تشخیص آلودگی به سروتیپهای سالمونلا در گوساله‌های به ظاهر سالم با استفاده از آزمایش جلدی

دکتر محمد قلی نادعلیان[1] دکتر تقی زهرائی صالحی[2] دکتر علی رضا فاتح نیا[3]

هدف: تشخیص سالمونلوز با استفاده از آزمایش جلدی.
طرح: مطالعه میدانی.
حیوانات: ۱۱۱ رأس گوساله.
روش: در این تحقیق، سروتیپ بسیار شایع سالمونلا دابلین از دامداریهای اطراف تهران از طریق کشت مدفوع جداسازی شد و از آن آنتی ژن لیپوپلی ساکاریدی (LPS) تهیه گردید. این آنتی ژن به صورت داخل جلدی به ۱۱۶ رأس گوساله به ظاهر سالم تزریق شد. همچنین سرم این گاوها مورد آزمایش آگلوتیناسیون قرار گرفت.
تجزیه و تحلیل آماری: توافق بین تستها و ضریب کاپا.
نتایج: تعداد ۳ رأس گوساله در آزمایش پوستی واکنش مثبت نشان دادند که در آزمایش آگلوتیناسیون (ویدال) نیز مثبت بودند. از محل انجام آزمایش بیوپسی به عمل آمد و از نظر هیستوپاتولوژی نیز واکنش مثبت پوستی، تأیید گردید.
نتیجه گیری: از مزایای آزمایش جلدی این است که باعث تشخیص آلودگی با تعداد زیادی از سروتیپهای سالمونلا می‌شود که کشت، جداسازی و تایپینگ آنها مشکل می‌باشد، به طوری‌که با این تست یعنی تزریق داخل جلدی آنتی ژن سالمونلا دابلین، می‌توان احتمال آلودگی دامها را به سالمونلاهای مختلف مورد ارزیابی قرار داد. در این تحقیق نیز مشخص گردید که گاوهایی که در آزمایش ویدال پاسخ مثبت دارند در آزمایش جلدی نیز واکنش مثبت از خود نشان می‌دهند. *مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)، دوره ۵۷، شماره ۱، ۸۲-۷۹.*

واژه‌های کلیدی: سالمونلوز، گوساله، آزمایش جلدی، سالمونلا دابلین.

Diagnosis of Salmonella infection in apparent healthy calves with using skin test

Nadalian, M.Gh.[1], Zahraei Salehi, T.[2], Fatehnia, A.R.[3]
[1]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran – Iran. [2]Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran – Iran. [3]Graduate from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran – Iran.

Objective: Evaluation of skin test in diagnosis of Salmonella in carrier's calves.
Design: Field study.
Animals: One hundred and eleven calves.
Procedure: One hundred and sixteen sera and faecal samples were obtained from calves in dairy farms around Tehran. The faucal samples were cultured in enrichment and selective media and then isolated salmonella were serotyped by O and H antisera.The sera samples were tested for O and H agglutinins via Widal test. extracted Lipopolysaccharide (LPS) from isolated S. dublin were used for skin test.
Statistical analysis: Measure of agreement,ι cohen's kappa coefficient.
Results: In skin test three calves showed positive reaction from 116 cases. The reaction confirmed by histopathological findings. Also serological test of these calves were positive.
Conclusion: From the results of this study it seems that skin test is suitable test for diagnosis of salmonella carrier's calves. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 1: 79-82, 2002.***
Key words: Salmonellosis, Skin test, Calves, Salmonella dublin.

سالمونلوز از مهمترین بیماریهای مشترک می‌باشد که به وفور در انسان و حیوانات دیده می‌شود و در تمام کشورها از اهمیت خاصی برخوردار است و خسارات هنگفتی بر اقتصاد بسیاری از کشورها وارد می‌نماید. سالمونلاها در بدن میزبان باعث بروز اشکال مختلفی از بیماری از جمله عفونتهای غیر آشکار، حاملین بهبود یافته، انتریت، سپتی سمی و ... می‌گردند (۸). حاملین سالمونلاها منبع و مخزن مهمی می‌باشند و در انتشار سالمونلا در محیط دامداری نقش زیادی دارند. شناسایی این حاملین در سطح دامداریها نقش مهم و بسزایی در کنترل و پیشگیری از وقوع موارد جدید دارد. تاکنون محققین زیادی در زمینه تشخیص حاملین سالمونلا با استفاد از آزمایش جلدی و ارزیابی واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری ایجاد شده، مطالعه نموده‌اند.

