نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۴۲، بهـار ۱۴۰۱
ص‌ص: ۷۱~۷۶

ارزیابی سرمی و مولکولی بیماری بروسلوز در جمعیت شتر استان خراسان جنوبی

• **سعید عالمیان[۱] .سعیدزیبائی[۲*] حمید رضا فرزین[۳]. محمد اصغر زاده[۴] . فاطمه صباغ زاده [۴] .مریم دادار[۱] . افشار اعتمادی[۵]**

۱-استاد یار موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی ، بخش بروسلوز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- دانشیار موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیق و توسعه فرآورده‌های بیولوژیک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۳- استادیار موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیق و توسعه فرآورده‌های بیولوژیک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۴- سازمان دامپزشکی.اداره کل دامپزشکی خراسان جنوبی.بیرجند.ایران

۵- موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی ، بخش بروسلوز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت : فروردین ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش : خرداد ۱۴۰۱

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۰۴۵۹۱۹

Email: S.zibaee@rvsri.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI):10.22092/ aasrj.2022.126944

چکیده:

بروسلوز یکی از بیماری های دامی است که توسط گونه های باکتری جنس بروسلا ایجاد شده و قابل انتقال به انسان می باشد. مطالعه حاضر به منظور تعیین شیوع سرمی و مولکولی این بیماری در شترهای استان خراسان جنوبی ، طی یک دوره یک ساله در سال ۱۴۰۰ انجام پذیرفت. جهت ردیابی عفونت بروسلوز در این حیوانات، آزمون های سرم شناسی شامل رزبنگال، رایت و تست حلقه ای شیر بر روی تعداد ۱۵۱ نمونه سرم و ۱۰۳ نمونه شیر انجام شد. نمونه گیری از شهرستان های استان خراسان جنوبی شامل بیرجند، نهبندان، قائنات و بشرویه انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که تعداد ۴۲ نمونه در تست رزبنگال مثبت تشخیص داده شد. سپس جهت تعیین عیار پادتن های مربوطه، آزمون رایت نیز بر روی نمونه های مثبت انجام شده و میزان عیار آنتی بادی های در ۹ نمونه در این آزمون رایت با تیتر ۱/۸۰ مثبت تشخیص داده شد. درآزمایشات مولکولی بر روی شیرتعداد ۲ نمونه مثبت بود و باکتری شناسایی شده بروسلا ملیتنسیس تشخیص داده شد. این مطالعه حضور و شیوع بیماری بروسلوز را میان شترهای استان خراسان جنوبی مشخص نموده و نتایج حاصل،ضرورت به کارگیری برنامه های کنترلی این بیماری را نشان داده و اقدامات نظارتی بایستی مدنظر قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: آنتی بادی ، بروسلا ملیتنسیس ،شتر، خراسان جنوبی ، ایران

Applied Animal Science Research Journal No 42 pp: 71-76

Serum and molecular evaluation of brucellosis in camel population of South Khorasan province

By: Saeed Alamian[1] . Saeed Zibaei[2*]. Hamidreza Farin[3]. Mohammad Asgharzadeh [4]. Fatemeh Sabbaghzadeh [4] .Maryam Dadar [1]. Afshar Etemadi [5]
1-Assistant Professor Razi Vaccine and Serum Research Institute. Brucellosis Department. Agricultural Research, Education andExtension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2-Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Northeast Branch, Department of Research and Development of Biological Products, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran
3-Assistant Professor Razi Vaccine and Serum Research Institute, Northeast Branch, Department of Research and Development of Biological Products, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran
4-Veterinary Organization. General Veterinary Administration of South Khorasan. Birjand. Iran
5- Razi Vaccine and Serum Research Institute. Brucellosis Department. Agricultural Research, Education andExtension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: April 2022 **Accepted: June 2022**

