

KOYUN BRUCELLOSIS'İNİN SEROLOJİK TEŞHİSİNDE DITHIOTHREITOL VE EDTA'NIN KULLANILMASI

Hakan Yardımcı¹
Uğur Küçükayan³

Ömer M. Esenalp²
Ali Erdemoğlu⁴

The use of dithiothreitol and EDTA in the serological diagnosis of ovine brucellosis

Summary: *In this study, a total of 101 brucellosis suspected blood serum samples obtained from aborted ewes were examined with Rose Bengal Plate Test (RBPT), Microagglutination Test (MAT), 2 Mercaptoethanol Microagglutination Test (ME-MAT), Dithiothreitol Microagglutination Test (DTT-MAT) and Ethylene Diamine Tetraacetic Acid Microagglutination Test (EDTA-MAT).*

Among 101 blood serum samples examined, 59 (58.4%), 64 (63.4%), 65 (64.4%), 65 (64.4%) and 65 (64.4%) samples were determined as positive in RBPT, MAT, ME-MAT, DTT-MAT and EDTA-MAT, respectively.

It was concluded that, the use of DTT- and EDTA-MAT, which can readily eliminate non-specific antibodies as well as co-agglutinins, together with Serum Agglutination Test (SAT) and/or MAT in the serological diagnosis of ovine brucellosis would be beneficial.

Özet: *Bu çalışmada, abort yapmış koyunlardan alınan brucellosis şüpheli 101 kan serumu Rose Bengal Plate Test (RBPT), Mikroaglutinasyon Testi (MAT), 2 Merkaptoetanol Mikroaglutinasyon Testi (ME-MAT), Dithiothreitol Mikroaglutinasyon Testi (DTT-MAT) ve Etilen Diamin Tetraasetik Asit Mikroaglutinasyon Testi (EDTA-MAT) ile incelenmiştir.*

Test edilen 101 koyun kan serumundan RBPT'de 59 (%58.4), MAT'da 64 (63.4%), ME-MAT'da 65 (%64.4), DTT-MAT'da 65 (%64.4) ve EDTA-MAT'da 65 (%64.4) pozitif reaksiyon saptanmıştır.

Sonuç olarak, koyun brucellosis'inin serolojik teşhisinde Serum Aglutinasyon Testi (SAT) ya da MAT yanında non-spesifik antikorların ve koaglutininlerin elimine edilmesini sağlayan DTT ve EDTA katkılı serum aglutinasyon testlerinin de kullanılmasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Giriş

Brucellosis, insan ve hayvanlarda *Brucella* cinsine bağlı mikroorganizmalar tarafından oluşturulan bir infeksiyon olup hayvanlarda yavru atımına, mastitis, orşitis ve artritise neden olmaktadır. Hastalığın teşhisi direkt (etken izolasyon ve identifikasyonu) ve indirekt (kan serumu, süt ve süt serumu vs. ile serolojik testler) yöntemlerle yapılabilmektedir. Ayrıca son yıllarda biyoteknolojik yöntemlerle de (PCR, hibridizasyon, vs.) etkenin tanısı mümkün olmaktadır (1, 3, 9).

Koyun brucellosis'inin serolojik tanısında Plate Test (PT), Rose Bengal Plate Test (RBPT), Serum Aglutinasyon Testi (SAT), Komplement Fikzasyon (CF) ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gibi tekniklerden yararlanılmaktadır (3, 14, 15, 26).

Rose Bengal Plate Test (RBPT), hem laboratuvar şartlarında ve hem de sahada tarama testi olarak kullanılmaktadır (1). Rose Bengal boyası ile boyalı bu antijen asit pH'ya (pH 3.6) sahip olması nedeniyle IgM'lerin aktivitesini durdurarak IgG'lerin reaksiyon vermesini sağ-

1. Yrd. Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
2. Dr., AÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
3. Vet. Hekim, Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, Ankara.
4. Vet. Hekim, 600 Yataklı Hava Hastahanesi, Ankara.

lar. Ayrıca nonspesifik aglutininlerin de etkinliğini engeller (8).

