

Sığır ve koyun brusellozisinin serolojik teşhisinde konvansiyonel testler ile Kompetitif-ELISA'nın karşılaştırılması*

Asiye DAKMAN¹, Uğur KÜÇÜKAYAN², Ufuk ÜLKER², H. Kaan MÜŞTAK²

Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, ¹Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı; ²Yetiştirme Hastalıkları Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 03.11.2010, Kabul Tarihi / Accepted: 29.12.2010

Özet: Bu çalışmada *Brucella* S19 genç aşısı ile aşılanan danalar ile *Brucella* spp. ile infekte sığırlar ve *Brucella* Rev1 genç aşısı ile aşılanmış kuzular ile *Brucella* spp. ile infekte koyunlara ait kan serumları; konvansiyonel testler ve Kompetitif-ELISA (C-ELISA) ile incelenerek, oluşan humoral immun yanıt değerlendirilmiştir. Doğal infekte sığırların %94'ü Rose Bengal Plate Test (RBPT), %98'i Serum Aglutinasyon Test (SAT), %92'si Komplement Fiksasyon Test (CFT) ve %95'i C-ELISA ile pozitif bulunmuştur. Aşı yapılan danalara ait antikor titrelerinde test zamanlarına göre testler arasında farklılıklar meydana gelmiştir. Doğal infekte koyunların %91.16'sı RBPT, %91.16'sı SAT, %85.63'ü CFT ve %86.74'ü C-ELISA ile pozitif bulunmuştur. Sonuç olarak brusellozisin teşhisinde, C-ELISA'nın özellikle CFT'ye alternatif olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Brucella*, Kompetitif-ELISA, koyun, sığır.

Comparison of conventional tests with Competitive-ELISA in serological diagnosis of bovine and ovine brucellosis

Summary: In this study, blood sera from calves vaccinated with *Brucella* S19 vaccine and cattle infected by *Brucella* spp. and lambs vaccinated with *Brucella* Rev1 vaccine and sheep infected by *Brucella* spp. were tested with conventional tests and Competitive-ELISA (C-ELISA) in order to evaluate the humoral immune response. In naturally infected cattle group, 94% with Rose Bengal Plate Test (RBPT), 98% with Serum Agglutination Test (SAT), 92% with Complement Fixation Test (CFT) and 95% with C-ELISA were found positive. Differences between the tests were found in antibody titers on the basis of testing times. In naturally infected sheep group, 91.16% with RBPT, 91.16% with SAT, 85.63% with CFT and 86.74% with C-ELISA were found positive. It was concluded that, in the diagnosis of brucellosis C-ELISA could be used as an alternative test especially to CFT.

Key words: *Brucella*, cattle, Competitive-ELISA, sheep.

Giriş

Brusellozis dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak görülen ve ekonomik öneme sahip olan zoonoz bir hastalıktır. Hastalığa *Brucella* genusu içerisinde yer alan türler neden olmaktadır. Bu türler arasında bulunan *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. canis* ve *B. suis* hayvanlarda görülen önemli brusellozis etkenleridir.

Brusellozisin kesin teşhisi etken izolasyonu ve identifikasyonuna bağlıdır. Ancak etkenin hücre içi yerleşmesi, izolasyonunun uzun zaman alması, çok sayıda hayvan söz konusu olduğunda pratik olmasından dolayı, serolojik testler rutin teşhiste daha çok tercih edilmektedir (3, 5, 6).

Brucella infeksiyonlarına karşı primer immun yanıt, IgM sınıfı antikorların üretilmesiyle sekonder immun yanıt ise IgG'lerin ortaya çıkmasıyla karakterizedir. SAT ile nötral veya hafif düşük pH'da aktif aglutininlerin en önemli kısmını teşkil eden IgM'lerin varlığı ortaya konulurken, RBPT ile hem IgM hem de IgG'ler reaksiyona girer. CFT'de ise rol oynayan antikorlar IgG₁'lerdir IgM'lerin etkinliği inaktivasyon derecesinden dolayı azdır(12, 14).

Primer bağlanma testlerinden biri olan C-ELISA; antijenle kaplı mikroplyete test edilecek serum ile Monoklonal antikor (Mab) ilave edilerek serumda bulunan antikorlar ile Mab'ın yarışması, antijen-antikor kompleksine enzimle işaretli anti-mouse antikorlarının bağlanması ve reaksiyonun substrat ilavesi ile renklendirilmesi esasına dayanmaktadır.

