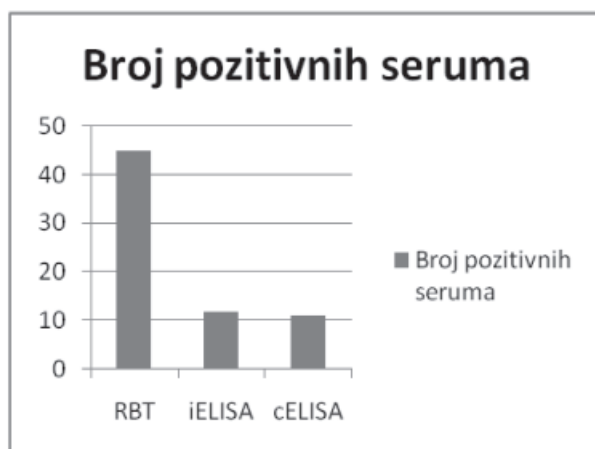
cELISA			
iELISA	Позитивни	Негативни	Укупно
Позитивни	11	1	12
Негативни	0	10	10
Укупно	11	11	22
Осетљивост iELISA			1
Специфичност iELISA			0.909090909

Анализом осетљивости и специфичности закључено је да су обе методе (*Rose Bengal test*, iELISA test) високо осетљиве (100%, 92%), са разликом од 8% у корист iELISA testa, који се показао и као далеко специфичнија метода (91%) у односу на *Rose Bengal test* (69%).

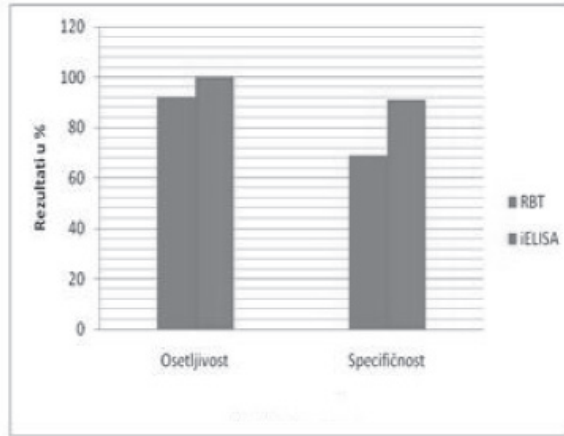
Упоредни приказ броја серума који су показали позитивну реакцију применом

Rose Bengal testa, iELISA testa и cELISA testa (графикон 1).

Збирни приказ резултата испитивања осетљивости и специфичности коришћених метода у откривању присуства специфичних антитела против *Brucella spp.* у узорцима крвних серума говеда (графикон 2).



Графикон 1. Упоредни приказ броја серума који су показали позитивну реакцију применом *Rose Bengal* testa, iELISA testa и cELISA testa



Grafikon 2. Prikaz rezultata ispitivanja osetljivosti i specifičnosti korišćenih metoda u otkrivanju prisustva specifičnih antitela protiv *Brucella* spp.

DISKUSIJA/ DISCUSSION

Klinička dijagnoza bruceloze se ne postiže jednostavno, s obzirom na prirodu bolesti. Primena laboratorijskih testova je neophodna za brzo i pouzdano otkrivanje ove zoonoze kod ljudi i životinja. Najpouzdanija dijagnostika ovog oboljenja postiže se izolacijom i identifikacijom uzročnika, za šta je potreban duži vremenski period, kao i uspostavljanje biosigurnosnog nivoa 3 u laboratorijama. Na osnovu ispitivanja velikog broja dijagnostičkih metoda, može se zaključiti da svaka ima svojih prednosti i mana. Brza aglutinacija *Brucella* će zasigurno ostati osnova u dijagnostici bruceloze kao *screening* test. Pored ovog testa, indirektna imunoenzimski metoda (iELISA), kao i kompetitivna imunoenzimski metoda (cELISA) zbog svoje specifičnosti i osetljivosti našle su široku primenu u serološkoj dijagnostici bruceloznih infekcija kod životinja (Nicoletti, 1976; Poester i sar., 2010; Godfroid i sar., 2010). Rezultati analize efikasnosti

lančane reakcije polimeraze (PCR) ukazuju na veliku pouzdanost ove metode za *screening* obolelih grla, posebno u kombinaciji sa iELISA testom, kada kombinovana osetljivost ovih metoda dostiže 100% (Romero i sar., 1995; Mukherjee i sar., 2007). U studiji koju su McGiven i sar. izvršili 2003. godine, prikazane su prednosti fluorescentnog polarizacionog testa (FPA) kao novije metode u odnosu na serum aglutinacioni test (SAT) i RVK koje su već dugo u upotrebi.

