

**SİĞİR BRUCellosis'İNİN TEŞHİSİNDE EDTA ve 56°C de
AGLUTİNASYON TESTLERİNİN KULLANILMASI**

Müjgan İzgür*

Ömer Akay**

Mustafa Arda**

Jale Erdeğer***

**Utilisation des tests de céro-agglutination à 56°C et par l'emploi de l'EDTA en
diagnostic de la Brucellose bovine**

Resume: Dans cette recherche, 320 sérums de bovine suspect de la Brucellose, sont examinés en Plate Test (PT), en Rose Bengal Plate Test (RBPT), en Séro-Agglutination Test (SAT), en Séro-Agglutination additionnée d'EDTA (SAT-EDTA) et en Séro-Agglutination à 56°C.

On a trouvé positif, parmi ces sérums examinés, 32.2 p.100 en Plate Test; 1.6 p.100 en Rose Bengal Plate Test et pour les mêmes sérums, on a observé des titres différents de 2/10 à 2/320, 23.8 p.100 en Séro-Agglutination Test; 13.8 p.100 en Séro-Agglutination-EDTA et 5.9 p.100 en Séro-Agglutination à 56°C.

Özet: Bu çalışmada, siğir orijinli, Brucellosis yönünden şüpheli 320 serum; Plate Test (PT), Rose Bengal Plate Test (RBPT), Sero-aglutinasyon testi (SAT), SAT-EDTA ve 56°C de SAT ile incelenmiştir.

Serumların Plate Test'de % 32.2'si, Rose Bengal Plate Test'de % 1.6'sı pozitif bulunmuş ve aynı serumların % 23.8'i SAT'inde, % 13.8'i SAT-EDTA'da, % 5.9'u ise 56°C de SAT'da 2/10-2/320 arasında değişik titreler göstermişlerdir.

Giriş

Brucella cinsindeki etkenler tarafından oluşturulan Brucellosis, akut veya kronik seyirli bir infeksiyon olup; hayvanlarda yavru atımına, infertiliteye, mastitis, orşitis ve artrite neden olmaktadır. Bru-

* Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Bakteriyoloji Bilim Dalı, Ankara.

** Prof. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Bakteriyoloji Bilim Dalı, Ankara.

*** Dr. Araş. Gör., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Bakteriyoloji Bilim Dalı, Ankara.

cellosis'in teşhisi, etken izolasyonu ve identifikasyonuna dayalı direkt yöntemle yapıldığı gibi, infekte hayvanların kan serumları, süt ve süt serumlarına uygulanan serolojik testlerle de indirekt olarak yapılabilmektedir. Bunların dışında etkenin DNA'sının identifikasyonunu esas alan PCR, hibridizasyon gibi biyoteknolojik yöntemler de etkenin varlığını ortaya koymada yararlı olmaktadır.

Dünyanın bir çok ülkesinde, uzun zamandan beri Brucellosis' in teşhisinde önemli bir kriter kabul edilen sero-aglutinasyon testinin (SAT), fazla spesifik olmadığı bilinmektedir (1,4,11,22). SAT'de spesifikiteyi, bir yandan ko-aglutinin'ler ve diğer yandan da non-spesifik aglutinin'ler etkilemektedir. Ko-aglutinin'lerin kanda ortaya çıkmasının nedeni *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Escherichia coli* 0:116 ve 0.157, *Francisella tularensis*, N grubu Salmonella'lar özellikle *Salmonella urbana* ve ayrıca *Campylobacter foetus* gibi etkenlerin Brucella grubu mikroorganizmaları ile olan ortak antijenik yapılarıdır (14,22). Pratikte ko-aglutininlerle karşılaşılan problemler oldukça azdır ve bunların ortaya konulması amacıyla, çeşitli komplementer serolojik reaksiyonlar önerilmektedir (1,2,14). SAT'da spesifikiteyi etkileyen non-spesifik aglutininlerin nedeni ise, bu konuda birçok çalışma olmasına rağmen henüz tam olarak anlaşılamamıştır (3,6-8,22). Bu durum erişkin hayvan serumlarında ortaya çıkmaktadır. Serum glikoproteinlerinin desializasyonuna bağlı olarak, serumda bulunan IgM'ler modifiye olmakta ve bu serumlarla yapılan SAT'da IgM'ler Brucella antijenleriyle non-immun özellikte bir reaksiyon vermektedirler (22). IgM'lerin Fab' larıyla gerçekleşmeyen, sadece Fc kısımlarıyla oluşan bu reaksiyon, SAT sonuçlarının yanlış değerlendirilmesine yol açmaktadır. Ancak, bu fenomen sığır serumlarına ve Brucella antijenlerine bağlı değildir ve diğer bazı hastalıkların tanısında da sorun yaratmaktadır (16, 17, 22).