Robertson و همکاران با استفاده از تزریق جلدی عصاره خام سالمونلا تیفی موریوم، تورمی در ناحیه تزریق تا دو برابر ضخامت را مشخص کردند (۱۰،۱۱). Richardson با استفاده از آزمایش جلدی حاملین سالمونلا دابلین را مشخص نمود (۹). Aitken آزمایش جلدی را برای تشخیص حاملین با استفاده از آنتی‌ژن ریبوزومال مورد ارزیابی قرار داد (۲).

مواد و روش کار

در ابتدا برای مشخص نمودن سروتیپ متداول سالمونلا و تهیه آنتی‌ژن، از ۱۰۰ رأس گوساله از گاوداریهای اطراف تهران، نمونه‌برداری مدفوع و خون صورت گرفت و پس از جداسازی برای تعیین گروه و سروتیپ آن از آنتی سرمهای تجارتی A-I، گروه D و گروه B و همچنین آنتی سرمهای ضد تاژکی Poly E, G Complex و آنتی سرم ضد i استفاده شد.

برای تهیه LPS خالص سالمونلا دابلین پس از جداسازی باکتری سالمونلا از گاوداریهای اطراف تهران، یک نمونه بعد از تعیین گروه و نهایتا سروتیپ به عنوان نمونه مرجع انتخاب شد و از آن برای تهیه LPS استفاده گردید. بدین منظور برای افزایش حجم مقدار باکتری از سویه مورد نظر بر روی محیط مغذی در حجم زیاد برده شد (۴ ارلن ۰/۵ لیتری). بعد از دو شب گرمخانه‌گذاری در انکوباتور شیکردار، سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت تا باکتری رشد کرده رسوب پیدا کند. باکتری رسوب یافته در ۴۰ میلی لیتر آب مقطر کاملا حل شد و به صورت سوسپانسیون در آمد. سپس از استن که در ^{c}۲۰- قرار داده شده بود، به میزان ۳۶۰ میلی‌لیتر روی این سوسپانسیون ریخته شد و این مخلوط نیز ۶۰ دقیقه در ^{c}۲۰- قرار داده شد. بعد از این مدت مخلوط را از روی کاغذ صافی عبور داده تا باکتری مورد نظر روی کاغذ صافی باقی بماند. بعد از هر مرحله از محصول مورد نظر لام گرفته می‌شد تا وضعیت باکتری و

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

شکل آن تحت نظر باشد. باکتری خشک شده روی کاغذ کاملا تراشیده شد و به شکل پودر در آمد و به نسبت ۶ درصد وزن به حجم در آب مقطر حل گردید و در 65^{c} در بن ماری قرار داده شد. سپس فنل با غلظت نهایی ۹۰ درصد (۴۵ گرم فنل در ۵۵ میلی‌لیتر آب مقطر) در دمای 65^{c} به این مخلوط اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در همین دما قرار گرفت. سپس مخلوط روی یخ در جایخی یخچال قرار گرفت (مدت ۳۰ دقیقه) مخلوط فوق در سانتریفوژ با دور ۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 20^{c}- قرار داده شد که دو فاز آبی (رو) و فاز فنلی (زیر) تشکیل شد. فاز آبی حاوی LPS است. از این فاز گسترش تهیه گردید و در آن هیچ‌گونه باکتری سالمی مشاهده نشد. ضمنا از ماده حاصله روی محیط مغذی کشت داده شد که هیچ‌گونه باکتری رشد نکرد. این محلول تا زمان انجام آزمایش جلدی در یخچال قرار داده شد (۱۳، ۶، ۲).

