

Atık Yapmış Koyunlarda Brusellozis'in Teşhisinde ELISA ile Diğer Serolojik Testlerin Karşılaştırılması*

Hasan ÖNGÖR, Adile MUZ, Burhan ÇETİNKAYA

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 23119, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 06.09.1999

Özet : Bu çalışmada, atık yapmış koyunlarda *Brucella melitensis*'e karşı oluşan antikorlar, enzyim-linked immunosorbent assay (ELISA), serum aglutinasyon test (SAT), 2-merkaptotanol mikroaglutinasyon test (2-ME-MAT), dithiothreitol mikroaglutinasyon test (DTT-MAT), rose bengal plate test (RBPT), komplement fiksasyon (CFT) testi ile saptandı. Çalışmada kullanılan testlerin sensitivite (Se) ve spesifite (Sp)'leri (CFT referans test kabul edilerek) hesaplandı. Ayrıca ELISA ve diğer testler arasındaki uyumu ölçmek için Kappa değeri kullanıldı.

ELISA'da *B. melitensis* 16M suşundan hazırlanan sonikasyon antijeni, peroksidaz ile işaretli anti-koyun IgG konjugatı ve ortho-fenilendiamin substratı kullanıldı.

Elazığ ve çevresinde atık yapmış 36 koyun sürüsünden elde edilen toplam 500 adet kan serumunda ELISA ile 103(%20,6), RBPT ile 55 (%11), SAT ile 84(%16,8), CFT ile 89(%17,8), 2-ME-MAT ile 79(%15,8) ve DTT-MAT ile 81 (%16,2) örnekte pozitiflik saptandı. Bu değerler karşılaştırıldığında; ELISA ile CFT, SAT, 2-ME-MAT ve DTT-MAT arasında istatistiksel bir farklılığın olmadığı ($p>0,05$), fakat ELISA ile RBPT sonuçları arasında önemli ölçüde bir farklılık olduğu belirlendi ($p<0,001$). ELISA testinin CFT, DTT-MAT, 2-ME-MAT ve SAT ile karşılaştırılması neticesinde; kappa değerlerinin sırasıyla %88, %84, %83 ve %85 (yüksek bir uyum), fakat RBPT ile karşılaştırıldığında kappa değerinin %64, (orta derecede bir uyum) olduğu saptandı. Ayrıca ELISA testinin sensitivitesinin %97 ve spesifitesinin %96 olduğu saptandı.

Anahtar Sözcükler : Brusellozis, ELISA, Serolojik Testler, Koyun, *Brucella melitensis*

Comparison of ELISA with Other Serological Tests in the Diagnosis of Ovine Brucellosis

Abstract : In this study, antibodies against *Brucella melitensis* in aborted sheep were investigated with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), standard tube agglutination test (SAT), rose bengal plate test (RBPT), complement fixation test (CFT), 2-mercaptoethanol microagglutination test (2-ME-MAT) and dithiothreitol microagglutination test (DTT-MAT). The sensitivity and specificity of the tests were calculated by using CFT results as the gold standard. A Kappa value was used to measure the agreements between ELISA and the other tests.

Sonicated antigen prepared from *Brucella melitensis* 16M strain, the peroxidase labelled anti-sheep IgG conjugate and ortho-phenylenediamine substrate were used in ELISA.

A total of 500 blood samples collected from 36 sheep flocks in Elazığ and environs were examined. One hundred and three (20.6%) samples in ELISA, 55 (11%) in RBPT, 84 (16.8%) in SAT, 89 (17.8%) in CFT, 79 (15.8%) in 2-ME-MAT and 81 (16.2%) in DTT-MAT were found to be brucella-positive. In the comparison of these tests, a significant difference was detected between ELISA and RBPT results ($p<0.001$), whereas the differences between ELISA and other tests were not statistically significant ($p>0.05$). Excellent agreement was detected between ELISA and CFT, DTT-MAT, 2-ME-MAT and SAT results, with kappa values of 88%, 84%, 83% and 85%, respectively. However, in the comparison of ELISA with RBPT, a kappa value of 64% (fair agreement) was obtained. In addition, the sensitivity and specificity of ELISA were determined to be 97% and 96%, respectively.