rucellosis is an animal disease caused by a species of the bacterium Brucella that can be transmitted to humans. The present study was performed to determine the serum and molecular prevalence of this disease in camels of South Khorasan province during a one-year period in 1400. To detect brucellosis infection in these animals, serological tests including rose bengal, burn and milk ring test were performed on 151 serum samples and 103 milk samples. Sampling was done from the cities of South Khorasan province including Birjand, Nehbandan, Ghaenat and Boshrouyeh. The results showed that 42 samples were positive in the Rose Bengal test. Then, in order to determine the titer of the relevant antibodies, Wright test was performed on positive samples and the amount of antibody titer in 9 samples in this Wright test was detected with a positive titer of 1.80. In molecular tests on milk, 2 samples were positive and the identified bacterium Brucella melitensis was detected. This study determined the presence and prevalence of brucellosis among camels in South Khorasan province and the results showed the need to use control programs for this disease and monitoring measures should be considered.

مقدمه

بیماری بروسلوز از جمله بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است که به وسیله باکتری میله‌ای گرم منفی و درون سلولی اختیاری از جنس بروسلا به وجود می‌آید. این بیماری در حیوانات باعث کاهش تولید شیر، افزایش زمان بین دو زایش، و تداخل در برنامه تولید مثل می‌شود و یکی از مسأله‌سازترین مشکلات بهداشتی جهان، به ویژه در مناطقی از جمله ایران، ترکیه، شبه جزیره عربستان و حتی قسمتی از آمریکای مرکزی و جنوبی است(۱, ۲). این باکتری می‌تواند از راه‌های مختلفی همچون تماس مستقیم با ترشحات تناسلی (به ویژه هنگام سقط)، خون، بافت و شیر منتقل شود. همچنین، احتمال انتقال بیماری از راه گوارشی (مصرف مواد لبنی آلوده)، تنفسی و گاهی از راه عمودی وجود دارد(۲-۴). پس از ورود باکتری و تهاجم اولیه، جرم در عقده‌های لنفاوی ناحیه جایگزین شده و از طریق لنف و خون گسترش می‌یابد و به اندام‌های دیگر از جمله کبد، طحال، مغز استخوان و سایر قسمت های سیستم رتیکولواندوتلیال انتقال می‌یابد. باکتریمی موقت موجب انتشار و موضعی شدن باکتری در اندام‌ها و غدد