Yazışma adresi / Correspondance: Asiye Dakman, Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kanatlı Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, 06020, Ankara, Türkiye. E-posta: asiyedakman@hotmail.com

* Bu çalışma TAGEM tarafından TAGEM/HS/01/02/05/101 no'lu proje ile desteklenmiştir.

C-ELISA'da O-polisakkarit için spesifik Mab kullanıldığı için indirekt ELISA ya göre daha spesifik olduğu bildirilmiştir (10,13,16). ELISA'da kullanılan lipopolisakkarit antijeni polisiteren matrikse lipid A ucundan bağlandığı, antijen olarak o-polisakkarit seçildiğinde ise matrikse bağlanmanın epitop1, epitop2 ya da her iki ucundan birlikte gerçekleştiği bildirilmiştir (13). Bu şekilde ortamda antijenin antikor ile bağlanmaya hazır epitop2 ucu daha fazla bulunur. Brucella S19 aşısı ile aşılanmış hayvanlarda epitop1'e karşı oluşan antikorlar büyük bir kısmını teşkil ederken doğal infekte hayvanlarda ise hem epitop1 hem de epitop 2ye karşı oluşan antikorlar bulunmaktadır. Bu nedenle aşılanmış hayvanlarda oluşan antikorların Mab ile yarışması ve bağlanma affinitesi göstermesi zordur. Ancak infekte hayvanlar antijene bağlanma affinitesi gösterir ve MAb ile yarışabilirler (13).

Her bir serolojik testin farklı immunglobulinleri tespit etmesi, aşından kaynaklanan immun yanıt ile doğal enfeksiyonun karışabilmesi, inkübasyon döneminde etkene karşı immun yanıtın oluşmaması ve brusella ile diğer bakterilerin kros-reaksiyon verebilmesi gibi olumsuzlukların üstesinden gelebilmek için günümüze kadar birçok farklı serolojik yöntem geliştirilmiş ve bazılarının tanıda birlikte kullanılması öngörülmüştür (2, 5, 6, 8).

Office International des Epizooties (OIE)'de sığırların brusellozisinini teşhisinde kullanılan testler arasında standart test olarak kabul edilen CFT'nin yanı sıra C-ELISA'da bulunmaktadır. C-ELISA yöntemi;

CFT'den çok daha kolay uygulanabilir olması, kısa sürede çok daha fazla serum örneğinin test edilmesine olanak tanınması, aşılamalardan kaynaklanan yalancı pozitifliklerin eliminasyonunu sağlaması ve diğer bakterilerden ileri gelen kros-reaksiyonların çoğunu önlemesi nedeniyle rutin olarak kolaylıkla kullanılabilir (3, 5, 6, 10, 16).

Bu çalışmada sığır ve koyun brusellozisinin serolojik tanısında rutin olarak kullanılan CFT, SAT ve RBPT ile C-ELISA testinin karşılaştırılması; aşılanmış sığır ve koyunlar ile doğal infekte hayvanların ayırt edilmesinde C-ELISA'nın rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Serum grupları: Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne gelen atık yaptıkları yavrularından *B. abortus* izole edilen 26 adet sığır ve *B. melitensis* izole edilen 29 adet koyuna ait kan serum örnekleri standart pozitif grup olarak kabul edildi.

Brusellozis öyküsü olmayan, düzenli sağlık kontrolleri yapılan ve hayvan hareketlerinin takip edildiği, bruselladan arı sığır ve koyun sürülerinde bulunan 6 aylık, 28 adet aşısız dana ile 6 aylık, 32 adet aşısız kuzuya ait kan serum örnekleri standart negatif grup olarak kullanıldı.

Doğal infekte sığır ve koyun grupları ise pozitif gruptaki hayvanlar ile *Brucella* spp. ile infekte sürülerde atık yapmış hayvanlardan oluşturuldu (Tablo 1).

Tablo 1. Doğal infekte sığır ve koyunlardan toplanan kan serum sayısı

	Doğal infekte sığırlar	Doğal infekte koyunlar	Toplam
Atıklarından <i>Brucella</i> spp. izole edilen hayvanlar	26	29	55
İnfekte sürüde atık yapmış hayvanlar	94	152	246
Toplam	120	181	301

Aşılanmış grupların oluşturulması için seçilen dana ve kuzulara, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nün ürettiği ve Türkiye'de halen kullanılan aşılar uygulandı. Bu amaçla, Polatlı Tarım İşletmesi'nden alınan 6 aylık 29 adet dana, genç *Brucella* S19 canlı aşısı ile deri altı olarak; yine aynı işletmeden alınan 6 aylık 32 adet kuzu ise genç *Brucella* Rev1 canlı aşısı ile deri altı olarak aşılanarak aşılanmış gruplar oluşturuldu.