Key Words : Brucellosis, ELISA, Serological Tests, Sheep, *Brucella melitensis*

(*) Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1308) tarafından desteklenmiştir.

Giriş

Brusellozis, brusella grubu mikroorganizmaların sebep olduğu sığır, koyun, keçi, domuz ve koç gibi hayvanlarda, özellikle, testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olan kronik, bulaşıcı ve nekrotik yangısal enfeksiyonlarla ortaya çıkan zoonoz bir hastalıktır (1).

Türkiye'de bugüne kadar koyun ve keçilerde görülen bakteriyel orijinli yavru atmaların başında brusellozis gelmektedir (2-4). Ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda brusellozis'in prevalansının %0,06 ile %22 arasında değiştiği bildirilmiştir (4,5). Hastalık enfekte hayvanların çoğunlukla süt ve süt ürünleri ile insanlara bulaşabildiği için, halk sağlığı açısından da büyük önem taşımaktadır (1,6). Enfeksiyonun teşhisinde, etkenin izolasyonu ve identifikasyonu önemli olmasına karşın, etken izolasyonunun zaman alıcı, zor oluşu ve hastalığın sınıf III patojeni olması (1), indirekt yöntemlerin (serolojik ve allerjik testler) daha fazla kullanılmasına yol açmıştır.

Bu çalışmada, koyunlarda *B. melitensis* enfeksiyonlarının tanısında ELISA'nın kullanılabilirliğini ve diğer konvansiyonel testlerle karşılaştırmasını yaparak duyarlılık derecesini belirlemek amaçlandı.

Materyal ve Metot

Materyal

Elazığ merkez ve ilçeleri ile Tunceli Çemişgezek ilçesinden atık yapmış 36 koyun sürüsünden toplam 500 adet kan örneği alındı.

Negatif ve Pozitif Kontrol Serumlar

Negatif kontrol olarak atık bildirilmemiş bir sürüden alınan ve serum aglutinasyon testi (SAT), komplement fiksasyon testi (CFT), rose bengal plate testi (RBPT), 2-merkaptotanol mikroaglutinasyon testi (2-ME-MAT), ve dithiothreitol mikroaglutinasyon testi (DTT-MAT) ile negatif olan 7 koyun kan serumu kullanıldı. Pozitif kontrol olarak Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan SAT testi ile 1/640'da (++) aglutinasyon veren koyun kan serumu kullanıldı.

Antijenler

RBPT, SAT, CFT, 2-ME-MAT ve DTT-MAT antijenleri Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. ELISA antijeni, sonikasyona maruz bırakılan *B. melitensis* 16 M süşundan hazırlandı.

Metot

Brusellozis'in serolojik teşhisi için, RBPT, CFT, SAT, 2-ME-MAT, DTT-MAT ve ELISA testleri yapıldı.

RBPT, SAT ve CFT testleri Alton et al., (1) bildirdikleri yöntemlere göre yapıldı.

2-ME-MAT ve DTT-MAT testleri Brown et al., (7), bildirdikleri yöntem modifiye edilerek uygulandı. Her iki testte de antijen olarak hematoxyline (8,9) ile boyanmış *B. abortus* S 99 süşu kullanıldı. Serumun 0,1M 2-merkaptotanol içeren phosfate buffer salin'de (PBS) 1/5'ten başlayarak iki katlı sulandırması yapılarak mikropleytin kuyucuklarına 50 µl konuldu. Bunun üzerine boyalı antijenden 50 µl konuldu. Mikropleytlerin üzeri şeffaf bantla kapatıldıktan sonra 37 °C' de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda sonuçlar gözle ve ayna sistemi ile okunarak değerlendirildi. Düşme tarzında çöküntüler negatif ve dantele benzeri çöküntüler pozitif kabul edildi.