ضمیمه تناسلی حیوانات بالغ می‌شود. این بیماری توسط چند گونه از باکتری های جنس بروسلا در انسان و حیوانات ایجاد می شود و تاکسونومی و تمایز گونه های جنس بروسلا بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی، پادگنی و خواص متابولیسمی انجام می گیرد(۵, ۶). در حیوانات در مناطق معتدل بروسلوز حاد بیشتر در فصل‌های بهار و تابستان رخ می‌دهد، زمانی که بیش‌ترین موارد سقط و زایمان اتفاق می‌افتد. علت آن می‌تواند به برخورد بیشتر حیوانات با ترشحات تناسلی و شیر مربوط باشد(۷, ۸). بروسلوز شتر برای نخستین بار در سال ۱۹۳۱ توسط سولونی‌تسین گزارش شد(۹).گر چه علایم کمتری نسبت به گاو نشان می‌دهد. آلودگی تجربی شترهای یک کوهانه غیر آبستن با سوش‌های فیلدی بروسلا ابورتوس، علایم خفیف و گذرای کاهش اشتها، لنگش خفیف و ترشح دوطرفه اشک را در پی داشت. اورکیت، التهاب اپیدیدیم، التهاب جفت، جفت ماندگی، عفونت ادرای، مرگ جنین و مومیایی شدن، به تأخیر افتادن بلوغ و ناباروری، ارتریت، هیگروما و سقط نیز از علایم قابل مشاهده در موارد بروسلوز شتران است(۱۰). بر اساس آمار منتشر شده توسط سازمان خوار و با جهانی کمابیش ۲۴ میلیون نفر شتر در جهان وجود دارد که از این میزان ۱۵۲ هزار نفر در ایران هستند. بیش‌ترین جمعیت شتر در ایران به ترتیب مربوط به استان‌های سیستان و بلوچستان، خراسان، کرمان، یزد و هرمزگان است. شتر در ایران بیشتر به منظور تولید گوشت و در مرتبه بعد برای تولید شیر، پشم و مو نگهداری می‌شود، به نحوی که در سال ۱۳۸۲ در استان سمنان ۶۳۴۴ کیلوگرم پشم و مو از این حیوان تولید شده است(۱۱). در ایران تعداد زیادی از شترها در پرورش مخلوط نزدیک به سایر دام ها نگهداری می شوند که این مساله باعث انتقال پاتوژن های گاو و گوسفند در شترها شده است. از طرفی همراه نبودن اقدامات کنترلی و پیشگیرانه وضعیت بررسی بیماری های شایع در شتر را دشوارتر می نماید. پیشگیری و کنترل بیماری بروسلوز در دام ها وابستگی کامل به یک برنامه مراقبت ملی کارآمد و سیستم فعال نظارتی داشته و پیچیدگی وضعیت اپیدمیولوژیکی بیماری و نبود اطلاعات آماری دقیق در مورد جمعیت شترها و حضور بیماری در آنها، از عواملی هستند که کنترل این بیماری را در این گونه دامی بشدت تحت تاثیر قرار می دهند. از آنجا که شتر رابطه نزدیکی با اجتماع انسانی به ویژه در کشورهای جهان سوم دارد، می‌تواند بسیاری از عومل پاتوژن را به انسان منتقل کند. شتر به فراوانی از مرزهای شرقی به کشورمان وارد می‌شود و به نقاط مختلف کشور برده می‌شود، بنابراین، احتمال گسترش بیماری از این راه وجود دارد. در مطالعات منتشر شده، وجود بروسلا در شتر به اثبات رسیده است(۱۲, ۱۳). از آنجا که اطلاعات دقیقی از وضعیت بروسلوز در شترهای منطقه خراسان جنوبی وجود ندارد، این مطالعه در نظر دارد، وضعیت بروسلوز را در خون و شیر های گرفته شده از مناطق مختلف استان خراسان جنوبی بررسی نماید.

۲-روش کار:

۲-۱-نمونه برداری:

در طی مدت یکسال تعداد ۱۵۱ نمونه سرم خون و ۱۰۳ نمونه شیر از شترهای استان خراسان جنوبی اخذ شد. نمونه گیری درشهرستان های استان خراسان جنوبی شامل بیرجند(۵۳ سرم و ۱۷ شیر)، نهبندان(۵۲سرم و ۴۰ شیر)، قائنات (۱۵ سرم و ۳۰ شیر)،بشرویه(۳۱ سرم ۱۶ شیر) انجام گرفت.

نمونه های خون فاقد ماده ضدانعقاد پس از اخذ در جوار یخ به آزمایشگاه بروسلوز موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در کرج منتقل شده و پس از انعقاد و سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط ۱۵۰۰ دور در دقیقه سرم جداسازی شده و تا روز آزمایش در دمای منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگه داری شدند.

۲-۲-تست های سرولوژی خون:

آزمون رزبنگال به عنوان تست غربالگری روی نمونه های سرمی شتر انجام گرفت.به این ترتیب که بر روی پلیت و به روش سریع ، از یک قطره سرم خون شتر (۳۰ میکرو لیتر) و یک قطره آنتی ژن رزبنگال (موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی،۳۰میکرولیتر) مخلوط شده و نتیجه در عرض دو دقیقه خوانده شد و آگلوتیناسیون نمونه ها به صورت نتایج مثبت ثبت