Serum Aglutinasyon Testi (SAT), makro veya mikro olarak uygulanmaktadır (1, 13). Makro serum aglutinasyon testi fazla miktarda serum, tüp, pipet ve antijen gerektirdiği için çok sayıda örneğin işlenmesinde dezavantaja sahiptir. Mikro serum aglutinasyon testi (MAT), az miktarda serum ve antijen gerektirmesi, uygulandığı mikropate'lerde çok sayıda örneğin değerlendirilmesi gibi avantajlara sahiptir (12, 13). MAT sonuçlarının okunması sırasında oluşabilecek güçlükler de antijenin boyanması ile ortadan kaldırılmıştır. MAT'da antijenin boyanması için çeşitli boya maddelerinden (Safranin-O, Trifeniltetrazolium klorid, vs.) yararlanılmıştır (5, 18). Araştırmacılar (5, 10, 16) Safranin-O ile boyalı antijenle yapılan MAT'da sonuçların daha net değerlendirildiğini bildirmişlerdir. Serum aglutinasyon testi fazla spesifik değildir (8). Koaglutininler ve non-spesifik aglutininler spesifiteyi etkilemektedir. Brucella grubu mikroorganizmalar ile ortak antijenik yapıya sahip olan bazı bakteriler (Yersinia enterocolitica 0:9, Escherichia coli 0:116 ve 0:157, Franciella tularensis, N grubu Salmonella'lar özellikle S. urbana ve Campylobacter fetus vs.) koaglutininlerin nedeni olarak gösterilmiştir (19, 25). Non-spesifik aglutininlerin nedeni henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Trap ve ark. (25)'na göre bu durum serum glikoproteinlerinin desializasyonuna bağlı olarak, serumda bulunan IgM'lerin modifiye olması ve bu serumlarla yapılan SAT'da IgM'lerin brucella antijenleri ile nonimmün reaksiyon vermeleridir.

Serum aglutinasyon testinin non-spesifik antikorlardan ileri gelen bu olumsuzluğu testte bazı kimyasal maddeler (Ethylenediamine tetraasetik asit-EDTA, 2 mercaptoethanol-ME, Dithiothreitol-DTT, rivanol, vs.) ve ısı (56 C'de SAT) kullanılarak giderilmeye çalışılmıştır (1, 6, 11, 21, 24, 25). ME ve DTT, SAT'da serum sulandırıcısına katılarak kullanılmaktadır (1, 21). Her iki madde de, IgG aktivitesini etkilemezken, IgM'lerin disülfid bağlarını kopararak inaktive olmalarına neden olurlar (2, 21). EDTA ise aglutinasyon antijenine ilave edilerek kullanılmıştır (25). EDTA'nın antijen üzerine etkisi bulunmamaktadır. Hücre-aglutinin bağlantısı üzerinde bir rolü olduğu ve kompetitif bir etki ile non-immün bir reaksiyonu engellediği düşünülmektedir (20, 22). Mercaptoethanol'ün gözleri irrite etmesi ve kötü bir kokuya sahip olması nedeniyle son yıllarda araştırmacılar (4, 17, 21, 24) aynı işleve sahip olan DTT'yi serum aglutinasyon testlerinde kullanmışlardır. Okuno ve Kondelis (21) insan eritrositlerine

karşı oluşan antikorları identifiye ettikleri çalışmada, DTT'yi değişik pH'larda, miktarlarda ve ısılarda denemişler; sırasıyla pH 7-8 arası, 0.0025 M-0.005 M miktarında ve 37 C'de maksimal etkiyi gösterdiğini saptamışlardır. Ayrıca, mercaptoethanol'le karşılaştırıldığında prosedürün basit ve çabuk olmasının yanısıra kötü koku bulunmamasını da avantaj olarak belirtmişlerdir. Behan ve Klein (4) Brucella cinsleri ve F. tularensis arasındaki kros reaksiyonların DTT ile azaltılması üzerine insan serumlarıyla yaptıkları çalışmada, Safranin-O ile boyanmış antijen kullanılan MAT tekniğinden yararlanmışlar ve DTT'nin kros reaksiyonları azalttığını saptamışlardır. Thiange ve ark. (24) yaptıkları bir çalışmada, DTT katkılı aglutinasyon testinin aşılı ve enfekte sığırların ayırımında anahtar bir test olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, koyun brucellosis'inin serolojik teşhisinde DTT ve EDTA katkılı aglutinasyon testlerinin kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Serumlar

Test Serumları: Çalışmada, Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü ve AÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirilen abort yapmış koyunlara ait, 101 kan serumu kullanılmıştır.