DTT-MAT yukarıda açıklandığı gibi yapıldı ve değerlendirildi. Ancak, serum örneklerini sulandırmak için 0,005 M Dithiothreitol içeren PBS kullanıldı. Antijen ilavesi ile her kuyucukta DTT'nin final konstrasyonu 0,0025 M oldu (10,11).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA testi Jimenez de Bagües et al., (9), yöntemine göre bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı. Antijen 1/200 oranında 0,05 M karbonat-bikarbonat tampon'da (pH 9,6) sulandırılarak, 100 µl miktarında pleytin bütün kuyucuklarına konulup +4 °C' de 18 saat tutuldu. Bu süre sonunda pleytler 3 kez PBS-Tween 20 (0,01 M PBS pH:7,2, %0,05 ml Tween-20) ile yıkandı ve hafifçe vurularak kurutuldu. Antijen yapışmayan polystyren yüzeylerin nötralizasyonu (Blocking step) için normal at serumunun kaplama tamponundaki %20'lik dilüsyonundan 200 µl konularak 37 °C' de 2 saat tutuldu (12,13). Bu süre sonunda yukarıdaki yıkama işlemi tekrarlandı. Pozitif ve negatif serumların % 10'luk at serumu içeren PBS-T ile 1/10 sulandırmaları yapıldı ve mikropleytin A sırasının ilk on kuyucuğuna test serumların 1/10 sulandırımından 200 µl konuldu. A sırası hariç diğer kuyucuklara 100 µl PBS-T konulup 12 kanallı pipetle yukarıdan aşağıya doğru 100 µl aktararak çift katlı dilüsyonlar elde edildi ve H sırasından 100 µl kısım atıldı. A sırasının 11. kolonuna yukarıdan aşağıya doğru 1/10'dan 1/1280'e kadar sulandırılan brusella pozitif serum, 12. kolonuna ise negatif 7 farklı serumun 1/10 dilüsyonlarından 100 µl konuldu. H 12 blank olarak kullanılıp serum

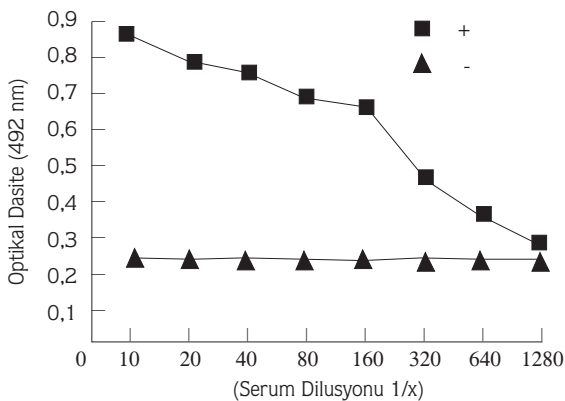
sulandırmasında kullandığımız tampondan 100 µl konulup 37 °C' de 2 saat tutuldu. Bu süre sonunda yıkama işlemi tekrarlandı. 1/6000 oranında sulandırılan peroxidase ile işaretli donkey anti-sheep IgG (Whole Molecule, SIGMA) bütün kuyucuklara 100 µl konulup 37 °C' de 2 saat tutuldu. Bu süre sonunda 6 kez yıkama işlemi yapıldı ve 100 µl substrat (40 mg o-phenylenediamine dihydrochloride+100 ml 0,05 M fosfat-sitrat tampon (pH:5) + 40 µl %30 H₂O₂) bütün kuyucuklara konulup pleyt 15 dakika karanlık bir yerde tutuldu. Reaksiyonu durdurmak için 50 µl 3 M H₂SO₄ konuldu ve oluşan rengin adsorbans değerleri Organon Teknika Micro ELISA System Model 330 Stripreader ile 492 nm'de kör deneye karşı okundu.

Eşik Değerinin Hesaplanması

Her pleyttteki 7 negatif kontrolün ortalamasına (± 2 SD) (14,15) eklenerek elde edilen optik dansite (OD) eşik değeri olarak hesaplandı. Negatif kontrol serumların 1/10 dilüsyonda ortalama optik dansitesi ve pozitif kontrol serumun 1/10-1/1280 sulandırmalarındaki optik dansiteleri Şekil 1'de gösterilmiştir.