Hem sığır hem de koyunlarda aşı yapılan ilk gün 0 kabul edilerek; 0, 21, 45, 90, 120, 180 ve 270'inci günlerde kan serum örnekleri toplanarak değerlendirildi. Pozitifliği devam eden hayvanlardan 2 ayda bir kan serum örneği alınarak 1 yıl süre ile takip edildi.

Rose Bengal Plate Test (RBPT) ve Serum Aglutinasyon Testi (SAT): Her iki testte kullanılan antijenler, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma

Enstitüsü'nden temin edildi. Testler kan serum örneklerine, Alton ve ark. (3)'ün bildirdiği şekilde uygulandı. RBPT'de 4-5 dakika içinde oluşan aglutinasyon pozitif, homojen görüntü negatif olarak kabul edildi. SAT'ta ise sığırlarda 1/40, koyunlarda 1/20 “++” ve üstü pozitif olarak değerlendirildi (4).

Komplement Fikzasyon Testi (CFT): Antijen olarak; Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen ve *Brucella abortus* S99 suşundan hazırlanan tüp aglutinasyon test antijeninin tuzlu su ile 3 defa yıkanarak fenolünün giderilmesiyle elde edilen antijen kullanıldı. Testte kullanılan komplement ve amboseptor, Alton ve ark. (3)'ün bildirdiği yöntemle göre hazırlandı. Test OIE (5) ve Alton ve ark. (3)'ün bildirdiği yöntemle göre uygulandı. Sığırlarda 1/10 “++” ve üstü koyunlarda ise 1/5 dilusyonda “++” lık değer pozitif olarak değerlendirildi (4).

Kompetatif-ELISA (C-ELISA): *Brucella abortus* smooth lipopolisakkarit (sLPS) antijeniyle kaplanmış 96 gözlü mikrotiter pleyt kullanılan ticari kit (Svanova Biotech) ile prosedürüne uygun olarak yapıldı. Antijen kaplı pleyte, önce serum örnekleri daha sonra spesifik monoklonal antikorlar ilave edilerek oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında pleytler iyice yıkanarak bağlanmayan antikorlar ortamdan uzaklaştırıldı. Pleyte enzimle işaretli anti-mouse IgG antikor konjugatı konularak oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Yıkama işleminin ardından reaksiyonu görüntülemek amacıyla substrat konuldu ve reaksiyon stop solusyonu ile durdurularak ELISA okuyucuda 450 nm'de okundu. PI (Percent Inhibition) değeri \geq %30 pozitif, $<$ %30 ise negatif kabul edildi.

İstatistiksel değerlendirme: Analizlerde COCHRAN Q testi kullanıldı. İstatistiksel önemliliklerin

değerlendirilmesinde χ^2 (Ki-kare) dağılımı, farklı yöntemlerin tespitinde de güven aralıklarından yararlanıldı (1).

Bulgular

Sığır kan serumlarının değerlendirilmesi: Standart pozitif ve standart negatif gruplarda CFT ve C-ELISA'dan tam olarak aynı sonuçlar elde edildi. Bununla birlikte C-ELISA testinin spesifitesi ve sensitivitesi ise %100 bulundu. Doğal infekte sığırlardan elde edilen sonuçlar Tablo 2'de gösterilmiş olup, bu grupta yer alan ve *Brucella* spp. izole edilen sığırların tamamı, bütün testlerde pozitif sonuç elde edildi.