Standart Serumlar: AÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanan titresi SAT ile 2/1280 olarak belirlenen serumdan, pozitif kontrol ve sağlıklı bir hayvandan elde edilen negatif titreli bir serumdan da, negatif kontrol olarak serolojik testlerde yararlanılmıştır.

Antijenler

Rose Bengal Plate Test Antijeni: RBPT'de Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen B. abortus S99 suşundan hazırlanan boyalı antijen kullanılmıştır.

Mikro Aglutinasyon Test Antijeni: MAT, ME-MAT (1) ve DTT-MAT'da kullanılan antijenler Brown ve ark. (5)'nin bildirdikleri yöntem göre B. abortus S99 suşundan Safranin-O ile boyanarak hazırlanmıştır.

EDTA-MAT için ise, bu antijenin 100 ml'sine 0.372 g EDTA (Sigma) ilave edilerek (10 mM/L) hazırlanan antijenden (15) yararlanılmıştır.

Rose Bengal Plate Testi (RBPT)

Alton ve ark. (1)'na göre yapılan bu testte kan serumları, lam üzerinde bir damla (0.03 ml) RBPT antijeni ve bir damla (0.03 ml) serum

Tablo 1: Çalışmada kullanılan serum örneklerinin RBPT, MAT, ME-MAT, DTT-MAT ve EDTA-MAT sonuçları.
Table 1: RBPT- MAT- ME-MAT- DTT-MAT and EDTA-MAT results of serum samples.

Serum sayısı	RBPT		MAT		ME-MAT		DTT-MAT		EDTA-MAT	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
101	59 (58.4)*	42 (41.6)	64 (63.4)	37 (36.6)	65 (64.4)	36 (35.6)	65 (64.4)	36 (35.6)	65 (64.4)	36 (35.6)

*: Yüzde oranı

olacak şekilde karıştırılmış ve 4-5 dakika içinde aglutinasyon verenler pozitif ve vermeyenler negatif kabul edilmiştir.

Mikro Aglutinasyon Testi (MAT)

Bu test Brown ve ark. (5) bildirdikleri yöneme göre uygulanmıştır. Testte 96 çukurlu, altı yuvarlak, polystyrene mikroplate'ler (Greiner) kullanılmıştır. Serumun PBS (pH 7.2) ile 1/5'ten başlayan iki katlı sulandırması yapılarak bu dilüsyonlardan gözle 0.05 ml konulmuş, sonra bunun üzerine de Safranin-O ile boyalı antijen eşit miktarda (0.05 ml) ilave edilmiştir. Mikroplate'lerin üzeri şeffaf bantla kapatıldıktan sonra mikrosaker'da (Dynatech) 30 saniye çalkalanmış ve etüvde 37 C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda sonuçlar gözle okunarak değerlendirilmiştir. Düğme tarzında çöküntüler negatif ve dantela benzeri çöküntüler pozitif kabul edilmiştir.

ME-Mikro Aglutinasyon Testi (ME-MAT)

ME-MAT yukarıda bildirildiği gibi yapılmış ve değerlendirmiştir. Ancak, serum sulandırmalarında kullanılan PBS'ye (pH 7.2) Alton ve ark. (1)'nin bildirdiklerine göre %0.7 oranında 2-Mercaptoethanol (Merck) ilave edilmiştir.

DTT-Mikro Aglutinasyon Testi (DDT-MAT)

DTT-MAT da yukarıda bildirildiği gibi yapılmış ve değerlendirilmiştir. Ancak, serum sulandırmalarında PBS (pH 7.2) ile hazırlanmış 0.005 M dithiothreitol'den yararlanılmıştır. Antijen ilavesi ile her gözdeki DTT'nin final konsantrasyonu 0.0025 M olmuştur (4).

EDTA-Mikro Aglutinasyon Testi (EDTA-MAT)

Bu test de yukarıdaki gibi Brown ve ark. (5)'nin bildirdiklerine göre yapılmış ve değerlendirilmiştir. Ancak, antijen olarak EDTA ile hazırlanmış boyalı mikroaglutinasyon antijeni kullanılmıştır.