İstatistiksel Analizler

Çalışmada kullanılan testlerin sensitivite (Se) ve spesifiteleri (Sp) komplement fikzasyon testi referans test kabul edilerek (16) hesaplandı. ELISA ile diğer testlerden elde edilen sonuçların karşılaştırılmasında Yates corrected χ^2 testi kullanıldı. Bu işlemler Epi-Info 6 adlı istatistiksel programda yapıldı (17). ELISA ve diğer testler arasındaki uyumun hesaplanmasında Kappa istatistiği kullanıldı. Bu metot ile %75 ve daha yukarı değerlerde alınan sonuçlar yüksek derecede uyumu, %40-74 arasında orta derecede



Şekil 1. Negatif (n:7) Kontrol Serumlarının 1/10'lük Dilüsyonundaki Ortalama Optik Dansitesi ve Pozitif Kontrol Serumun Çeşitli Dilüsyonlarında Optik Dansiteleri.

uyumu %40 ve aşağı değerler zayıf uyumu gösterir (18).

Bulgular

Araştırmada kullanılan 500 adet koyun kan serumunun serolojik testlerle incelenmesi sonucu, RBPT'de %11 (55/500), SAT'da %16,8 (84/500), CFT'da %17,8 (89/500), 2-ME-MAT'da %15,8 (79/500), DTT-MAT'da %16,2 (81/500) ve ELISA'da %20,6 (103/500) oranlarında pozitiflik saptandı. ELISA ile diğer testlerden elde edilen seropozitiflik oranları mukayese edildiğinde, sadece ELISA ile RBPT arasında elde edilen farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0,001$) (Tablo 2).

Çalışmada CFT referans test olarak değerlendirildiğinde, kullanılan testlerden ELISA'nın %97 ile en yüksek, RBPT'ninde %61 ile en düşük sensitiviteye sahip olduğu belirlendi. Diğer taraftan bütün testlerin spesifitelerinin oldukça yüksek olduğu görüldü (Tablo 1).

ELISA ile diğer testlerin sonuçları arasında pozitiflik ve negatiflik uyum yönünden bir karşılaştırma yapıldığında, kappa değerlerinin ELISA ile CFT, DTT-MAT, 2-ME-MAT ve SAT için sırasıyla %88, %84, %83 ve %85 (yüksek bir uyum), fakat RBPT ile karşılaştırıldığında kappa değerinin %64, (orta derecede bir uyum) olduğu saptandı.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma, Elazığ ve çevresinde atık yapmış koyun sürülerinde brusellozis'in prevalansını belirlemek ve koyun kan serumlarından brusellanın teşhisinde ELISA testinin diğer rutin testlerle mukayeselerini yapmak amacıyla gerçekleştirildi. Atık yapmış koyun sürülerinden elde edilen toplam 500 adet kan serumunda ELISA ile %20,6, CFT ile %17,8, SAT ile %16,8, DTT-MAT ile

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Serolojik Testlerin Sensitivitesi ve Spesifitesi (CFT referans test).

Testler	Sensitivite(%)	Spesifite(%)
RBPT	61	100
SAT	93	99
2-ME-MAT	86	99
DTT-MAT	87	99
ELISA	97	96

	RBPT		SAT		CFT		2-ME-MAT		DTT-MAT		
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
ELISA	+	55	48	82	21	87	16	79	24	80	23
	-	-	397	2	395	2	395	-	397	1	396
P Değeri	<0,001		0,14		0,29		0,06		0,07		

Tablo 2. ELISA ile Diğer Serolojik Test Sonuçlarının Karşılaştırılması.