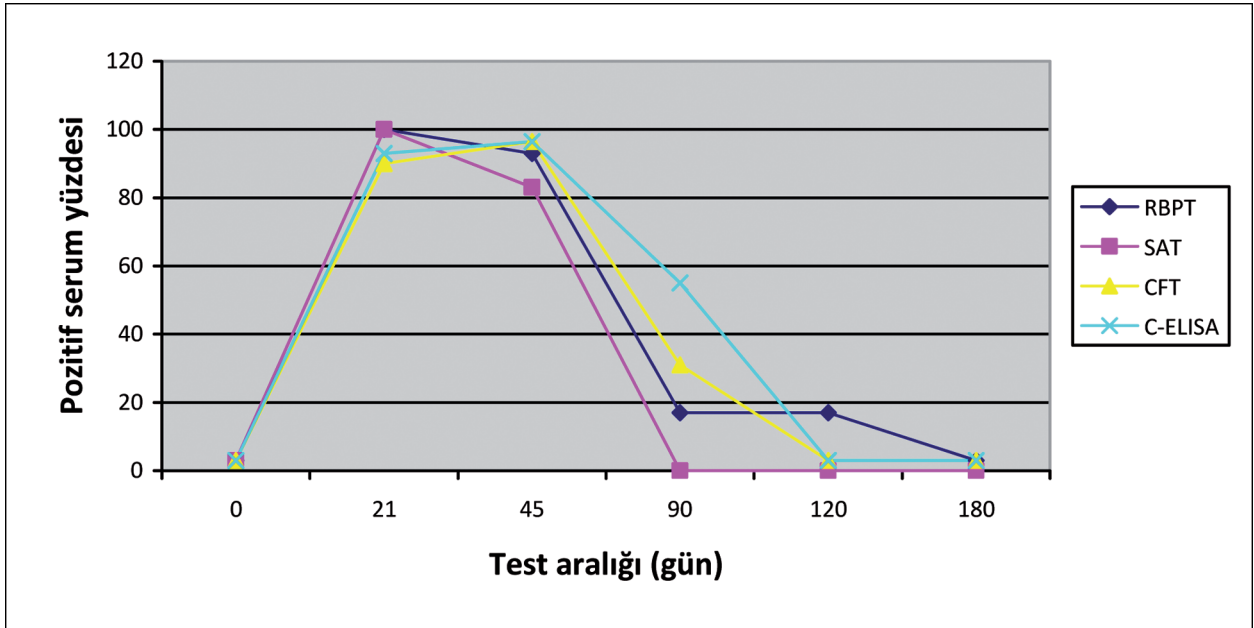
Tablo 2. Doğal infekte sığır grubuna ait pozitif sonuçlar (%).

	RBPT	SAT	CFT	C-ELISA
Doğal infekte sığırlar (n: 120)	113 (%94)	117 (%98)	110 (%92)	114 (%95)

Aşılı sığırların kan serum örneklerinden elde edilen sonuçlar Tablo 3'de ve Şekil 1'de karşılaştırılmalı olarak gösterildi. Bu sonuçlara göre 0'ıncı günde 1 hayvanda maternal antikor varlığı tespit edildi. Bütün aşılı sığırlar içerisinde ise sadece 1 hayvanda, bütün testlerde pozitifliğin 1 yıl boyunca devam ettiği görüldü. Aşılı sığırlarda sadece 90'ıncı ve 120'nci günlerde, testler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Yapılan Ki kare testi ile CFT ve C-ELISA arasında bu günlerde fark yok iken diğer testlerde ise fark istatistiksel olarak önemli bulundu.

Tablo 3. Aşılı sığır grubuna ait pozitif sonuçlar.

	0'ıncı gün	21'inci gün	45'inci gün	90'ıncı gün	120'nci gün	180'inci gün	270'inci gün
RBPT	%3	%100	%93	%17	%17	%3	%3
SAT	%3	%100	%83	%0	%0	%0	%0
CFT	%3	%90	%96.5	%31	%14	%3	%3
C-ELISA	%3	%93	%96.5	%55	%14	%3	%3



Şekil 1. Aşılı sığır grubuna ait pozitif sonuçların grafik gösterimi.

Koyun kan serumlarının değerlendirilmesi: Standart pozitif ve standart negatif gruplarda CFT ve C-ELISA sonuçları tam olarak benzer sonuçlar alındı. C-ELISA testinin spesifite ve sensitivitesi ise %100 bulundu. Doğal infekte koyunlardan elde edilen sonuçlar Tablo 4’de ve Şekil 2’de gösterilmiş olup, bu grupta yer alan ve *Brucella melitensis* izole edilen koyunların tamamından, bütün testlerle pozitif sonuç elde edildi.