Bu testlerin tümünde pozitif ve negatif kontrol serumları kullanılmış ve incelenen serumların bütün testlerle aynı gün paralel muayeneleri yapılmıştır. Ayrıca, testlerde kullanılan

serumlar aşısız hayvanlara ait olduğu için 2/20'lik titrelerin üzerindeki serumlar (23) pozitif kabul kullanılan MAT tekniğinden yararlanmışlar ve DTT'nin kros reaksiyonları azalttığını saptamışlardır. Thiange ve ark. (24) yaptıkları bir çalışmada, DTT katkılı aglutinasyon testinin aşılı ve infekte sığırların ayırımında anahtar bir test olduğunu belirtmişlerdir.

Bulgular

RBPT Sonuçları: Çalışmada incelenen 101 koyun serumundan 59'u (%58.4) pozitif ve 42'si (%41.6) negatif bulunmuştur (Tablo 1).

MAT Sonuçları: Bu testle incelenen 101 koyun serumundan 64'ü (%63.4) pozitif ve 37'si (%36.6) negatif bulunmuştur (Tablo 1).

ME-MAT Sonuçları: İncelenen 101 serumun 65'i (%64.4) pozitif ve 36'sı (%35.6) ise bu testle negatif bulunmuştur (Tablo 1).

DTT-MAT Sonuçları: Test edilen 101 serumun 65'i (%64.4) pozitif ve 36'sı (%35.6) ise bu testle negatif bulunmuştur (Tablo 1).

EDTA-MAT Sonuçları: Bu testle incelenen 101 serumun 65'i (%64.4) pozitif ve 36'sı (%35.6) ise bu testle negatif bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 2: Çalışmada kullanılan serum örneklerinin MAT, ME-MAT, DTT-MAT ve EDTA-MAT titreleri.
Table 2: MAT- MET-MAT- DTT-MAT- and EDTA-MAT titers of serum samples.

Titre	MAT	ME-MAT	DDT-MAT	EDTA-MAT
Negatif	37*	36	36	36
1/20	11	6	6	6
1/40	8	4	4	8
1/80	8	10	12	8
1/160	14	10	10	14
1/320	7	19	18	16
1/640	11	9	7	7
1/1280	2	5	7	6
1/2560	2	2	1	0
1/5120	1	0	0	0
TOPLAM	64**	65	65	65

*: Serum sayısı

** : Toplam pozitif serum sayısı

Çalışmada incelenen pozitif serumların MAT, ME-MAT, DTT-MAT ve EDTA-MAT titrelerine göre dağılımları Tablo-2'de gösterilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Brucellosis'in serolojik tanısında non-spesifik antikorlardan ve koaglutininlerden ileri gelen yanlış pozitif reaksiyonları önlemek amacı ile son yıllarda DTT ve EDTA gibi çeşitli maddelerden yararlanılmıştır (11, 21, 24, 25). Sığır brucellosis'inin tanısında kullanılmaya başlanan EDTA (11) ve DTT (24) ile serum aglutinasyon testi hakkında çeşitli kaynaklar bulunmasına karşın, yapılan literatür taramalarında koyun brucellosis'inin teşhisinde bu testlerin kullanıldığına ilişkin bilgiye rastlanılamamıştır. Ancak, koyun brucellosis'inin teşhisinde SAT (makro veya mikro), RBPT ve ME-SAT ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (6, 7, 14, 16, 26). Falade ve Hüssein (7) koyun ve keçi serumlarında yaptıkları çalışmada RBPT, SAT ve ME-SAT sonuçlarında sırasıyla %2.8, %2.8 ve %1.6 pozitif reaksiyon saptamışlardır. Huang (14) 221 koyun serum örneğinde ELISA, SAT, CFT ve RBPT ile brucella antikorlarını araştırmış, SAT'da %48.8 ve RBPT'de de %39.0 pozitif olgu saptamıştır. Yardımcı (26) 192 koyun kan serumu ile yaptığı denemede pozitifleri saptamada ELISA SAT RBPT PT sırası elde etmiştir. Buna karşın Coker ve ark. (6) B. melitensis ile infekte koyun kan serumlarında tüp aglutinasyon testi ile %70.6 ve RBPT ile %69.3 pozitif bulmuşlardır. Kızılyer (16) Safranin-O ile boyalı B. abortus antijeni kullandığı mikro-aglutinasyon testinde %84 pozitif belirlerken, RBPT ile %47.6 pozitif serum saptamıştır. Bu çalışmada, incelenen 101 koyun kan serumundan MAT, ME-MAT ve RBPT'de sırasıyla %64, %65 ve %59 oranlarında pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar MAT ve RBPT oranları yönünden Kızılyer'in (16) bulgularına uygunluk göstermektedir. Her ne kadar bu çalışmada mikro yöntem kullanılmışsa da MAT ve RBPT sonuçları makro teknikle çalışan diğer araştırmacılar Falade ve Hüssein (7) dışındaki diğer çalışmaların (6, 14, 26) sonuçlarına uyaktadır.