%16,2, 2-ME-MAT ile %15,8 ve RBPT ile %11'lik bir pozitiflik saptandı. Bu değerler karşılaştırıldığında; ELISA ile CFT, SAT, 2-ME-MAT ve DTT-MAT arasında istatistiksel bir farklılığın olmadığı ($p>0,05$), fakat ELISA ile RBPT sonuçları arasında önemli ölçüde bir farklılık olduğu belirlendi ($p<0,001$). Elazığ ve çevresinde 1995-96 yıllarında yapılan bir çalışmada atık yapmış koyunlarda %20 oranında etken izolasyonu ve %11,9 oranında seropozitiflik saptanmış, sadece 1996 yılında atık yapmış koyunların serumlarında ise %22 oranında bir pozitiflik bildirilmiştir (4). Bu sonuçlar, çalışmamızda elde edilen verilere benzerlik göstermektedir. Ayrıca ülkemizin değişik bölgelerinde yapılan çalışmalarda, hastalığın, Trakya bölgesindeki sığır (%0,6) ve koyun (%0,06) populasyonlarında oldukça düşük bir prevalans ile seyrettiği (5), Muş ili ve çevresindeki koyunlarda %2-7 (19), Kars ili ve çevresindeki sığırlarda %47-65 (20) arasında değişen bir oranda olduğu bildirilmiştir. Bu oranlar, brusellozis'in görülme sıklığının ülkemizde bölgelere göre önemli farklılık arz ettiğini ortaya koymaktadır. Coğrafik yapı, iklim ve hayvan hareketlerinin yoğunluğu gibi faktörler bu farklılıkların oluşmasında rol oynayabilir.

Bu çalışmada ELISA testi ile diğer testlerin sonuçları arasında (RBPT hariç) yüksek bir uyum elde edildiği görüldü. Ayrıca CFT referens test kabul edildiğinde ELISA testinin sensitivitesi %97 ve spesifitesinin ise %96 olduğu ve kullanılan diğer testlerin spesifite bakımından bir paralellik gösterdiği tespit edildi. Testler arasındaki duyarlılık farklılıkları, hayvanların infeksiyonun değişik dönemlerinde olmaları ve buna bağlı olarak serumlarında farklı antikor sınıf ve alt sınıflarına sahip olmalarından ya da kullanılan testlerin ölçebileceği en düşük antikor miktarı ve sınıfının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Nicoletti (21), infekte sığırlarda yaptığı bir çalışmada, CFT ve 2-ME testleri arasında iyi bir uyum olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada da CFT (%17,8) ve 2-ME-MAT (%15,8) ile elde edilen pozitiflik oranlarının birbirine yakın olması iki test arasında belirtilen uyumu destekleyici mahiyettedir.

Atık yapmış ve brusellozis şüpheli koyunların kan serumlarında yapılan bir çalışmada DTT-MAT ve 2-ME-MAT testlerinde eşit oranda pozitiflik saptanmış ve non-spesifik antikorların ve ko-aglutininlerin elimine edilmesini sağlayan DTT katkılı serum aglutinasyon testinin de kullanılmasının yarar sağlayacağı bildirilmiştir (22). Diğer bir çalışmada, Lord et al., (23), infekte sığırlardan aldıkları kan serumlarını değişik serolojik testlerle incelemiş, 2-ME ve SAT testleri ile alınan sonuçların uygunluk gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da aynı antikor sınıfları ile çalışan 2-ME-MAT ve DTT-MAT arasında yüksek oranda bir uyum ($kappa=95$) görüldü.

Çalışmada, RBPT ile ELISA testi sonuçları arasındaki farklılık istatistiksel olarak çok önemli bulundu ($p<0,001$) ve ayrıca bu test ile ELISA arasında orta derecede bir uyum elde edildi ($kappa=64$). Bizim çalışmamız ile çok benzerlik gösteren, başka bir çalışmada da RBPT ile ELISA arasında %61 bir uyumun olduğunu bildirilmiştir (24). Buna paralel olarak, infekte ve sağlıklı koyunlarda yapılan bir çalışmada da ELISA ve RBPT sonuçları arasında istatistiksel olarak önemli farklılık olduğu ortaya konuldu (14). RBPT testi CFT ile kıyaslandığında sensitivitesinin düşük (%61), fakat spesifitesinin mükemmel (%100) olduğu saptandı. Hosie et al., (16), koyunlarda yaptıkları bir çalışmada RBPT'nin CFT ile kıyaslanması neticesinde %67'lik bir sensitivite ve %99'luk bir spesifiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir ki bu sonuçlar çalışmamızda elde edilen verilerle paralellik göstermektedir. Bu çalışmada CFT ile RBPT karşılaştırıldığında, RBPT'nin negatiflik yönünden CFT ile tam bir uyum gösterdiği (Sp %100), pozitiflik yönünden CFT (%15,8) ile RBPT (%11) arasında önemli bir fark olduğu ($p=0,003$) ortaya çıkmaktadır. CFT ile RBPT arasındaki farklılık, diğer çalışmalarda da ortaya konmuş ve RBPT'nin koyun ve keçilerde tarama testi olarak sığırlardan daha az kullanışlı olduğu ileri sürülmüştür (16,25).