Od ukupno 120 uzoraka krvnog seruma goveda, 45 je bilo pozitivno na prisustvo specifičnih antitela primenom Rose Bengal testa, odnosno 12 uzoraka primenom iELISA testa. Razlika od 33 uzorka se pripisuje lažno pozitivnim rezultatima kao posledica niže specifičnosti Rose Bengal testa, odnosno najverovatnije ukrštene reakcije sa antigenski srodnim mikroorganizmima (Corbel i Cullen, 1970). Dvanaest uzoraka krvnog seruma ispitanih metodom iELISA bilo je pozitivno na prisustvo specifičnih antitela

protiv *Brucella spp.*, dok je primenom cELISA testa utvrđeno 11 pozitivnih uzoraka. Ovi rezultati ukazuju na razliku u specifičnosti ovih metoda, što potvrđuju i radovi drugih autora (Gall i sar., 1998; Samartino i sar., 1999; Portranti i sar. 2006; Tardepalli i sar., 2009; Godfroid i sar., 2010; Perrett i sar., 2010).

Na osnovu rezultata ispitivanja seruma, može se zaključiti da oba prethodno navedena testa imaju veću osetljivost i specifičnost od metode brze aglutinacije na pločici (Paweska i sar., 2002; Gall i sar., 2004; Matović i sar., 2008).

Tabela 6. Uparedni prikaz izračunatih osetljivosti i specifičnosti *Rose Bengal* i iELISA testova po autorima

Serološki testovi		Naši rezultati	Sanogo i sar. (2013)	Matović i sar. (2008)	Muma i sar. (2007)	Mainar-Jaime i sar. (2005)	Paweska i sar. (2002)	Uzal i sar. (1995)
<i>Rose Bengal</i> test	Se	92%	54,9%	96%	93%	100%	/	/
	Sp	69%	97,7%	71,3%	81%	86,4%	/	/
iELISA	Se	100%	96,1%	100%	/	98,9%	100%	98,07%
	Sp	91%	95%	96,07%	/	100%	99,8%	97,2%

Poređenjem naših rezultata sa drugim autorima ne zapažaju se znatnije razlike. Matović i sar. (2008) vršili ispitivanje seroloških metoda u dijagnostici bruceloze goveda, pri čemu su izračunata specifičnost *Rose Bengal* testa (69%), kao i osetljivost, odnosno specifičnost iELISA testa (100% i 91%) najbližiji našim rezultatima. U analizi koju su izvršili Paweska i sar. (2002), osetljivost iELISA testa takođe iznosi 100%, dok je izračunata specifičnost ovog testa 99,8%, što je vrednost veća nego u našem ispitivanju (91%). Izračunata osetljivost *Rose Bengal* testa (Muma i sar., 2007) iznosila je 93%, što predstavlja vrednost blisku rezultatu dobijenom u našem istraživanju (92%), dok je specifičnost (81%) nešto viša. Rezultati ispitivanja Mainar-Jaime

i sar. (2005) pokazali su da je osetljivost i specifičnost *Rose Bengal* testa iznosila 100% odnosno 86,4%, a specifičnost iELISA testa 100%. Rezultati navedenih autora se u pogledu osetljivosti i specifičnosti razlikuju od rezultata dobijenih u našem ispitivanju. U svojim ispitivanjima, Sanogo i sar. (2007) ustanovili su da je specifičnost i osetljivost *Rose Bengal* testa iznosila 97,7%, odnosno 54,9% što se procentualno najviše razlikovalo kako od rezultata naših ispitivanja, tako i od rezultata drugih autora.

ZAKLJUČAK/ CONCLUSION

Uparednom analizom rezultata dobijenih u ispitivanju osetljivosti i specifičnosti *Rose Bengal* testa i indirektno imunoenzimske metode (iELISA) u otkriva-

nju prisustva specifičnih antitela protiv *Brucella spp.* u krvnim serumima goveda, utvrđena je veća osetljivost i specifičnost metode iELISA u odnosu na *Rose Bengal* test.