گردید. سپس نمونه های مثبت در تست رزبنگال، به منظور تعیین عیار پادتن ها، توسط روش های رایت (آنتی ژن رایت، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی) مورد بررسی قرار گرفتند به این صورت که ابتدا در ۸ عدد لوله آزمایش رقت های ۱۰:۱ تا ۱۲۸۰:۱ از سرم تهیه شده و پس از افزودن ۰/۵ میلی لیتر از آنتی ژن استاندارد رقیق شده به هرکدام از لوله ها، لوله ها در شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. سپس لوله هایی که شفافیت آنها کامل (کامال شفاف) بودند را معادل آگلوتیناسیون ۱۰۰ درصد درنظر گرفته شد. با توجه به این موضوع که جهت تشخیص سرولوژیک بروسلوز شتر توسط آزمون های آگلوتیناسیون در ایران هیچ گونه عیار سرمی به عنوان مثبت توسط سازمان دامپزشکی ارائه نشده است، لذا میزان عیار و تیتر ۱:۴۰و بالاتر در آزمون رایت که توسط سایر محققین در کشورهای هم جوار و پرورش دهنده شتر به عنوان عیار تشخیصی بیان شده است(۱۴)

۳-۲-تست های مولکولی شیر:

برای استخراج ژنوم جهت آزمایش PCR، از شیر با کیت تخلیص DNA ژنومی (کمپانی geneall، کره جنوبی) طبق پروتکل کیت استخراج شد. کیفیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و غلظت آن در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر با استفاده از نانودراپ (Wilmington, DE, USA) مورد بررسی قرار گرفت. سپس نمونه‌های DNA در دمای منهای ۲۰ درجه سلسیوس تا تجزیه وتحلیل بعدی نگهداری شدند.

٤-۲-تایید مولکولی باکتری های جداسازی شده

شناسایی مولکولی ژنوم بروسلا در شیر، براساس واکنش مولتی پلکس زنجیره‌ای پلی مراز (AMOS-PCR) بر روی تمام DNA استخراج شده از شیر جهت بررسی حضور گونه‌های بروسلا انجام شد. تکثیر AMOS-PCR با استفاده از ۵ آغازگر بر روی ژن IS711 در برنامه حرارتی ۱ چرخه ۹۵ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه دناتوراسیون در ۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، دمای اتصال در ۵۵ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳ دقیقه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۵). تمام واکنش‌های PCR در یک حجم کلی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵۰ میلی‌مول KCl، ۱۰ میلی‌مول Tris–HCl (pH 8)، ۱/۵ میلی‌مول MgCl2، ۰/۲ میلی‌مول از هر نوکلئوتید، ۰/۰۵ واحد بین المللی Taq polymerase و ۰/۵ میلی‌مول از هر آغازگر انجام شد. محصولات تکثیر شده با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز مشاهده شدند.

۳-نتایج:

نتایج اخذ شده از مطالعه حاضر مشخص نمود که از میان ۱۵۱ نمونه سرم خون اخذ شده از شترهای مورد آزمایش، تعداد ۴۲ نمونه (۲۷/۸ درصد) در آزمون رزبنگال مثبت تشخیص داده شد و در مرحله بعد انجام آزمون رایت برروی نمونه های فوق نشان دهنده عیار پادتن های ضد بروسلا در ۹ نمونه با عیار ۱:۸۰ مثبت بود. در بین نمونه ها، ۹ نمونه مثبت درآزمون رزبنگال در آزمون های رایت نیز عیاری ۱:۸۰داشته و مثبت تشخیص داده شد. تعداد ۲ نمونه در تست مولکولی مثبت بود. یافته ها حاکی از تشخیص بروسلا ملیتنسیس بود.