Non-spesifik antikorları elimine etmek amacıyla; ısı ile serumların muamelesi (9), 56°C'de SAT (15), 2-MET veya rivanolün SAT reaksiyonunda kullanılması (2) ve asit pH'lı (pH 3.6) antijenlerden yararlanılması (5) önerilmektedir. Bu amaçla, son yıllarda en fazla kullanılan EDTA'lı antijenlerdir (16,19-21). EDTA'nın antijen üzerine etkili olmadığı bilinmektedir. Rolünün hücre-aglutinin bağlantısı üzerine olduğu düşünülmekte ve kompetitif bir etki ile non-immun bir reaksiyonu engellediği zannedilmektedir. Divalent katyon kelatlarından olan EDTA ile non-spesifik antikorların ortadan kaldırılmasına ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Scheibner (20), Brucellosis'te EDTA

kullanımının konsantrasyona bağlı olarak sentisiviteyi yükselttiğini ve prozonu ortadan kaldırdığını açıklamış ve aynı araştırmacı (21) bir diğer çalışmada EDTA kullanarak non-spesifik reaksiyonların büyük bir bölümünün elimine edildiğine dikkati çekmiştir. Nielsen ve ark. (17), RIA kullanarak infekte olmamış sığır serumlarında Br. abortus'a karşı oluşan antikorların IgM özelliğinde olduğunu, ancak bu serumların Br. abortus antijenine absorbe edilmelerinden sonra EDTA ile muamelelerini takiben elue olduklarını, bu durumun da IgM'lerin bakterilere Fc kısımlarıyla bağlanmalarından ileri geldiğini açıklamışlardır. Nielsen ve Duncan (16), araştırmalarında Br. abortus ile infekte 3 sığırın 2'sinin serumunda EDTA ile titrede değişme olduğunu, ancak bu değişimin sadece bir dilusyonda görüldüğünü belirtmişlerdir. Nowlan ve Geus (18), Br. abortus ile infekte veya Brucellosis'e karşı aşılanmış sığır serumlarında EDTA'lı antijen kullanarak yapılan testte aglutinasyon titresinde değişiklik olmadığını, ancak Brucella şüpheli hayvanlarda kan serumunda bulunan antikorları EDTA ile elimine ettiklerini açıklamışlardır. MacMillan ve Cockrem (13)'ün yaptıkları çalışmada, EDTA sensitif SAT titresi, diğer çalışmalara oranla çok düşük bulunmuş ve nedeni antijen hazırlama yöntemine, test prosedürüne, değerlendirmeye, hayvan sayısına ve test edilen hayvanların yaşına bağlı olabilir diye belirtilmiştir. MacMillan ve Bell (12), yaptıkları çalışmada, serum aglutinasyon testinin EDTA modifikasyonunun hatalı pozitif reaksiyonların sayısını azaltmada önemli olduğunu, ancak bunun da CFT ile birlikte yapıлып yorumlanması gerektiğini vurgulamışlardır. Trap ve ark. (22), EDTA ve 56°C'de SAT testini 3 farklı sürüde kullanmışlar, 109 hayvanlı infekte sürüde SAT'la % 82.6, EDTA SAT'la % 80.7 reaktör tespit ederken, 56°C'de yapılan testde ise çoğu serumda titre düşmeleri belirlemişlerdir. Problemlili sürü olarak kabul edilen 163 hayvana ait serumların; SAT'la % 63.2 olan titrelerinin EDTA-SAT'la % 15.9'a; SAT'la % 66.3 olan titrenin ise 56°C'de SAT'la % 15.9'a düştüğü belirlenmiş ve 3. grupta ise (aynı zamanda CFT pozitif), önemli bir değişiklik gözlenmediği belirtilmiş ve bu sonuçlara göre; infekte hayvan serumlarında EDTA-SAT ile önemli sayılacak titre değişikliklerinin olmadığı ancak problemlili sürülerde EDTA'nın non-spesifik aglutininleri elimine ettiği ve EDTA-SAT ile 56°C 'de SAT arasında iyi bir korelasyon olduğu açıklanmıştır.