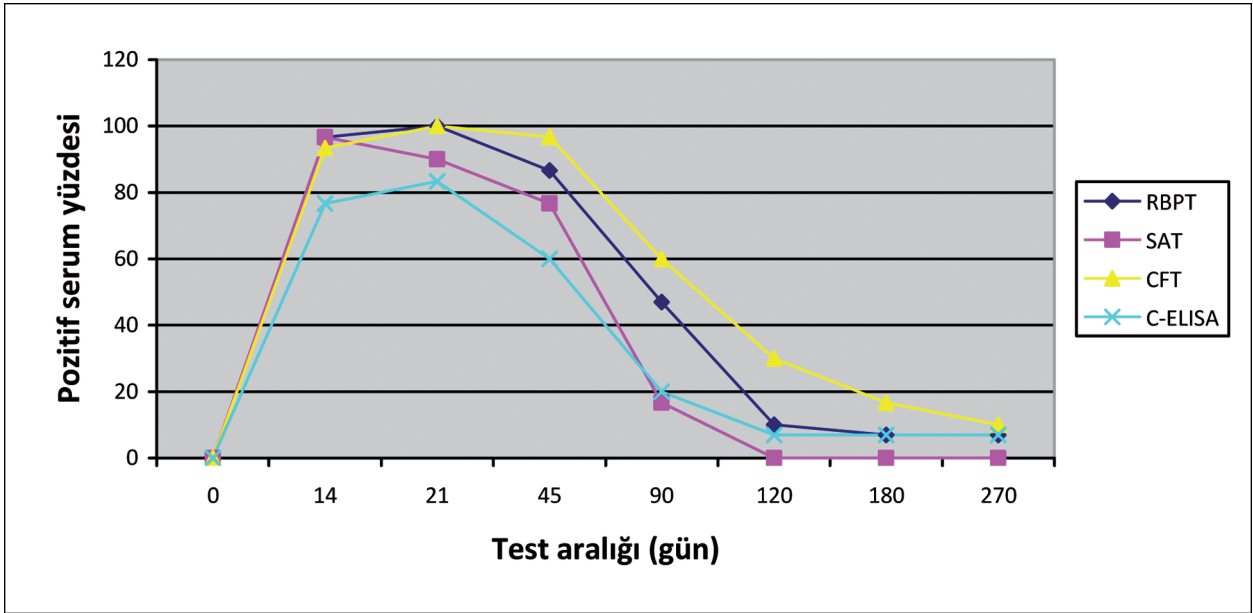
Tablo 4. Doğal infekte koyun grubuna ait pozitiflik sonuçlar (%).

	RBPT	SAT	CFT	C-ELISA
Doğal infekte koyunlar (n: 181)	165 (%91.16)	165 (%91.16)	155 (%85.63)	157 (%86.74)

Çalışmada aşılı koyunlar sığır grubundan farklı olarak daha kısa aralıklarla daha uzun bir süre takip edildi. Aşılı koyunların ikisine ait kan serumundaki anti-komplementer özellikten dolayı CFT’leri değerlendirilemedi. Bu nedenden dolayı aşılı koyunların istatistiksel çalışmaları 30 hayvan üzerinden değerlendirildi. Aşılı koyunların ikisinde ise pozitifliğin bir yıl süreyle devam ettiği görüldü. İstatistiksel olarak, 45’inci günde RBPT ve CFT ile C-ELISA arasındaki fark önemli bulundu ($p<0.05$). 90’uncu günde SAT ve C-ELISA ile RBPT arasındaki fark; SAT ve C-ELISA ile CFT arasındaki fark önemli bulundu ($p<0.05$). 120’inci günde ise RBPT ile CFT, SAT ile CFT, CFT ile C-ELISA arasındaki farklar önemli bulunurken ($p<0.05$). 180’inci günde SAT ile CFT arasındaki farklar da önemli bulundu ($p<0.05$). Aşılı koyunlara ait sonuçlar Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 5. Aşılı koyun grubuna ait pozitif sonuçlar.

	0’inci gün	14’üncü gün	21’inci gün	45’inci gün	90’uncu gün	120’inci gün	180’inci gün	270’inci gün
RBPT	%0	%96.66	%100	%86.66	%47	%10	%7	%7
SAT	%0	%96.66	%90	%76.66	%16.66	%0	%0	%0
CFT	%0	%93.33	%100	%96.76	%60	%30	%16.66	%10
C-ELISA	%0	%76.66	%83.33	%60	%20	%7	%7	%7



Şekil 2. Aşılı koyun grubuna ait pozitif sonuçların grafik gösterimi.

Tartışma ve Sonuç

Ülkemizde 1984 yılından beri Brusellozis Mücadele Programı uygulanmaktadır. Mücadele programı gereği 3-8 aylık danalar *Brucella* S19, 3-8 aylık koyunlar ise *Brucella* Rev1 aşısı ile aşılanmaktadır. Bu çalışmada *Brucella* S19 genç aşısı ile aşılanan danalar ile *Brucella* spp. ile infekte sığırlar ve *Brucella* Rev1 genç aşısı ile aşılanmış koyunlar ile *Brucella* spp. ile infekte koyunlara ait kan serumları RBPT, SAT, CFT ve C-ELISA ile test edilerek hayvanlardaki humoral immün yanıt değerlendirildi.