٤-بحث:

بیشتر مطالعات گونه‌های بروسلا ملی‌تنسیس و بروسلا ابورتوس را عامل بروسلوز شتر می‌دانند(۱۰). پژوهش ذوقی و عبادی نیز نشان داد که بروسلا ملی‌تنسیس بایوتیپ ۱ عامل بروسلوز شتر در ایران بوده است(۱۶). المجالی و همکاران نشان دادند که بروسلا ملی‌تنسیس بایوتیپ ۳ عامل سقط در گله‌های شتر در اردن بوده است(۱۷). بررسی‌های اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که بیشتر موارد به علت مشکلات پرورشی، شتر را همراه با گوسفند و بز نگه‌داری می‌کنند و نگهداری شتر با گاو کمتر انجام می‌شود و بیان می‌شود که آلودگی آب و غذای شتر با ترشحات گوسفند و بز از علل آلودگی بیشتر شتر با گونه بروسلا ملی‌تنسیس است(۱۷). در منطقه مورد مطالعه شتر به همراه گوسفند یا بز پرورش داده نمی‌شود و

می‌توان علل وجود عفونت در میان شتران را به شتر راهنما نسبت داد. زیرا شتر یاد شده به منظور راهنما برای شتران وحشی هر روز به کشتارگاه آورده می‌شود و ساعاتی در محل اجتماع حیوانات می‌ماند. بنابراین، ممکن است آلودگی را به گله منتقل کند. انواع گونه‌های شتر به بیماری بروسلوز آلوده می‌شوند به ویژه زمانی که در ارتباط با نشخوارکنندگان کوچک و بزرگ قرار دارند. رفیعی پور و همکاران نشان دادند که میزان آلودگی شتران در شهر بافت بر اساس آزمون رزبنگال و 2-ME به ترتیب ۱۰/۵ و ۷/۹۲ درصد بوده است(۱۸). بروسلوز در شتر شیوعی جهانی دارد و از سال ۱۹۳۱ به بعد در تمام کشورهای نگه دارنده شتر نظیر هندوستان،مغولستان،عربستان سعودی،ایران،عراق،کویت،شوروی سابق،امارات عربی،مصر،مالی،اتیوپی،نیجریه،سودان و کنیا گزارش شده است در تحقیقی انجام شده دو سویه بروسلا یعنی بروسلا ملی‌تنسیس و بروسلا ابورتوس عامل بیماری شناخته شده اند(۱۰, ۱۲-۱۴).پور جعفروهمکاران در سال ۱۳۸۵ میزان آلودگی در شتر های نجف آباد را بر اساس آزرمایش های رزبنگال،رایت و 2ME ۲/۸۶ درصد گزارش کردند. خواجه و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که شترهای استان بوشهر به میزان ۱/۹۳ درصد آنتی بادی ضد بروسلا دارند و موفق شدند بروسلا ملی تنسیس را از غدد لنفاوی منطقه جدا کنند(۱۹).

رشتی باف و همکاران در سال ۱۳۷۸ میزان آلودگی در شتران کشتار شده در کشتارگاه صنعتی مشهد را ۹ درصد بیان کردند.

عالمیان استانهای اصفهان و سمنان را به ترتیب ۴ و ۲ درصد بیان نمودند.همچنین این میزان را بر اساس آزمایش PCR به ترتیب ۱۸ و ۱۱ درصد بر اورد کردند(۱۲).

در سال ۲۰۱۶ در تحقیقی که در ایالت سند پاکستان انجام دادند میزان آلودگی در شتران نر را ۲۶ درصد و شتران ماده را ۱۶ درصد بیان کردند(۲۰). دادار در سال ۲۰۱۸ با استفاده از آزمایش کشت بمنظور جدا سازی بروسلا آبوتوس شیر شتران میزان آلودگی را بررسی کرد و بروسلا ملیتنسیس را در شتر گزارش کرد(۱۳). لذا مطابق نتایج اخذ شده در مطالعه حاضر و سایر مطالعات انجام شده در مناطق مختلف ایران و تایید شیوع عفونت بروسلوز در بین گله های شتر، مشخص می شود که شترها نقش مهمی در اپیدمیولوژی این عفونت ایفاء نموده و بعنوان ناقلینی در انتشار باکتری به انسان از طریق شیر و همچنین سایر فراورده های دامی مطرح هستند.