برای انجام تست جلدی در گاوداریها، ابتدا گوساله‌های بین ۲ تا ۱۵ ماه انتخاب شدند. قبل از انجام تست دمای بدن گوساله‌ها اندازه گرفته شد. بعد از مهار گوساله‌ها، ضخامت پوست ناحیه گردن در محل تزریق که در $\frac{1}{3}$ میانی گردن بود، توسط کولیس اندازه گیری شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از آنتی‌ژن تهیه شده به صورت داخل جلدی با سرنگ تمام اتوماتیک تزریق گردید. صحت تزریق به صورت یک برآمدگی عدس مانند در محل تزریق نمایان بود. در گوساله‌های تزریق شده، نشانه‌ها و دمای بدن هر ۶ ساعت یکبار تحت کنترل قرار می‌گرفت. در ساعتهای ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ بعد از تزریق ضخامت پوست در محل تزریق توسط کولیس اندازه‌گیری و ثبت شد. در حین انجام تست جلدی نمونه‌گیری از مدفوع و خون برای مقایسه گرفته می‌شد.

در مواردی که نتایج تست جلدی مثبت بود از پوست متورم شده ناحیه جهت آزمایش هیستوپاتولوژی، بیوپسی به عمل آمد. پوست برداشت شده در فرمالین ۱۰ درصد بر روی یک قطعه پلاستیکی به صورت کاملا کشیده قرار داده شد. سپس از آن مقطع هیستوپاتولوژی تهیه شد تا واکنش ازیاد حساسیت تأخیری در آن بررسی شود.

نتایج

از ۱۰۰ نمونه کشت داده شده، ۶ نمونه سالمونلا جدا گردید که بعد از سر و تایپینگ ۲ مورد سالمونلا دابلین و ۴ مورد سالمونلا تیفی موریوم تشخیص داده شدند. برای تهیه آنتی‌ژن LPS از نمونه ۱۱۹۵۰ سالمونلا دابلین، استفاده گردید.

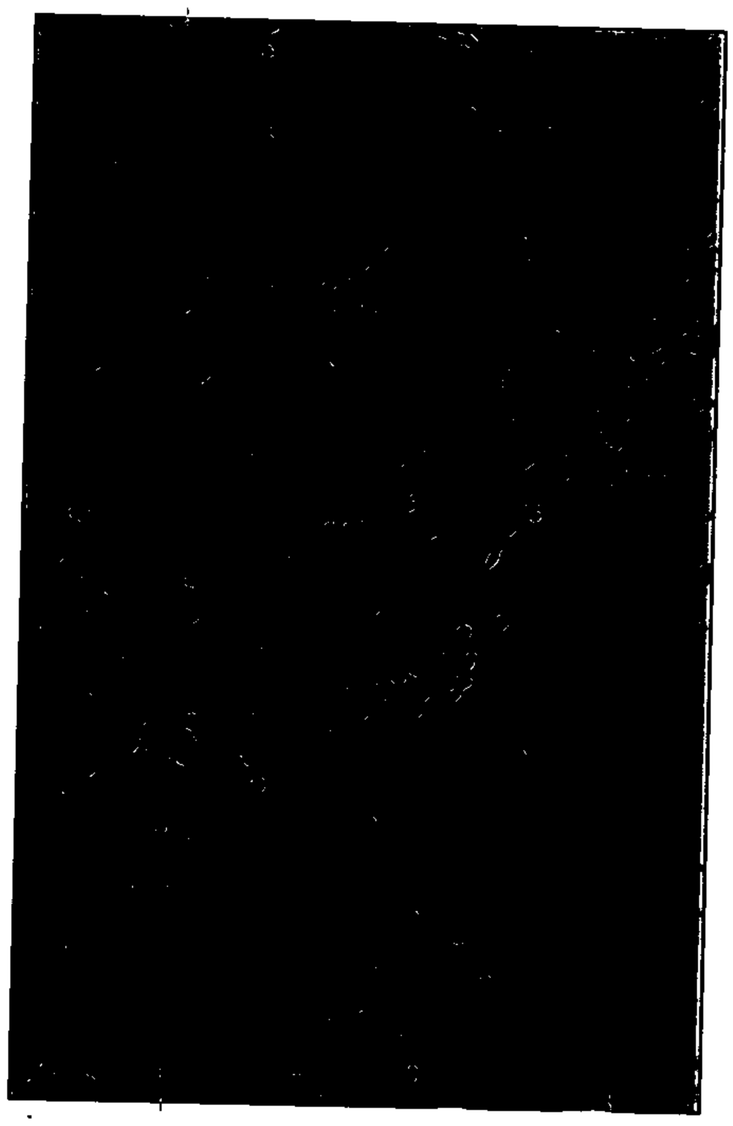
ضخامت پوست ناحیه به صورت دوبل قبل از تزریق ۶ میلیمتر و دمای بدن دامها قبل از انجام تست جلدی ۳۹ درجه بود. بعد از انجام آزمایش جلدی، تعدادی از گوساله‌ها نشانه‌های اندوتوکسمی، تب، آبریزش از بینی و دهان، تورم و قرمزی ملتحمه چشم و خونریزی پوزه را داشتند. زمینگیری در چند تا از گوساله‌ها اتفاق افتاد. دمای بدن دامها از ۴۰/۵ تا ۴۱ درجه سانتیگراد متغیر بود. ۶ ساعت بعد از تزریق ضخامت پوست محل دوباره اندازه‌گیری شد که همه دامها یک تورم اولیه غیر اختصاصی را در محل تزریق داشتند. ۳ مورد از دامهای تست شده در ۲۴ ساعت بعد از تزریق، تورم سخت و قابل توجهی در ملامسه داشتند و با اندازه‌گیری با کولیس این ضخامت به بیش از ۲ برابر رسیده بود (جدول ۱).

