



Developing Lateral Flow Assay Based Rapid Diagnosis Kit For Serologic Diagnosis of Cattle Brucellosis

Osman Yaşar TEL Oktay KESKİN Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK

Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Şanlıurfa, Turkey

Received: 19.06.2017

Accepted: 10.10.2017

SUMMARY

Brucellosis caused by microorganisms of *Brucella* genus is a worldwide zoonotic infection seen in livestock and has serious risk for human and animal health and negative effect on animal production. The disease agents infect especially genital organs like uterus, testes, mammary glands and cause abortion and infertility in livestock. The aim of this study was to develop a rapid lateral flow test (LFT) for diagnosis cattle brucellosis. Sensitivity, specificity and diagnostic accuracy of LFT were evaluated by comparing the results with Rose Bengal Plate Test (RBPT), complement fixation test (CFT) and i-ELISA. Out of 91 serum samples 45 (49.5%), 44 (48.3%), 37 (40.7%) and 34 (37.4%) were found positive by RBPT, i-ELISA, CFT and LFT, respectively. Based on the results by CFT as reference test, sensitivity and specificity of LFT were found 92% and 100%, respectively. As conclusion, LFT and RBPT gave similar results and it was thought that LFT is an easy, rapid and specific screening test for diagnosis cattle brucellosis in the field.

Key Words: Lateral Flow Assay, Cattle, Serologic diagnosis, Brucellosis

ÖZET

Sığır Brusellozunun Serolojik Teşhisinde Lateral Flow Temelli Hızlı Tanı Kiti Geliştirilmesi

Bruselloz, sığır, koyun, keçi, domuz ve koç gibi çiftlik hayvanlarında brusella grubu mikroorganizmaların sebep olduğu özellikle, testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek, yavru atmalara ve infertiliteye neden olan dünyanın birçok ülkesinde görülen insan ve hayvan sağlığını tehdit eden ve hayvansal üretim üzerine negatif etkileri olan önemli bir zoonozdur. Bu çalışma ile sığır brusellozisinin serolojik olarak çabuk tanısında kullanılacak bir LFT (Lateral flow test)'i geliştirmek amaçlandı. LFT'nin sensitivite, spesifisite ve tanısal doğruluğu, RBPT (Rose Bengal Plate Test), KFT (Komplement Fiksasyon Test) ve i-ELISA ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. İncelenen 91 serum örneğinin 44 (%48.3)'ü i-ELISA ile 34 (%37.4)'ü LFT, 45'i (%49.5) RBPT ile 37 (%40.7)'si KFT ile pozitif olarak saptandı. Komplement fiksasyon testi referans test kabul edilerek, LFT'nin sensitivitesi %92 ve spesifitesi %100 olarak bulundu. Sonuç olarak, LFT'nin, sığır brusellozun serolojik teşhisinde sahada kolayca uygulanabilecek hızlı sonuç alınan spesifik bir test olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Lateral Flow Test, Sığır, Serolojik teşhis, Bruselloz

GİRİŞ

Bruselloz, gerek insan ve hayvan sağlığı, gerekse ekonomik kayıplar açısından dünyanın en yaygın zoonoz hastalıkları arasında sayılmakta ve ülkemizde de en önemli hastalıklar arasında bulunmaktadır. Bruselloz, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE) tarafından dünyanın en yaygın zoonozlarından biri olarak kabul edilmektedir (Corbel 1997; Greenfield ve ark. 2002; OIE 2009; Aydın 2012).

Brucella enfeksiyonunun laboratuvar tanısında serolojik, bakteriyolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Etken izolasyonun zor ve uzun sürmesi ve insanlara

bulaşma riskinin olması nedenleri ile teşhiste daha çok serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Hastalığın serolojik teşhisinde OIE tarafından önerilen testler, tarama testi olarak Rose Bengal pleyt test (RBPT) ve teyit edici olarak komplement fiksasyon testi (KFT)'dir (OIE 2009). Kullanılan diğer testler, indirekt ve kompetitif ELISA ve Floresan polarizasyon testleridir (Nicoletti 1969; Ruppner ve ark. 1980; Saravi ve ark. 1995; Nielsen 2002; McGiven ve ark. 2003; OIE 2009). Komplement Fiksasyon testi, altın standart olarak kabul edilen ve OIE tarafından önerilen resmi bir serolojik testtir. Ancak KFT için özel ekipman, deneyimli personel gerekmesi ve testin zorluğundan kaynaklanan nedenlerden dolayı, son yıllarda insan ve hayvan sağlığında brusellozun teşhisi için LFT'leri

başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Smits ve ark 2003; İrmak ve ark. 2004; Abdoel ve ark. 2008; Shome ve ark. 2015). Membran temelli Lateral Flow İmmunokromatografik testler, ilk olarak gebelik testi olarak geliştirilen, antijen-antikor ilişkisine dayanan saha kullanımına uygun hızlı tanı testleridir (Wong ve Tse 2009). Hızlı, spesifik deneyim ve ekipmana ihtiyaç göstermeyen, kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Beş µL serum örneği kullanılarak 10-15 dakika içinde sonuç alınabilmektedir. Son yıllarda LFT anthraks, PPR, bruselloz, tüberküloz gibi birçok hastalık için geliştirilmiştir (Abdoel ve ark. 2008; Kaewphinit ve ark. 2013; Cox ve ark 2015; Cheng ve ark. 2017).

Bu çalışmada, sığır brusellozunun hızlı tanısı amacıyla LFT'nin geliştirilerek, sonuçların KFT, i-ELISA ve RBPT ile karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Saha serum örnekleri

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı serum koleksiyonunda bulunan bruselloz yönünden KFT pozitif ve bazılarında etken izolasyonunun yapıldığı infekte sürülerden elde edilen 37 pozitif ve brusella infeksiyonu yönünden akredite ari sürülerden elde edilen 54 negatif olmak üzere toplam 91 adet sığır serumu Lateral Flow testinin sensitivite ve spesifitesinin saptanmasında kullanıldı.

i-ELISA ve LFT için Smooth Lipopolisakkarit (S-LPS) Antijeni hazırlanması

Brucella abortus S99 suşu serum dektroz agarın bulunduğu Roux şişelerine ekilip 5 gün süre ile 37°C'de inkübe edildi. Koloni formu kontrolü yapılarak, uygun bulunan kültürler fizyolojik tuzlu su içinde toplandı. Toplanan kültürler santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak, altta kalan sediment toplandı. Yaklaşık 50 gram ağırlığındaki bakteriyel miktarına 170 ml distile su katılarak elde edilen süspansiyon 66 °C'ye ayarlanmış su banyosunda inaktive edildi. Daha sonra 190 ml fenol (%90'lık v/v) katılarak, karışım 66 °C'de 15 dakika süre ile sürekli karıştırıldı ve 15.000 g'de 15 dakika süre ile santrifüj edildi. Altta kalan kahverengi fenol tabakası atılarak hücre debrisleri Whatman No:1 filtre kağıdından süzüldü. Smooth lipopolisakkarit (S-LPS) 500 ml soğuk metanolün katılması ile presipite edildi. Presipitat 10.000 g'de 10 dakika süre ile santrifüj edilmesinin ardından alınarak bu presipitata 80 ml distile su katıldı ve 18 saat süre ile karıştırıldı. Daha sonra 10.000 g'de 10 dakika süre ile santrifüje edilerek süpernatant 4 °C'de tutuldu. Presipitat 80 ml distile suda tekrar süspansiyon edildi ve 4 °C'de 2 saat daha karıştırılarak ve santrifüj ile elde edilen süpernatant ilk elde edilen süpernatant ile birleştirildi. Daha sonra elde edilen 160 ml LPS solüsyonuna 8 gram triklorasetik asit eklendi. Bu solüsyon 10 dakika karıştırıldıktan sonra santrifüj edilerek presipitat ayrıldı ve üstte kalan saydam solüsyon distile suya karşı dialize edilerek antijen olarak kullanıldı.

Serolojik Testler

RBPT: Alton ve ark. (1988)'nin bildirdikleri yöntemle yapıldı. Bunun için bir damla test serumu (30 µl) eşit miktarda RBPT antijeni ile plastik pleytlerde karıştırılarak sonuçlar 4 dakika içinde okundu. Karışımı takiben görülen herhangi bir derecedeki aglütinasyon pozitif olarak değerlendirildi.