Serum içinde bulunan antikorların ortadan kaldırılması veya inaktive edilmeleri değişik ısıda tutulmaları ile de mümkündür. Ancak, inaktivasyon sırasında koagülasyonun önüne geçmek için se-

rumlar dilue edilmelidir. Uygulanacak ısı derecesi de her antikor için değişik olmaktadır (7,10,15). Hess (6), yaptığı çalışmada non-spesifik antikorların ısı ile 70°C'de 10 dak. tutulmalarıyla elimine edildiklerini, spesifik antikorların ise bundan etkilenmediklerini, ancak 90°C'de tutulmaları gerektiğini açıklamıştır. Hoerlein (10), domuzların şüpheli Brucellosis olgularında 56°C'lik benmari ve 16 saat ısıtmadan sonra değerlendirilen testlerin 37°C'de yapılanlara göre daha düşük titrede olduklarını belirtmiştir.

Bu çalışmada, Brucellosis yönünden şüpheli sığır serumlarının SAT yanısıra, EDTA-SAT ve 56°C'de SAT uygulanarak, non-spesifik antikorların ortadan kaldırılması ve sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Serumlar

Test serumları: Denemede kullanılan 320 sığır serumu A.Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji Bilim dalı ve Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü'nden sağlanmıştır.

Standart serumlar: Testlerde, kontrol serumları olarak 2/500 titreli Br. abortus antiserumu ile Br. abortus negatif serumu kullanılmıştır.

Antijenler

Brucella plate test, Rose Bengal plate test ve Brucella abortus aglutinasyon antijenleri Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü'nden sağlanmıştır.

EDTA kullanılarak yapılan sero-aglutinasyon testi için Br. abortus aglutinasyon antijeninin ml'sine 0.372 g EDTA (di sodique ethylene diamine tetra acetique acide) ilave edilerek 10 mM/l sağlanmıştır (22).

Plate Test (PT)

Bu test için 0.03 ml serum aynı miktar Brucella Plate Test antijeni ile karıştırılıp sonuçlar 4 dak içinde değerlendirilmiştir (1).

Rose Bengal Plate Test (RBPT)

Bu test için de 0.03 ml serum aynı miktar Rose Bengal Plate Test antijeniyle (sodyum laktat-asit tamponlu, pH 3.6) karıştırılmış ve sonuçlar 4 dak. içinde değerlendirilmiştir (1).

Serum Aglutinasyon Testi (SAT)

Bu amaçla, test serumlarının 1/5.....1/640'a kadar 0.5 ml içinde sulandırılmaları yapılarak, üzerine eşit miktarda Br. abortus aglutinasyon antijeni konulmuş ve 37°C'de 18 saat inkubasyonu takiben sonuçlar, kontrol ile karşılaştırılarak gözle değerlendirilmiştir (2).

EDTA-SAT

Bu testte, sero-aglutinasyon testine göre hazırlanan dilusyonların üzerine EDTA'lı antijenden eşit miktarda konulmuş ve 37°C de 18 saat inkubasyon süresi sonunda sonuçlar SAT'i gibi değerlendirilmiştir (22).

56°C'de SAT

Bu amaçla, sero-aglutinasyon testi yapıldıktan sonra tüpler 2 saat 56°C'lik su banyosunda tutulmuş, daha sonra +4°C de 18 saat bırakıldıktan sonra sonuçlar SAT'inde olduğu gibi değerlendirilmiştir (15).

Bu testlerin tümünde kontrol negatif ve pozitif serumlar kullanılmış ve incelenen serumların 5 testle de aynı gün paralel muayeneleri yapılmıştır.