۴۸ ساعت بعد از تزریق همچنان افزایش ضخامت وجود داشت. دمای بدن دامها در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق در حد طبیعی بود. پوست متورم در محل تزریق بعد از بیوپسی و تهیه لام هیستوپاتولوژیک، واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری را نشان داد

جدول ۱- مقایسه دما و ضخامت پوست قبل و بعد از تزریق LPS در گوساله‌های با آزمایش جلدی مثبت، سال ۱۳۸۰ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

شماره گوساله	دمای قبل از تزریق ^{c}	دمای بعد از تزریق در ساعت ۶ ^{c}	ضخامت پوست قبل از تزریق برحسب میلیمتر	ضخامت پوست ۲۴ ساعت بعد از تزریق برحسب میلیمتر
۴۰۷	۳۹/۲	۴۱	۵	۱۶
۴۱۳	۳۹	۴۰/۵	۶	۱۴
۴۱۸	۳۸/۹	۴۰	۵	۱۳

تصویر ۱- مقطع هیستوپاتولوژیک پوست محل تزریق سالمونلا دابلین در گوساله که دارای واکنش مثبت جلدی را نشان می‌دهد. ارتشاح سلولهای تک هسته‌ای معرف واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری است. سال ۱۳۸۰، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.



تصویر ۲- در مقطع بافتی تهیه شده از ناحیهٔ درم تجمع آستینی وار سلولهای تک هسته‌ای در اطراف یک ورید دیده می‌شود که از ویژگیهای واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری می‌باشد. سال ۱۳۸۰، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

جدول ۲- نتایج آزمایش آگلوتیناسیون گوساله‌هایی که در آزمایش جلدی مثبت بودند، سال ۱۳۸۰ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

شماره / عیار	عیار ویدال O	عیار ویدال H
۴۰۷	$\frac{۱}{۱۶۰}$	$\frac{۱}{۳۲۰}$
۴۱۳	$\frac{۱}{۴۰}$	$\frac{۱}{۱۶۰}$
۴۱۸	$\frac{۱}{۱۶۰}$	$\frac{۱}{۱۶۰}$

جدول ۳- فراوانی نمونه‌های آزمایش آگلوتیناسیون و آزمایش جلدی در گوساله‌های مورد مطالعه، سال ۱۳۸۰ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

تست جلدی / سرولوژی	+	-	جمع
+	۳[a]	۰[b]	۳
-	۰[c]	۱۱۳[d]	۱۱۳
جمع	۳	۱۱۳	۱۱۶

(تصویر ۱). در لام اینفیلتراسیون سلولهای تک هسته‌ای به صورت آستینی وار همراه با ترومبوواسکولیت دیده شد (تصویر ۲).