İzğür ve ark. (15) 320 sığır serumunu PT (Plate test), RBPT, SAT, SAT-EDTA ve 56 C'de SAT ile incelemişler ve bu testlerde sırasıyla %32.2, %1.6, %23.8 ve %5.9 pozitif olgu saptamışlardır. Bu çalışmada, DTT ve EDTA, pozitifleri saptamada eşit bulunmuşsa da bazı serum örneklerinde bir titre fazla ya da eksik sonuç vermişlerdir. Aynı antikor sınıfları ile çalışan EDTA-MAT, DTT-MAT ve ME-MAT'dan birinin pozitif olduğu tüm serumlar-

da diğerleri de pozitif bulunmuştur. Ancak, RBPT bu üç testin pozitif olduğu altı serumda negatif sonuç vermiştir. MAT ve diğer testler (EDTA-, DTT-ve ME-MAT) arasındaki farklar aynı sürü içindeki hayvanların, hastalığın değişik periyodlarında (akut veya kronik) bulunmasından ileri gelmektedir. Bilindiği gibi (3, 8) akut olgularda kan serumunda IgM seviyeleri yüksek durumdadırlar. Enfeksiyon kronik hale geçtikçe IgG seviyesi yükselmektedir. Nitekim, beş serum MAT ile pozitif sonuç verdiği halde EDTA- DTT ve ME-MAT'ta negatif olduğu görülmüştür. Bu da, kan serumlarında IgM seviyesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu çalışmada pis kokulu ve irkiltici özellikteki mercaptoethanol yerine kokusuz ve kolay hazırlanabilir özelliğe sahip dithiothreitol maddesinin de koyun brucellosis'inin serolojik teşhisinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu iki testten farklı olarak aglutinasyon antijenine EDTA karıştırılarak hazırlanan MAT tekniğinde de sığır brucellosis'inin teşhisinde İzğür ve ark. (15)'nin çalışmalarında görüldüğü gibi olumlu sonuçlar alınmıştır.

Sonuç olarak, koyun brucellosis'inin serolojik teşhisinde SAT ya da MAT yanında non-spesifik antikorların ve ko-aglutininlerin elimine edilmelerini sağlayan DTT ve EDTA katkılı serum aglutinasyon testlerinin de kullanılması yarar sağlayacağı belirlenmiştir.

Kaynaklar

1. Alton, G.G., Jones, L.M. and Pietz, D.E. (1975). *Laboratory techniques in brucellosis*. 2nd ed., World Health Organization, Monograph Series, No.55, Geneva.
2. Anderson, R.K., Brumfield, H.P.J. and Gough, P. (1964). *Brucella agglutinating antibodies: relation of mercaptoethanol stability to complement fixation*. Science 143:1334-1335.
3. Arda, M., Minbay, A. ve Aydın, N. (1982). *Özel Mikrobiyoloji, bakteriyel infeksiyöz hastalıklar*, A.Ü. Basımevi, AÜ Vet Fak Yayın No. 386, Ankara.
4. Behan, K.A. and Klein, G.C. (1982). *Reduction of brucella species and Franciella tularensis cross-reacting agglutinins by dithiothreitol*. J. Clin Microbiol, 16: 756-757.
5. Brown, S.L., Klein, G.C., McKinney, F.T. and Jones, W.L. (1981). *Safranin O-stained antigen microagglutination test for detection of brucella antibodies*. J Clin Microbiol, 13: 398-400.
6. Çoker, A., Mete, K. ve Kaya, O. (1990). *Brucella melitensis ile infekte koyun kan serumlarında rivanol plate testin diğer yardımcı testlerle karşılaştırılması*. Pendik Hay Hast Merk Araş Enst Derg, 21: 17-22.
7. Falade, S. and Hüssein, A.H. (1979). *Brucella sero-activity in Somali goats*. Trop Anim Hlth Prod, 11: 211-212.
8. FAO/WHO (1986). *Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis*. WHO Technical Report, 6th report, Series No. 740, Geneva.
9. Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M. and Stich, R.W. (1992). *Amplification fragment length polymorphism*