این مقاله از داده های حاصل از انجام پروژه به شماره مصوب ۰-۸۲-۱۸-۰۱۸-۰۰۰۱۸۵ استخراج شده است.

منابع

1-Dadar M, Shahali Y, Fakhri Y. Brucellosis in Iranian livestock: A meta-epidemiological study. Microbial Pathogenesis. 2021;155:104921.

2-Dadar M, Shahali Y, Fakhri Y, Godfroid J. The global epidemiology of Brucella infections in terrestrial wildlife: A meta-analysis. Transboundary and Emerging Diseases. 2021;68(2):715-29.

3-Doganay M, Aygen B. Human brucellosis: an overview. International journal of infectious diseases. 2003;7(3):173-82.

4-González-Espinoza G, Arce-Gorvel V, Mémet S, Gorvel J-P. Brucella: reservoirs and niches in animals and humans. Pathogens. 2021;10(2):186.

5-Corbel MJ. Brucellosis in humans and animals: World Health Organization; 2006.

6-Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. The Lancet infectious diseases. 2006;6(2):91-9.

7-Abedi A-S, Hashempour-Baltork F, Alizadeh AM, Beikzadeh S, Hosseini H, Bashiry M, et al. The prevalence of Brucella spp. in dairy products in the Middle East region: A systematic review and meta-analysis. Acta tropica. 2020;202:105241.

8-Dadar M, Shahali Y, Fakhri Y. A primary investigation of the relation between the incidence of brucellosis and climatic factors in Iran. Microbial pathogenesis. 2020;139:103858.

9-Solonitsuin M. Brucellosis in camels. Veterinarya, Moscow. 1949;26:16-21.

10-Gwida M, El-Gohary A, Melzer F, Khan I, Rösler U, Neubauer H. Brucellosis in camels. Research in Veterinary Science. 2012;92(3):351-5.
11-Ansari RH, Baghershah H, Moradi S. Effect of age on fiber characteristics of one-humped female camels of semnan province (short article). 2011.
12-Alamian S, Dadar M. Brucella abortus contamination of camel milk in two Iranian regions. Preventive veterinary medicine. 2019;169:104708.
13-Dadar M, Alamian S. Isolation of Brucella melitensis from seronegative camel: potential implications in brucellosis control. Preventive Veterinary Medicine. 2020;185:105194.
14-Azwai S, Carter S, Woldehiwet Z, MacMillan A. Camel Brucellosis: Evaluation of field sera by conventional serological tests and ELISA. Journal of Camel Practice and Research. 2001;8(2):185-93.
15-Ewalt DR, Bricker BJ. Validation of the Abbreviated BrucellaAMOS PCR as a Rapid Screening Method for Differentiation ofBrucella abortus Field Strain Isolates and the Vaccine Strains, 19 and RB51. Journal of clinical microbiology. 2000;38(8):3085-6.
16-Zowghi E, Ebadi A. Brucellosis in camels in Iran. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics). 1988;7(2):383-6.
17-Al-Majali AM, Al-Qudah KM, Al-Tarazi YH, Al-Rawashdeh OF. Risk factors associated with camel brucellosis in Jordan. Tropical Animal Health and Production. 2008;40(3):193-200.
18-Rafieipour A, Ziaei N. Study of brucellosis in serum of camels in southeast of Iran. Veterinary Science Development. 2011;1(1):e14-e.
19-Khadjeh G, Zowghi E, Zarif-Fard M. Incidence of brucellosis in one-humped camels of Boushehr, Iran. Archives of Razi Institute. 1999;50:83-6.
20-Fatima S, Khan I, Nasir A, Younus M, Saqib M, Melzer F, et al. Serological, molecular detection and potential risk factors associated with camel brucellosis in Pakistan. Tropical animal health and production. 2016;48(8):1711-8.