نتایج کشت مدفوع در هیچ کدام از دامهای فوق حتی بعد از ۴ بار کشت، مثبت نشد. اما از نظر سرولوژی فقط دامهایی که تست جلدی شان مثبت بود، عیار پادتنی نشان دادند (جدول ۲).

برای مقایسه نتایج بین دو آزمایش جلدی و سرولوژی از روش آماری بین تستها استفاده شد که در واقع این روش معرف اعتبار آنهاست (جدول ۳).

$\frac{a+b}{n}$ = نسبت توافق مشاهده شده (OP). که در این تست ۱ به دست آمد. نسبت توافق مورد انتظار به وسیله شانس Expected proportion agreement by chance (EP) از رابطه زیر به دست می‌آید: $EP=\{(\frac{a+b}{n})\times(\frac{a+b}{n})\}+\{(\frac{a+b}{n})\times(\frac{a+b}{n})\}$ (نسبت توافق مورد انتظار به وسیله شانس) که مقدار آن ۹۴۹۳۰۱ درصد به دست آمد. ضریب کاپا که نشان دهنده توافق بین تستها ست، از رابطه زیر محاسبه شد: $Kappa=\frac{(OP-EP)}{(1-EP)}$ که در این تست ۱ به دست آمد.

مقدار ضریب کاپا بین صفر و یک می‌باشد. ضریب کاپای صفر نشان از توافق به وسیله شانس لذا ضریب کاپا، یک نشان از توافق کامل بین دو تست است. ضریب کاپای منفی نشان از توافق مورد انتظار کمتر از شانس می‌باشد (۱۲).

بحث

Robertson در سال ۱۹۸۲ با تزریق داخل جلدی عصاره خام سیویه SVA44 سالمونلا دابلین، ضخامت دو برابر را در محل تزریق حاملین مشاهده نمود. آزمایش هیستوپاتولوژیک هم نشان از تأیید واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری بود (۱۱، ۱۰).

Aitken در سال ۱۹۷۸ از آزمایش جلدی برای تشخیص عفونت سالمونلا دابلین استفاده نمود و نتیجه گرفت که تست جلدی یک راه آسان در تشخیص حیواناتی که قبلا درگیر شده‌اند می‌باشد. او نشان داد که تکرار تست می‌تواند نتایج اشتباهی به همراه داشته باشد. Richardson در سال ۱۹۷۵ تست جلدی را در تشخیص عفونت نهفته سالمونلا دابلین به کار برد. او نشان داد که آگلوتیناسیون لوله‌ای یک راه تشخیص سریع حاملین عفونت نیست. نامبرده نشان داد که تشخیص حاملین با این روش در صورتی عملی است که امکان تهیه آنتی ژنی مناسب و استاندارد با قابلیت بالا وجود داشته باشد ولی این آنتی ژن اثری در افزایش تیتر آنتی‌بادی بدن ندارد (۳).

زهرائی در سال ۱۳۷۶ از روش تست جلدی در تشخیص سالمونلوز تجربی در خرگوش استفاده نمود. براساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، افزایش ضخامت به میزان دو برابر در عرض ۴۸ ساعت نشان از آلودگی و عفونت است. نامبرده با آزمایش هیستوپاتولوژی نیز واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری را مورد تأیید قرار داد. آنتی ژن مورد استفاده عصاره باکتریایی خام سونیکه شده بود (۱,۱۴).