LITERATURA/ REFERENCES

1. Agasthya, A. S.; Isloor, S.; Prabudhas, K. (2007): *Brucellosis in high risk group individuals*, Indian J Med Microbiol 25: 28–31.
2. Corbel, M. J.; Cullen, G. A. (1970): *Differentiation of the serological response to Yersinia enterocolitica and Brucella abortus in cattle*, J Hyg 68: 519–530.
3. Gall, D.; Colling, A.; Marino, O.; Moreno, E.; Nielsen, K.; Perez, B.; Sammartino, L. (1998): *Enzyme Immunoassays for Serological Diagnosis of Bovine Brucellosis: A Trial in Latin America*, Clin Vaccine Immunol 5: 654–661.
4. Gall, D.; Nielsen, K. (2004): *Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison*, Rev Sci Tech 23: 989–1002.
5. Godfroid, J.; Nielsen, K.; Saegerman, C. (2010): *Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife*, Croat Med J 51: 296–305.
6. Mainar-Jaime, R. C.; Munoz, P. M.; Miguel, M. J.; Grillo, M. J.; Marin, C. M.; Moriyon, I.; Blasco, J. M. (2005): *Specificity dependence between serological tests for diagnosing bovine brucellosis in Brucella-free farms showing false positive serological reactions due to Yersinia enterocolitica O:9*, Can Vet J 46: 913–916.
7. Matović, K.; Ašanin, R.; Radojičić, S.; Lako, B.; Žarković, A. (2008): *Examination of sensitivity and specificity of some serological tests in diagnostics of bovine brucellosis*, Acta Vet (Beograd) 58: 467–476.
8. McGiven, J. A.; Tucker, J. D.; Perrett, L. L.; Stack, J. A.; Brew, S. D.; MacMillan, A. P. (2003): *Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to Brucella abortus in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA*, J Immunol Methods 278: 171–178.
9. Mukherjee, F.; Jain, J.; Patel, V.; Nair, M. (2007): *Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals*, J Med Microbiol 56: 1309–1316.
10. Muma, J. B.; Toft, N.; Oloya, J.; Lund, A.; Nielsen, K.; Samui, K.; Skjerve, E. (2007): *Evaluation of three serological tests for brucellosis in naturally infected cattle using latent class analysis*, Vet Microbiol 125: 187–192.
11. Nicoletti, P. (1976): *Problems in the diagnosis of bovine brucellosis*, Dev Biol Stand 31: 131–135.
12. OIE Manual (2009): *Chapter 2.4.3. Bovine brucellosis*, OIE Terrestrial manual 2012: manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, World Organisation for Animal Health, Paris, France: 616–650.

13. Paweska, J. T.; Potts, A. D.; Harris, H. J.; Smith, S. J.; Viljoen, G. J.; Dungu, B.; Brett, O. L.; Bubb, M.; Prozesky, L. (2002): *Validation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against Brucella abortus in cattle sera using an automated ELISA workstation*, Onderstepoort J Vet Res 69: 61–77.
14. Perrett, L. L.; McGiven, J. A.; Brew, S. D.; Stack, J. A. (2010): *Evaluation of Competitive ELISA for Detection of Antibodies to Brucella Infection in Domestic Animals*, Croat Med J 51: 314–319.
15. Poester, F. P.; Nielsen, K.; Samartino, L.; Yu, W. L. (2010): *Diagnosis of Brucellosis*, The Open Vet Sci J 4: 46–60.
16. Portanti, O.; Tittarelli, M.; Di Febo, T.; Luciani, M.; Mercante, M. T.; Conte, A.; Lelli, R.; (2006): *Development and validation of a competitive ELISA kit for the serological diagnosis of ovine, caprine and bovine brucellosis*, J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 53: 494–8.
17. Rahman, M. S.; Uddin, M. J.; Park, J.; Chae, J.; Rahman, M. B.; Islam, M. A. (2006): *A short history of brucellosis: Special emphasis in Bangladesh*, Bangl J Vet Med 4: 1–6.
18. Romero, C.; Pardo, M.; Grillo, M. J.; Diaz, R.; Blasco, J. M.; Lopez-Goni, I. (1995): *Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle*, J Clin Microbiol 33: 3198–3200.
19. Samartino, L.; Gall, D.; Gregoret, R.; Nielen, K. (1999): *Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis*, Vet Microbiol 70: 193–200.
20. Sanogo, M.; Thys, E.; Achi, Y. L.; Fretin, D.; Michel, P.; Abatih, E.; Berkvens, D.; Saegerman, C. (2013): *Bayesian estimation of the true prevalence, sensitivity and specificity of the Rose Bengal and indirect ELISA tests in the diagnosis of bovine brucellosis*, Vet J 195: 114–120.
21. Seleem, M. N.; Boyle, S. M.; Sriranganatan, N. (2010): *Brucellosis: A re-emerging zoonosis*, Vet Microbiol 140: 392–398.
22. Tadepalli, M.; Rajendra, L.; Bhavesh, T.; Thiagarajan, D.; Srinivasan, V. A. (2011): *Development and Comparative Evaluation of a Competitive ELISA with Rose Bengal test and a Commercial Indirect ELISA for Serological Diagnosis of Brucellosis*, Indian J Microbiol 51: 528–530.
23. Uzal, F. A.; Carrasco, A. E.; Echaide, S.; Nielsen, K.; Robles, C. A. (1995): *Evaluation of an Indirect ELISA for the Diagnosis of Bovine Brucellosis*, J Vet Diagn Invest 7: 473–475.