- in brucella strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. J. Bacteriol, 174:7778-7783.*
10. Gaultney, J.B., Wende, R.D. and Willams, R.P. (1971). Microagglutination procedures for febrile agglutination tests. Appl Microbiol, 22: 635-640.
 11. Gaumont, R., Trap, D. and Garin, B. (1985). Assessment of EDTA seroagglutination test for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet. Rec, 117:444-445.
 12. Hennager, S.G., Harris, S.K., Ewalt, D.R. and Jarragin, J.L. (1983). Rapid identification of dominant brucella antigens using a microagglutination test. Am J Vet Res, 44: 2418-2419.
 13. Herr, S., Te Brugge, L.A. and Guiney, M.C.M. (1982). The value of the microtitre serum agglutination test as a second screening test in bovine brucellosis. Onderstepoort J Vet Res, 49:23-28.
 14. Huang, H.B. (1987). Use of a biotin-avidin ELISA for detecting brucellosis antibodies in sheep. Chinese J Vet Sci Tech, 10:3-7.
 15. İzgür, M., Akay, Ö., Arda, M. ve Erdeğer, J. (1992). Sığır brucellosis'inin teşhisinde EDTA ve 56 C'de aglutinasyon testlerinin kullanılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 39:191-200.
 16. Kızılyer, M. (1992). Koyunlarda brucella etkenlerine karşı oluşan antikorların çabuk lam aglutinasyon, rose bengal, makro-, mikro- aglutinasyon ve komplement fikzasyon testleri ile saptanması ve sonuçlarının karşılaştırılması. AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, (Basılmadı).
 17. McMahon, K.J. (1983). Comparison of the mercaptoethanol and dithiothreitol tests for determining brucella immunoglobulin G agglutinating antibody in bovine serum. Can J Comp Med, 47:370-372.
 18. Mittal, K.R. and Tizard, I.R. (1980). The microplate agglutination test: A simple technique to assist in the differentiation of bovine brucellosis and yersiniosis. Vet Rec, 106: 403-405.
 19. Mittal, K.R. and Tizard, I.R. (1981). Serological cross reactions between Brucella abortus and Yersinia enterocolitica serotype 0:9. Vet Bull, 51:501-505.
 20. 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 nonspecific agglutination. J Clin Microbiol, 14: 32-38.
 21. Okuno, T. and Kondelis, N. (1978). Evaluation of dithiothreitol (DTT) for inactivation of IgM antibodies. J Clin Pathol, 31: 1152-1155.
 22. Scheibner, E. (1976). Spezifitätsgrenzen de Brucellose, Langsam-agglutination. Berl Münch Tierärztl Wochenschr, 89:300-302.
 23. Tarım ve Orman Bakanlığı Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü (1982). Türkiye brucellosis mücadelesi projesi, Ankara.
 24. Thiange, P., Saegerman, C., Botton, Y. et Limet, J.N. (1992). Brucellose bovine: Le test d'agglutination en présence de facteur rhumatoïde après traitement du sérum par le dithiothreitol, dans la différenciation des animaux vaccinés et infectés. Ann Méd Vét, 136: 471-476.
 25. Trap, D., Garin, B., Moutou, F. et Gaumont, R. (1985). Brucellose bovine: Elimination des seroagglutinations non-spécifiques par l'emploi de l'EDTA et de l'agglutination a 56 C. Révue Méd Vét, 136: 399-409.
 26. Yardımcı, H. (1989). Koyunlarda Brucella melitensis infeksiyonlarının aglutinasyon, rose bengal ve ELISA testleriyle ortaya konması ve bu testlerin teşhisteki değeri üzerinde bir araştırma. AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü, Doktora Tezi, Ankara. (Basılmadı).