به دنبال تحقیقات فوق، در این تحقیق نیز تست جلدی به منظور تشخیص حاملین سالمونلا دابلین در گله گاوان اطراف تهران به کار گرفته شد. از میان ۱۱۶ مورد، تنها ۲/۵ درصد از گوساله‌ها نتیجه مثبت در تست جلدی داشتند. از کشت مدفوع این دامها به فاصله چند هفته سالمونلا جدا نگردید. البته با وجود منفی بودن کشت نمی‌توان حامل بودن دامهای فوق را رد نمود. در بسیاری از مقالات اشاره شده است با اینکه در بدن برخی از حاملین، باکتری حضور دارد ولی آن را از مدفوع دفع نمی‌کنند و بسیاری از محققان این مسئله را با آزمایشهای مختلف در مورد حاملین به اثبات رسانده‌اند. نتایج سرمی ویدال O و H این دامها نشان از وجود تیتر پادتنی در سرم آنها بعد از بهبودی است که نشان می‌دهد این دامها در گذشته مبتلا به سالمونلوز بوده‌اند و با سالمونلا تماس داشته‌اند. در این تحقیق آنتی‌ژن مورد استفاده LPS بود. به علت وجود لیپید A در تعدادی از دامها نشانه‌های آندوتوکسمی دیده شد. لیپید A در همه باکتریهای گرم منفی مشابه است ولی در واقع پاسخ اصلی ایمنی سلولی به قسمت پلی ساکاریدی O است. در مطالعه تجربی این ماده به تنهایی نتوانسته است باعث ایجاد واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری شود. کمپلکس این ماده با ۱، ۲، ۳ و ۴ دی اپوکسی بوتان ساختار متراکمی را می‌دهد که قادر به ایجاد واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری در جلد می‌باشد. در واقع در بدن نیز زمانی که عفونت سالمونلایی اتفاق می‌افتد، LPS از سلول باکتری آزاد شده و به علت خاصیت هیدروفوبیک لیپید A، LPS قادر به چسبیدن به غشأ و ورود به آن است. در واقع لیپید A باعث چسبندگی آنتی‌ژن O به سلول میزبان شده و در این حالت سلولهای ایمنی قادر به شناسایی این سلولها و ایجاد پاسخ ایمنی وابسته سلولی هستند. لذا وجود لیپید A برای بروز واکنش ضروری به نظر می‌رسد ولی عوارض آن می‌تواند مشکل آفرین باشد که برای پرهیز از این مسئله بایستی میزان تزریق خیلی کم باشد. با توجه به تجربیات انجام گرفته توسط زهرائی در خرگوش در عفونت تجربی، تزریق عصاره کل باکتریایی که حاوی لیپید A است، مشکلی ایجاد نمی‌کند. عوارض ایجاد شده در این تحقیق می‌تواند از طرفی به علت تخلیص آنتی‌ژن و در نتیجه غلظت بالای لیپید A و از طرفی به علت میزان تزریق بالا باشد که در مطالعات بعدی با کاهش میزان تزریق می‌توان از عوارض احتمالی جلوگیری کرد (۷، ۴). آنتی‌ژن LPS در واقع آنتی‌ژن اختصاصی برای تشخیص سروتیپهای خاص سالمونلا نیست. چون در مواردی می‌توان واکنشهای متقاطع اتفاق افتد. مثلا آنتی‌ژن O مشترک بین سالمونلا تیفی موریوم و دابلین باعث واکنش جلدی در هر دو با تزریق آنتی ژن هر کدام می‌شود که از این جهت می‌توان آن را مزیتی برای آزمایش جلدی محسوب کرد (۹، ۵).

تورم اولیه ۶ ساعت بعد از تزریق نشان از یک واکنش ایمنی غیر اختصاصی به علت مواد سمی از جمله لیپید A است (۱۰).

با توجه به تحقیق فوق می‌توان گفت تست جلدی روشی مؤثر در تشخیص حاملین سالمونلا ۵-۲ هفته بعد از عفونت با سالمونلا می‌باشد، البته تهیه آنتی‌ژن کم خطرتر مثل کمپلکس پلی ساکارید O برای انجام آزمایش ارجح است تا بتوان به طور عملی این تست را

در گاوداریها در تشخیص حاملین که مشکل بزرگ انتشار سالمونلا در سطح گله‌اند، به کار برد. ماده ۱، ۲، ۳ و ۴ دی اپوکسی بوتان در ایجاد این کمپلکس مورد نیاز است تا عوارض و خطرات را به حداقل برساند.