Bulgular

PT Sonuçları

Brucellosis yönünden incelenen 320 siğir serumunun bu testle 103 (% 32.2)'ü pozitif ve 217 (% 67.8)'si negatif bulunmuştur.

RBPT Sonuçları

İncelenen 320 serumun 5 (% 1.6)'i pozitif ve 315 (% 98.4)'i ise bu testle negatif bulunmuştur.

SAT Sonuçları

Bu testle incelenen serumların 76 (% 23.8)'sı 2/10-4/320 arasında pozitif titre gösterirken, 244 (% 76.2)'ü negatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. SAT Sonuçları.

Pozitiflik Derecesi	Serum Dilusyonları					
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
+	-	1	-	-	-	-
++	9	9	1	1	-	-
+++	-	-	-	-	-	-
++++	35	12	4	2	1	1
Toplam	44	22	5	3	1	1

EDTA-SAT Sonuçları

Bu testle 320 serumun 44 (% 13.8)'ünün 2/10-2/320 arasında titre gösterdikleri, 276 (% 86.2)'sının ise negatif olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. EDTA-SAT Sonuçları.

Pozitiflik Derecesi	Serum Dilusyonları					
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
+	-	-	-	-	-	-
++	12	1	-	-	-	1
+++	1	-	-	-	-	-
++++	22	5	1	-	1	-
Toplam	35	6	1	-	1	1

56°C de SAT Sonuçları

İncelenen 320 serumun 19 (% 5.9)'unun 2/10-2/320 arasında titre gösterdiği 301 (% 94.1)'inin bu testle negatif olduğu saptanmıştır (Tablo 3).

Ayrıca, incelenen negatif kontrol serum 5 testin tümünde negatif bulunmuş, aynı testlerde, pozitif kontrol serumun titresinde de herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.

Tablo 3. 56°C de SAT Sonuçları.

Pozitiflik Derecesi	Serum Dilusyonları					
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
+	-	-	-	-	-	-
++	6	1	-	-	-	1
+++	-	-	-	-	-	-
++++	7	2	1	-	1	-
Toplam	13	3	1	-	1	1

Tartışma ve Sonuç

Sığır Brucellosis'inin teşhisinde serolojik testler çok önem taşımaktadır. Bu amaçla en çok Plate Test (PT), Rose Bengal Plate Test (RBPT) ve Sero-aglutinasyon Test'inden (SAT) yararlanılmaktadır. Bu testlerden, özellikle, Sero-Aglutinasyon Testiyle belirlenen titre düzeylerine göre; sığırların infekte olup olmadıklarına karar verilmektedir.

Aşısız sığırlar için 2/40 ve üstü, aşılı sığırlar için ise 2/80 ve üstü titreler SAT'de Brucellosis yönünden pozitif kabul edilmektedir (4). Ancak bu kriterleri sadece SAT ile saptamak, infeksiyon açısından yanlış sonuçlara sebebiyet vermektedir. Bu yanlış pozitif sonuçlar ko-aglutininler kadar non -spesifik antikorlardan da ileri gelebilmektedir. Günümüzde ne immunoelektroforez, ne de poliakrilamid jel üzerinde elektroforezle bu yapılar ortadan kaldırılamamaktadır (3, 8,14,22). Bu nedenle, özellikle, yaşlı hayvanlarda ortaya çıkan non-spesifik antikorların elimine edilmesinde bir çok modifiye SAT'inden yararlanılmaktadır (13,16,18-21). Nielsen ve Duncan (16), EDTA'nın SAT antijenine ilavesiyle yaptıkları çalışmada, non-spesifik antikorların EDTA labil olduklarını saptamışlardır. Nowlan ve Geus (8), 45/20 ile aşılı 9 hayvan, Br. abortus 544 ile gebeliğin 6. ayında infekte ettikleri 6 hayvan ve Br. abortus'a karşı antikor taşıdıkları saptanan 10 hayvana ait serumları SAT ve SAT-EDTA ile incelemişler ve sadece 3. grupta önemli ölçüde titre düşüşlerini kaydetmişlerdir. Trap ve ark. (22), problemleri bir sürüye ait 163 serumu SAT ve SAT-EDTA ile incelemişler ve de antikor düzeyinde SAT-EDTA ile % 63.2'den % 15.9'a inen bir düşüş kaydetmişler ve bu düşüşün titrede en az 2 dilusyonluk olması gerektiğini vurgulamışlardır. Çalışmada incele-