Komplement Fiksasyon Testi (KF): Alton ve ark. (1988)'nin bildirdikleri yöntemle yapıldı. Veronal buffer solüsyonundan (VBS) mikroplyet üzerinde B ve H arasındaki kuyucuklara 25'er µl konuldu. Test edilecek

serum A, B ve H kuyucuklarına 25'er µl ilave edildi. Antijen A'dan G'ye kadar 25'er µl ve komplement de A'dan H'ye kadar olan kuyucuklara 25'er µl konuldu. Mikroplyetler bir gece +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün koyun eritrositleri (%2) ve amboseptörden oluşan hemolitik sistem A'dan H kuyucuğuna kadar 50'şer µl ilave edildi ve 37 °C'de yarım saat inkübasyona tabi tutuldu. Ayrıca mikroplyet 45-90 dk süre aralığında +2/+8 °C'de bekletildi. Mikroplyetin kuyucuklarında meydana gelen lizise göre pozitiflik saptandı. KFT için mililitresinde 20 ve üzeri uluslararası komplement fiksasyon test birimi (UKFTB) içeren serum dilüsyonları pozitif olarak kabul edildi.

i-ELISA: i-ELISA için antijen olarak *B. abortus* S99 susundan elde edilen LPS antijen olarak kullanıldı. Kullanılacak antijen ve konjugatın optimum dilüsyonları belirlendi. Bunun için karşılıklı titrasyonları yapıldı; pozitif ve negatif serum arasında en büyük farkı oluşturan dilüsyonlar optimum olarak seçildi. Hazırlanan ELISA solid faz antijeni, antijen kaplama tampon solüsyonu (0.05M sodyum karbonat, pH 9.6) ile, konsantrasyonu antijen ve konjugat dilüsyonlarının optimizasyonunda belirlenen oranda olacak şekilde sulandırıldı ve 96 gözlü düz tabanlı polistiren pleytlerin (NUNC 692620) tüm kuyucuklarına 100 µl olarak taksim edildi ve pleytler 4 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. Pleytler %0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) ile 5 kez yıkandı. PBS/T içinde 1/100 oranında dilüsyonları yapılmış pozitif ve negatif serumlar 100 µl olarak her serum numunesinden ikişer kez olmak üzere pleyte konuldu ve pleytlerin üstü kapalı olarak oda ısısında 1 saat süre ile inkübasyonları yapıldı. Pleytler tekrar 5 kez yıkandıktan sonra horseradish peroxidase ile işaretlenmiş protein A/G konjugatı belirlenen oranda PBS/T içinde sulandırılarak tüm kuyucuklara 100'er µl olarak ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler tekrar 5 kez PBS/T ile yıkandı ve üzerine 100 µl kromojenik substrat (pH 4.5 olan 0.05 M sitrat tamponu içinde OPDS tabletler-Sigma) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10-15 dakika bekletildikten sonra otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 450 nm'de absorbans değerleri okundu. Testin eşik değeri negatif serum optik değer ortalamasına 3 standart sapma eklenerek belirlendi.

Lateral Flow Testi: Bu test, aşağıda aşamaları anlatıldığı şekilde uygulandı.

Kolloidal goldun hazırlanması: 5 ml %1'lik hydrogen tetrachloroaurate trihydrate (SIGMA-ALDRICH) solüsyonu 500 ml distile su ile karıştırılarak kaynatılana kadar ısıtıldı. Beş ml yeni hazırlanmış %1'lik sodyum sitrat solüsyonu gold solüsyonuna katıldı ve renk kırmızıya dönünceye kadar kaynatıldı ve 5 dakika daha kaynatıldıktan sonra solüsyon 4 °C'de siyah renkli bir şişe içerisinde saklandı (Frens 1973).

Kolloidal gold problemlerinin hazırlanması: Optimum konsantrasyonu belirlenerek uygun oranda sulandırılan tavşanda hazırlanmış anti-sığır IgG (H+L) antikorları kolloidal gold solüsyonuna eklenerek karıştırıldı ve oda ısısında 20-40 dakika inkübe edildi. Daha sonra sodyum borat içerisinde hazırlanan %10 (w/v) BSA 1/10 oranında eklenerek oda ısısında 10-15 dakika bekletildi. Karışım 15.000 g'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra pelet sodyum borat ile süspansiyon edilerek konjugat olarak kullanıldı.

İmmunokromatografik test sitriplerinin hazırlanması: LFT için farklı reagentlar için farklı porozitedeki pedler birleştirildi. Bu amaçla örnek uygulama pedi, kolloidal gold konjugatı içeren konjugat pedi, test ve kontrol hatlarını

bulunduran nitroselüloz membran ve bir absorban ped kullanıldı. Konjugat ped için glass fiber membran kullanılırken, örnek ve absorban ped içinse selüloz membran kullanıldı. Çeşitli por çaplarındaki nitroselüloz membranlar denenerek uygun olan membrana karar verildi. Glas fiber pede konjugat, nitroselüloz membrana test çizgisi için Brucella-LPS antijeni, kontrol çizgisi için sığır IgG antikoları (SIGMA) uygulandıktan sonra kurutuldu. Daha sonra bu pedler ve membran birleştirilerek kesildi ve elde edilen stripler uygun plastik kasetlere yerleştirilerek kullanıma hazır hale getirildi.