از مزایای آزمایش جلدی این است که اساس این آزمایش واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری است که عمدتا واکنشی است غیر اختصاصی و باعث تشخیص آلودگی با تعداد زیادی از سروتیپهای سالمونلا می‌شود که کشت و جداسازی و تایپنگ آنها مشکل می‌باشد. بدین معنی که می‌توان با تزریق پادگن سالمونلا دابلین به گاو احتمال آلودگی گاو را به سایر سالمونلاهای هر گروه و حتی سایر گروهها مثل سروتیپ تیفی موریوم از گروه B تشخیص داد.

تشکر و قدردانی

هزینه این تحقیق از طریق طرح مصوب دانشگاه تهران به شماره ۲۱۵/۱/۵۱۷ پرداخت شده است که بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه و همچنین معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از جناب آقای دکتر مرجانمهر و جناب آقای دکتر امیدی که در تهیه مقاطع هیستوپاتولوژی و انجام آزمایش جلدی ما را یاری نمودند تشکر می‌شود.

References

۱. زهرائی صالحی، ت. سالمونلا، (۱۳۷۸): صفحه: ۱، ۷، ۳۷-۲۳، ۷۹-۷۶، ۱۳۰-۱۰۱و ۲۰۷-۱۹۱.

۲. زهرائی صالحی، ت. (۱۳۷۱): آندوتوکسین باکتریهای گرم منفی، شماره ۳۷، صفحه: ۱۳، انتشارات تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

3. Aitken, M.M., Hall, G.A., and Jones, P.W. (1978): Investigation of a cutaneous delayed hypersensivity response as a mean of detecting Salmonella dublin infection in cattle, Res. Vet. Sci. 24: 370-374.
4. Chaturvedi, G.I. and Sharma, V.K. (1981): Cellular and humoral immune response in calves experimentally infected with S. Dublin. Zentrall. Bakteriol. Parasitenked. Infection. Skr. Hyg. Abt. Reihe. A. 246: 494-503.
5. Champlin, R., and Hunter, R.L. (1975): Studies of the compositional adjuant which selectively enhance delayed hypersensitivity to lipid conjugated protein antigen. J. Immun. 114: 76-80.
6. Lindberg, A.I.F. and Holm, T. (1972): Evaluation of some extraction method for the preparation of bacterial lipopolysaccharide for structural analysis. Microbiol. 80: 751-756.
7. Merrit, F.F., Smith, B.P., Guerra, M.R., Habasha, F., Johnson, E. (1984): Relationship of cutaneous delayed hypersensivity to protection from challenge exposure with salmonella typhimurium in calves. American Journal of Vet. Res. 45: 1081-1085.
8. Nadalian, M.Gh. and Bolourchi, M. (1998): Different clinical aspect of salmonellosis in calves. XX World Buiatric congress. Sydney, Australia, PP: 897-898
9. Richardson, A., Park, J.A.C. (1978): A skin test to identify latent Salmonella dublin infection in calves. Vet. Record. 45: 60-76.
10. Robertson, J.A. (1982): Salmonella typhimurium in calves: Delayed specific skin reaction directed against the O antigenic polysaccharide chain. Inf. Immun. 37: 137-148.
11. Robertson, J.A., Svenson, S.B. and Renstrom, L.H.M. (1982): Delayed hypersensivity skin test for dectection of immune responses against Salmonella in cattle. Res. Vet. Sci. 32: 225-230.
12. Thrusfield, M. (1995): Veterinary Epidemiology. 2nd edition, Blackwell. Science, PP: 280-282.
13. Wray, C., Wray, F.A. (2000): Salmonella in Domestic Animals. PP: 57-66, 75-77, 169-184. 205-278, 355-367, 402 and 408-421.
14. Zahrai Salehi, T., Rabbani, M. and Mahzoniea, M.R. (1997): A skin test for diagnosis of Salmonellosis. XV. International symposium (W.A.V.M.I) on Salmonellosis and Brucellosis. Feb. 16-21. Cyprus. P:2.