nen 320 serumun plate testle 103 (% 32.2)'ü, Rose Bengal plate testle 5 (% 1.6)'i pozitif bulunmuş, aynı serumların SAT ile 76 (% 23.8)'ı, SAT-EDTA ile 44(% 13.8)'ü 2/10-2/320 arasında değişik titreler göstermişlerdir. Sonuçların karşılaştırılmasında, SAT'la incelenen serumların 44'ü 1/10 da titre gösterirken, SAT-EDTA'da bu dilüsyonda 35 serum, 1/20 de SAT'la 22, SAT-EDTA ile 6, 1/40 da SAT'la 5, SAT-EDTA ile 1, 1/80 de SAT'la 3 serum pozitif bulunurken, aynı titrede SAT-EDTA ile pozitif veren seruma rastlanılamamıştır. Buna karşın 1/160 ve 1/320 titrede bulunan 2'şer serum SAT-EDTA ile de aynı dilüsyonlarda pozitif bulunmuştur. SAT ve SAT-EDTA'nın karşılaştırılması amacıyla yapılan çalışmalarda titre düşüşleri, bu çalışmada da saptanmıştır. Ayrıca, bu araştırmada yüksek titrelerde pozitif sonuç veren serumların EDTA'lı antijenle reaksiyon sonucunda EDTA'dan etkilenmedikleri, dilüsyonlarda herhangi bir değişikliğe neden olmadıkları belirlenmiştir.

Non-spesifik antikorların elimine edilmesi amacıyla kullanılan yöntemlerden biri de ısıdır (7,9,10,22). Ancak, ısı yalnızca aglutinasyon reaksiyonunun seyrini etkilememekte, aynı zamanda, antikorların niteliğine de tesir etmektedir (9). Ayrıca, ısının non-spesifik antikorlara olduğu kadar, spesifik antikorları da etkilediği bilinmektedir (22). Morse ve ark. (15), non-spesifik antikorlar içerdikleri bilinen serumları, Brucellosis yönünden 56°C de aglutinasyonla incelemelerinde, SAT'a göre titre düşüşleri saptadıklarını belirtmişlerdir. Trap ve ark. (22), sığır Brucellosis'i için yaptıkları çalışmada, 56°C de SAT ile nonspesifik antikorları % 67 oranında elimine ettiklerini açıklamışlardır. Çalışmada, 56°C de SAT ile 320 serumun 10 (% 5.9)'u 2/10 ve 2/320 arasında titre göstermiş ve dolayısıyla; SAT'la bu dilüsyonlarda % 23.8 saptanan pozitiflik, ısıyla % 5.9' inmiştir. Bu konuda yapılan araştırmalara paralellik sağlayan bu çalışmada, yine ısı ile SAT-EDTA'da olduğu gibi 1/160 ve 1/320 titrede saptanan pozitif sonuçlarda değişiklik gözlenmemiştir.

Alınan bu sonuçlar, sığır Brucellosis'inin saptanmasında, kriter olarak kabul edilen 1/40 ve 1/80 dilüsyonlarının sadece SAT'la değerlendirilmemesini, bu testle birlikte, sonuçları etkileyen özellikle non-spesifik antikorların eliminasyonu amacıyla EDTA veya ısının kullanılmasının gerektiğini göstermektedir.