Çalışmada kullanılan SAT'ın sensitivitesinin %93 ve

spesifitesinin %99 olduğu belirlendi. SAT ve ELISA testi ile alınan sonuçlar arasında istatistiksel bir farklılığın bulunmadığı ($p>0,05$) ve her iki test arasında yüksek oranda bir uyum ($kappa=0,85$) olduğu görüldü.

Sonuç olarak bu çalışmada rutin testlerle karşılaştırılan ELISA testinin oldukça duyarlı ve spesifik

olduğu ve koyun brusellozis'inin teşhisinde kullanılmasının yarar sağlayacağı ortaya çıkmıştır. Çalışmada elde edilen verilere göre, rutin testlerle alınan sonuçların final bir test (ELISA, CFT) ile incelenmesinin reaktörleri tespit etmede daha güvenilir olacağı kanaati oluşmuştur.

Kaynaklar

- 1 Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M.: Techniques for the Brucellosis laboratory. I.N.R.A., Paris, 1988.
- 2 Arda, M., Bisping, W., Aydın, N., İstanbuloğlu, E., Akay, Ö., İzgür, M., Diker, S. ve Karaer, Z.: Orta Anadolu Bölgesi Koyunlarında Abortus Olgularının Etiyolojisi ve Serolojisi Üzerinde Bir Çalışma. A. Ü. Vet. Fak. Derg., 1987; 34 :195-206.
- 3 Karaman, Z., Güler, E. ve Küçükayan, U.: Ankara Bölgesinde Toplanan ve Değişik Yörelere Gelen Atık Yapan Koyun Kan Serumları ve Materyallerinin Serolojik ve Mikrobiyolojik Yoklaması Üzerinde Çalışmalar. Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg., 1993; 7: 60-73.
- 4 Muz, A., Özer, H., Eröksüz, H., Ertaş, H.B., Öngör, H., Gülcü, H.B., Dabak, M., Başbuğ, O. ve Kalender, H.: Elazığ ve Çevresinde Koyun ve Keçilerde Abortus Olgularının Bakteriyolojik, Serolojik ve Patolojik Olarak İncelenmesi. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 1999; 23: 77-188.
- 5 Demiröz, K., Çelik, M., İyisan, A.S., Özdemir, Ü. ve Erdenliç, S.: Trakya Bölgesinde Brucellosis'in Sero-Epidemiyolojisi. Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg., 1996; 27: 79-100.
- 6 Wallach, J. C., Miguel, S. E., Baldi, P. C., Guamera, E., Goldbaum, F. A. and Fossati, C. A.: Urban Outbreak of *Brucella melitensis* Infection in an Argentine Family: Clinical and Diagnostic Aspects. FEMS Immunological and Medical Microbiology, 1994; 8: 49-56.
- 7 Brown, S.L., Klein, G.C., McKinney, F.T. and Jones, W.L.: Safranin O-Stained Antigen Microagglutination Test for Detection of *Brucella* Antibodies. J. Clin. Microbiol., 1981; 13: 398-400.
- 8 Gilbert, G.L. and Hawes, L.A.: The Antibody Response to *Brucella*: Immunoglobulin Response measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Conventional Tests, Aust. N. Z. J. Med., 1981; 11: 40-45.
- 9 Jimenez de Bagües, M.P., Marin, C.M., Blasco, J.M., Moriyon, I. and Gamazo, C.: An ELISA with Lipopolysaccharide Antigen for the Diagnosis of *B. melitensis* Infection in Sheep and for the Evaluation of Serological Responses Following Subcutaneous or Conjunctival *B. melitensis* Strain Rev.1 Vaccination. Vet. Microbiol., 1992; 30: 233-241.
- 10 Klein, G.C. and Behan, K.A.: Determination of *Brucella* Immunoglobulin G Agglutinating Antibody Titer with Dithiothreitol. J. Clin. Microbiol., 1981; 14: 24-25.