LFT'nin uygulanması: Örnek pedine 10µl serum uygulandı. Serumun kapillar difüzyon ile konjugat pedi boyunca yayılması ve gold konjugatı rehidre ederek, konjugat ile etkileşime girmesi için 1 dakika beklendi. 130 µl koşturma sıvısı eklenip, gold konjugat ve serumdaki antikoların kontrol ve test hatlarına doğru ilerlemeleri sağlanarak test gerçekleştirildi. Pozitif sonuçta belirgin iki kırmızı-mor çizgi oluşurken, negatif sonuçta tek bir kırmızı-mor çizgi görüldü (Şekil 1).

İstatiksel analiz : LFT'nin sensitivite ve spesifitesi KFT gold standart kabul edilerek hesaplandı (Saha ve ark. 2010).

Tablo 1. LFT ve konvansiyonel serolojik test sonuçları

Table 1. LFT and conventional serological test results

Test Sonucu	RBPT n (%)	KFT n (%)	LFT n (%)	i-ELISA n (%)
Pozitif	45 (49.5)	37 (40.7)	34 (37.4)	44 (48.3)
Negatif	46 (50.5)	54(59.3)	57(62.6)	47 (51.7)
Toplam	91 (100)	91 (100)	91 (100)	91(100)

Tablo 2. Test edilen serumların serolojik testlere verdiği yanıtlar

Table 2. Responses of test sera in serological tests

Serum sayısı	RBPT	i-ELISA	KFT	LFT
44	-	-	-	-
34	+	+	+	+
5	+	+	-	-
3	+	-	-	-
3	+	+	+	-
2	-	+	-	-

Tablo 3. Çalışmada kullanılan serolojik testlerin sensitivite ve spesifitelerinin karşılaştırılması

Table 3. Comparison of sensitivity and specificity of the serological tests used in the study

Serolojik testler	Sensitivite (%)	Spesifite (%)
RBPT	100	87
i-ELISA	100	88
LFT	92	100



Şekil 1. Lateral flow testi a. Negatif sonuç b. Pozitif sonuç

Figure 1. Lateral Flow test a. Negative result b. Positive result

BULGULAR

Çalışmada kullanılan 91 adet kontrol serumu optimum miktarlarda antikor ve antijen ile hazırlanan LFT stripleri yanında i-ELISA, RBPT ve KFT ile test edildi. İncelenen 91 serum örneğinin 44 (%48.3)'ü i-ELISA ile, 45 (%49.5)'i RBPT ile, 37 (%40.7)'si KFT ile, 34 (% 37.4)'ü LFT ile pozitif sonuçlar verdi (Tablo 1).

Çalışmada kullanılan 44 serum tüm testler ile negatif bulunurken 34 serum örneği tüm testler ile pozitif bulundu. Üç serum örneği sadece RBPT ile ve 2 serum örneği sadece i-ELISA ile pozitif yanıt verirken 3 serum örneği LFT hariç diğer testlerin tümü ile pozitif yanıt verdi (Tablo 2).

Çalışmada, RBPT ve i-ELISA'nın sensitivitesi %100 bulunurken LFT'nin %92 bulundu. Bunun yanında LFT'nin spesifitesi %100 bulunurken RBPT ve i-ELISA'nın spesifitesi sırasıyla %87 ve %88 olarak bulundu (Tablo 3).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bruselloz dünyanın birçok ülkesinde görülen insan ve hayvan sağlığını yakından ilgilendiren bulaşıcı, akut, subakut veya kronik seyirli zoonoz bir enfeksiyöz hastalıktır. Ekonomik yönden yavru atma, perinatal mortalite, infertilite, süt ve et üretiminde azalma, tıbbi harcamalar, gibi nedenlerle hayvancılık endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Alton 1990). Bunun yanında bruselloz, insanlara da bulaşarak önemli bir halk sağlığı problemi de oluşturmaktadır (Yüce ve Alp-Çavuş 2006; TC Sağlık Bakanlığı 2014). LFT, ekipman ve deneyim gerektirmeden kolayca uygulanabilecek bir testtir. Bu test buzdolabına ihtiyaç duymadan uzun süre saklanabilir. Sonuçlar hemen çıplak gözle görülmektedir. Bu çalışmada laboratuvarında hazırlanan LFT'nin, KFT, i-ELISA ve RBPT ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışmada incelenen sığır serum örneklerinden 7 serum örneği i-ELISA ile, 8 serum örneği RBPT ile pozitif olarak belirlenirken, bu serumlar KFT'de negatif olarak belirlendi. Öte yandan 11 serum örneği RBPT ve 10 serum örneği i-