Kaynaklar

1. **Alton, G.G., Jones, L.M. and Pietz, D.E.** (1977). *La Brucellose Techniques de Laboratoire. Deuxième édition.* Organisation Mondiale de la Santé. Série de Monogramme No. 55. Genève.
2. **Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M.** (1988). *Techniques for the Brucellosis Laboratory.* INRA. Paris.
3. **Ancyzkowski, F., Tereszczuk, M. and Hajnosz, T.** (1974). *Studies on the Natural "Agglutinins" in the bovine sera. I. Occurrence of the natural anti-Brucella "Agglutinins" in sera of normal cattle.* Ann. Immunol., 6: 61-65.
4. **Anonym** (1982). *Türkiye Brucellosis Mücadele Projesi.* Tarım ve Orman Bakanlığı Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü. Ankara.
5. **Gaumont, R. et Toma, B.** (1974). *Mis: au point de diagnostic sérologique.* Réc. Méd. Vét., 150: 339-341.
6. **Hess, W.R.** (1953). *Studies on a non-specific Brucella agglutinating substance in bovine serum. I. Differentiation of the specific and non-specific agglutinin by heat treatment.* Am. J. Vet. Res., 14: 192-194.
7. **Hess, W.R.** (1953). *Studies on a non-specific agglutinating substance in bovine serum. II. Isolation and purification on the Brucella-agglutinating substances.* Am. J. Vet. Res., 14: 195-197.
8. **Hess, W.R. and Roepke, M.H.** (1951). *A non-specific Brucella agglutinating substance in bovine serum.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 77: 469-472.
9. **Hill, W.K.W.** (1963). *Die gleichzeitige anwendung mehrerer serologischer untersuchungsverfahren bei der diagnose der Brucellose der rinder unter besonderer berücksichtigung der differenzierung zwischen impf- und infektionsreaktionen.* Zbl. für Vet. Med., 10: 127-172.
10. **Hoerlein, A.B.** (1953). *Studies on swine Brucellosis. III. The differentiation of specific and non-specific agglutination titers.* Cornell Vet., 43: 28-37.
11. **İzgür, M., Arda, M., Aydın, N. ve Akay, Ö.** (1985). *Brucellosis.* Batı Akdeniz Bölgesi I. Hayvancılık Semineri. 26-28 Kasım, Antalya. 2s. 17-225.
12. **MacMillan, A.P. and Bell, R.A.** (1983). *Non-specific reactions to the Brucella abortus SAT.* Vet. Rec., 116: 139.
13. **MacMillan, A.P. and Cockrem, D.S.** (1985). *Reduction of non-specific reactions to the Brucella abortus serum agglutination test by the addition of EDTA.* Res. Vet. Sci., 38: 288-291.
14. **Mittal, K.R. and Tizard, I.** (1981). *Serological cross reactions between Brucella abortus and Yersinia enterocolitica serotype 0:9.* Vet. Bull., 51: 501-505.
15. **Morse, E.V., Schnieder, D.W. and Mc Nutt, S.H.** (1955). *The effect of incubation 56° C on the tube agglutination test for bovine Brucellosis.* Am. J. Vet. Res., 16: 269-273.
16. **Nielsen, K. and Duncan, R.** (1982). *Demonstration that non-specific bovine Brucella abortus agglutinin is EDTA labile and not Ca dependent.* J. Immunol., 129: 366-3769.

17. **Nielsen, K., Stilwell, K., Stemshorn, B. and Duncan, R.** (1981). *Ethylene diamine-tetraacetic acid di-sodium salt labile bovine immunoglobulin M Fc binding to Brucella abortus: A cause of non-specific agglutination.* J. Clin. Microbiol., 14: 32-38.
18. **Nowlan, P.F. and Geus, H.** (1985). *Use of EDTA modified antigen in the serodiagnosis of bovine Brucellosis.* Vet. Rec., 116: 13.
19. **Romakhov, V.A., Efromov, V.S., Kasyanov, A.N. and Tyagunina, E.A.** (1990). *EDTA- treated antigen for the agglutination test for bovine Brucellosis.* Veterinaria. 3: 25-27.
20. **Scheibner, E.** (1976). *Titriplexplasma in der Brucellose Diagnostik.* Berl. Münch. tierarztl. Wschr., 89: 281-283.
21. **Scheibner, E.** (1976). *Spezifitätsgrenzen der Brucellose. Langsam-agglutination.* Berl. Münch. tierarztl. Wschr., 89: 300-302.
22. **Trap, D., Garin, B., Moutou, F. et Gaumont, R.** (1985). *Brucellose bovine: Elimination des séroagglutinations non-spécifiques par l'emploi de l'EDTA et de l'agglutination à 56°C.* Rév.Méd.Vét., 136: 399-409.