- 11 Okuno, T. and Kondelis, N.: Evaluation of Dithiothreitol (DTT) for Inactivation of IgM Antibodies. J. Clin. Pathol., 1978; 31: 1152-1155.
- 12 Cho, H.J. and Niilo, L.: Diagnostic Sensitivity and Specificity of An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of *Brucella ovis* Infection in Rams. Can. J. Vet. Res., 1987; 51: 99-103.
- 13 Nielsen, K., Gall, D., Kelly, W., Vigliocco, A., Henning, D. and Garcia, M.: Immunoassay Development Application to Enzyme Immunoassay For the Diagnosis of Brucellosis. Agriculture and Agri-Food, Canada, 1996.
- 14 Delgado, S., Fernandez, M. and Carmenes, P.: Evaluation of An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Sheep Infected and Vaccinated with *Brucella melitensis*. J. Vet. Diagn. Invest., 1995; 7: 206-209.
- 15 Mateu-de-Antonio, E.M., Martin, M. and Soler, M.: Use of Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Hot Saline Solution Extracts of A Variant (M) Strain of *Brucella canis* for Diagnosis of Brucellosis in Dogs. Am. J. Vet. Res., 1993; 54: 1043-1046.
- 16 Hosie, B.D., Al-Bakri, O.M. and Futter, R.J.: Survey of Brucellosis in Goats and Sheep in the Yemen Arab Republic: Comparison of Tests for *Brucella melitensis* Infection in sheep. Trop. Anim. Hlth. Prod., 1985; 17: 93-99.
- 17 Dean, A.G., Dean, J.A., Coulombier, D., Brendel, K.A., Smith, D.C., Burton, A.H., Dicker, R.C., Sullivan, K.M., Fagan, R.F. and Arner, T.G.: Epi-Info, Version 6: A Word Processing, Database, and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, U.S.A, 1994.
- 18 Abramson, J.H.: Making Sense of Data, Oxford University Press, Second Edition, New York, 1994; 176-179.
- 19 Ertürk Lee, S.: Muş İlinde, Koyunlarda Brucellosis'in Sero-Prevalansının Rose Bengal Plate Test (RBPT), Serum Tüp Aglutinasyon Test (SAT), Rivanol Test (RT) ve Immunosorbent Assay Test (ELISA) ile Saptanması. Doktora tezi. İ. Ü. Sağlık Bil. Enst., İstanbul, 1995.
- 20 Güllüce, M. ve Leloğlu, N.: Kars ve Çevresinde, Sığırlarda *Brucella abortus*'a Karşı Oluşan Antikorların ELISA ve Diğer Serolojik Yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) Saptanması ve Sonuçların Karşılaştırılması. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 1996; 20: 251-255.
- 21 Nicoletti, P.: Further Evaluation of Serologic Test Procedures Used to Diagnose Brucellosis. Am. J. Vet. Res., 1969; 30: 1811-1816.
- 22 Yardımcı, H., Esendal, Ö.M., Küçükayan, U. ve Erdemoğlu, A.: Koyun Brucellosis'nin Serolojik Teşhisinde Dithiothreitol ve EDTA'nın Kullanılması. A. Ü. Vet. Fak. Derg., 1995; 42: 241-245.

23. Lord, V.R., Rolo, M.R. and Cherwonogrodzky, J.W.: Evaluation of Humoral Immunity to Brucella spp. in Cattle by Use of an Agar-Gel Immunodiffusion Test Containing a Polysaccharide Antigen. Am. J. Vet. Res., 1989; 50: 1813-1816.
24. Abuharfeil, N. and Abo-Shehada, M.N.: A Comparison Between Three Serological Tests for Brucella melitensis Infection in Sheep. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 1998; 22: 119-122.
25. Waghela, S., Wandera, J.G and Wagner, G.G.: Comparison of Four Serological Tests in the Diagnosis of Caprine Brucellosis. Res. Vet. Sci., 1980; 28: 68-171.