ELISA'da pozitif saptanırken, bu serumlar LFT ile negatif bulundular. Bu serumların daha spesifik olan KFT ve LFT'de negatif olarak saptanmasının nedeni, RBPT ve i-ELISA gibi yüksek sensitiviteye sahip olan testlerde diğer bakterilerden kaynaklanan (*Yersinia enterocolitica* O:9, *E. coli* O116:H21, O157:H7, *Francisella tularensis*, kauffman-white grup N *Salmonella* türleri, *Pseudomonas maltophilia* ve *Vibrio cholerae*) çapraz reaksiyonların daha fazla saptanabilmesidir. i-ELISA ve LFT sonuçları arasındaki bu farklılığın ise bu testlerde antijen olarak kullanılan LPS molekülünün solid yüzeylere bağlanma özelliklerinin farklı olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, i-ELISA testi antikorların bütün sınıflarını, RBPT hem IgG hem de IgM antikorlarını saptayabilmektedir. Bu nedenle bu testlerin sensitivitesi yüksek olarak görülmekle birlikte spesifitesi sınırlıdır (Alton ve ark. 1988; Blasco 1994; OIE 2009). Bu çalışmada da benzer bir şekilde, i-ELISA ve RBPT'nin sensitivitesi %100 olarak bulunurken LFT'nin sensitivitesi %92 olarak bulundu. Bunun yanında, LFT nin spesifitesi %100 bulunurken, i-ELISA ve RBPT'nin spesifitesi sırası ile %88 ve %87 olarak saptandı. Abdoel ve ark. (2008), sığır brusellozunun serolojik teşhisinde LFT geliştirdikleri çalışmada testin %90 sensitivite ve yüksek spesifiteye sahip olduğunu, Smits ve ark. (2003), insanlar için immunokromotografik test geliştirdikleri çalışmada da testin %96 sensitivite ve %99 spesifiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların bildirdiği bulgular ile bu çalışmada elde edilen bulgular oldukça benzerdir. RBPT'in LFT ile aynı sürelerde sonuç vermesine rağmen, yüksek spesifitesi nedeni ile LFT'nin tercih edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Zira, LFT de kullanılan antijen LPS iken, RBPT'de tüm bakteridir. Bu da yanlış pozitifliklerin LFT de daha az görülmesinin nedenidir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada (Shome ve ark. 2015) LFT'nin sensitivitesini %87.1 ve spesifitesini %92.6 olarak bulunmuştur. Nijerya'da yapılan bir çalışmada (Kaltungo ve ark. 2013), araştırmacılar RBPT, SAT-EDTA ve LFT kullanarak brusellozun seroprevalansını sırası ile %25.8, %11.1 ve %2.5 olarak bulmuşlardır. Görüldüğü üzere LFT diğer testlerden daha az duyarlı görülmekle beraber bunun derecelerinde olan farklılık muhtemelen kullanılan antijenin tipi, saflık derecesi ve membrana bağlanma kapasitesi ile yakından ilişkilidir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, serum örneklerinin incelenmesi sonucunda, KFT'ine göre LFT'nin spesifitesi %100 ve sensitivitesi %92 olarak bulundu. LFT'in kolay uygulanabilirliği ve 5-10 dakika gibi kısa sürede hızlı sonuç vermesi, diğer testlere göre daha ucuz olması, veteriner klinikleri ya da köy koşullarında bir damla serum ile brusellozun tanısını kısa sürede koyabileceği ve RBPT'ine alternatif bir test olarak brusellozun teşhisinde sahada kullanılabileceği sonucuna varıldı. LFT'nin kullanılması sonucunda da hayvanlarda kolay ve ucuz olarak hastalığın teşhis edilmesi ile bir an önce gerekli kontrol tedbirlerin alınması olanak vereceği, bu nedenle gerek hayvan, gerekse insan sağlığı açısından önem taşıdığı kanaatine varıldı.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Harran Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 14129 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdoel T, Dias IT, Cardoso R, Smits HL (2008). Simple and rapid field tests for brucellosis in livestock. *Vet Microbiol*, 30(3-4), 312-319.
- Alton GG (1990). *Brucella melitensis*. In: Animal Brucellosis, Nielsen K, Duncan JR (Eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 383-409.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Inra, Paris; pp 63-136.
- Aydın E (2012). Brusella Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi. IV. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu (Gıda Kaynaklı Zoonozlar), Sempozyum kitabı, 57-62.
- Blasco JM, Garin-Bastuji B, Marin CM, Gerbier G, Fanlo J, Jimenez De Bagues MP, Cau C (1994). Efficacy of different rose bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Rec*, 134, 415-420.
- Cheng S, Sun J, Yang J, Lv J, Wu F, Lin Y, Liao L, Ye Y, Cao C, Fang L, Hua Q (2017). A new immunoassay of serum antibodies against peste des petits ruminants virus using quantum dots and a lateral-flow test strip. *Anal Bioanal Chem*, 409(1), 133-141.
- Cox CR, Jensen KR, Mondesire RR, Voorhees KJ (2015). Rapid detection of *Bacillus anthracis* by γ phage amplification and lateral flow immunochromatography. *J Microbiol Methods*, 118, 51-56.
- Corbel MJ (1997). Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis*, 3(2), 213-221.
- Frens G (1973). Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*, 241(105), 20-22.
- Greenfield RA, Drevets DA, Machado LJ, Voskuhl GW, Cornea P, Bronze BS (2002). Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. *Am J Med Sci*, 323, 299-315.
- Irmak H, Buzgan T, Evirgen O, Akdeniz H, Demiroz AP, Abdoel TH, Smits HL (2004). Use of the *Brucella* IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis. *Am J Trop Med Hyg*, 70, 688-694.
- Kaewphinit T, Arunrut N, Kiatpathomchai W, Santiwatanakul S, Jaratsing P, Chansiri K (2013) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick in clinical samples. *Biomed Res Int*. Vol: 2013, ID: 926230, 1-6.
- Kaltungo BY, Saidu SNA, Sackey AKB, Kazeem HM (2013). Serological evidence of brucellosis in goats in Kaduna North senatorial district of Kaduna State, Nigeria. *ISRN Veterinary Science*, Vol: 2013, ID: 963673, 1-6.
- McGiven J, Tucker J, Perrett L, Stack J, Brew S, MacMillan A (2003). Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *J Immunol Methods*, 278(1), 171-178.
- Nicoletti P (1969). Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. *Amer J Vet Res*, 30(10), 1811-1816.
- Nielsen K (2002). Diagnosis of Brucellosis by serology. *Vet Microbiol*, 90(1), 447-459.
- OIE (2009). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Sixth Edition, Caprine And Ovine Brucellosis Page:1022-1030.
- Ruppanner R, Meyer M, Willeberg P, Behymer D (1980). Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay with other tests for Brucellosis, using sera from experimentally infected heifers. *Am J Vet Res*, 41(8), 1329-1332.
- Saha PK, Ali MH, Rahman MB, Islam MA (2010). Determination of sensitivity and specificity of in-house sandwich ELISA for the detection of infectious bursal disease viruses. *Bangl J Vet Med*, 8(2), 97-106.
- Saravi MA, Wright PF, Gregoret RJ, Gall DEJ (1995). Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Vet Immunol and Immunopathology*, 47(1), 93-99.
- Shome R, Filia G, Padmashree BS, Krithiga N, Sahay S, Triveni K, Rahman H (2015). Evaluation of lateral flow assay as a field test for investigation of brucellosis outbreak in an organized buffalo farm: A pilot study. *Veterinary world*, 8(4), 492-496
- Smits HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Diaz R (2003). Immunochromatographic *Brucella*-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10, 1141-1146.
- T.C. Sağlık Bakanlığı (2014). 2004-2006 İstatistikler / Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü çalışma yıllığı. <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-2952/istatistik-yilliklari.html>, Erişim tarihi: 18.03.2014.
- Wong R C, Tse HY (2009). Lateral Flow Immunoassay. Humana Press. New York, USA.
- Yüce A, Alp-Çavuş S (2006). Türkiye'de bruselloz: Genel bakış. *Klin Derg*, 19(3), 87-97.