B. abortus izole edilen sığırların bulunduğu sürülerde atık yapmış hayvanların %94'ü RBPT, %98'i SAT, %92'si CFT ve %95'i C-ELISA ile pozitif bulundu. Enfekte koyun grubunda ise bu oran aynı testler ile sırasıyla %91.16, %91.16, %85.63 ve %86.74 olarak tespit edildi. İnfekte sığır ve koyunlarda bütün testlerle oldukça yüksek pozitif sonuç alındı. Ancak RBPT ve SAT ile alınan pozitiflik oranlarının CFT ve C-ELISA'ya göre nispeten yüksek olduğu görüldü. Bu sonuçlar etken izole edilen ve infeksiyonun akut seyrettiği sürülerdeki atık yapmış hayvanlara ait sonuçlardır.

Aşılı sığırlarda SAT'da titrelerin 21'inci gün, aşılı koyunlarda ise 14'üncü gün pik yaptığı, sığırlarda 90'ıncı günden itibaren bütün hayvanlar negatif bulunurken, koyunlarda aynı dönemde pozitiflik oranı %16.66'ya düştüğü görüldü. 120'nci günde ise koyunlara ait bütün serum örnekleri negatif bu-

lundu. Buna rağmen SAT'ın aşılı sığır ve koyunların infekte hayvanlardan ayırt edilmesinde önemli bir değeri bulunmamaktadır.

Aşılamadan 21 gün sonra sığırlardan elde edilen pozitif sonuçların RBPT ile CFT ve C-ELISA'ya göre daha kısa sürede pik yaptığı görüldü. Bu durumun RBPT'nin, IgG1 antikorlarının yanı sıra, CFT ve C-ELISA'dan farklı olarak humoral immün yanıtın başlangıcında ortaya çıkan IgM antikorlarını da tespit etmesinden kaynaklandığı düşünüldü.

Nielsen ve ark. (13), yapmış oldukları bir çalışmada Plate Aglutinasyon Test, CFT, İndirekt-ELISA ve C-ELISA yöntemleri ile sığır serumlarını test etmişler, aşılı hayvanlarda C-ELISA testinin diğer testlere göre daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Gall ve ark. (9) yapmış oldukları çalışmada RBPT ve CFT pozitif bulunan sığır kan serumları ile yapmış oldukları çalışmada C-ELISA-OC ve C-ELISA-SLPS ile test etmişler sonuçlar %96.08 ve %96.51 düzeyinde uyumlu bulunmuştur.

Samartino ve ark. (15), çalışmalarında brusellanın teşhisinde İndirekt-ELISA ile C-ELISA yöntemlerini konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırmışlar, C-ELISA yöntemini aşılanmış hayvanlarda diğer testlere göre daha spesifik olduğunu, bu testin istenmeyen serolojik reaksiyonların eliminasyonunu sağladığını ve *B. abortus* S-19 aşılması yapılan ülkelerde, brusellozis kontrol ve eradikasyon prog-

ramını tamamlayıcı bir yöntem olarak kullanılmasını önermişlerdir.

Stournara ve ark. (17), yapmış oldukları bir çalışmada ergin ve genç koyunları *Brucella* Rev1 aşısı ile konjunktival yolla aşılayarak aşılamının 21'inci gününden itibaren düzenli aralıklarla 330'uncu güne kadar Fluorescence Polarization Assay, RBPT, CFT, modified-Rose Bengal Test, İndirekt-ELISA ve C-ELISA ile serolojik immun yanıtı takip etmişlerdir. Çalışmada 3-6 aylık koyunlarla yapılan çalışmada RBPT, CFT ve C-ELISA ile sırasıyla %100, %89.79 ve %79.59 oranında pozitif sonuç almışlardır. 45'inci günden itibaren bütün testlerde antikor titreri düşme eğilimi göstermiş olup 91'inci günden itibaren antikor titreri önemli düzeyde düşmüştür. 125'inci günde bütün testlerden negatif sonuç alındığını bildirmiştir.

Bu çalışmada aşılı sığırlardan 1 (%3), aşılı koyunlarda ise 2 (%7) hayvan bir yıl süre ile pozitif sonuç vermiştir. Aşılı kuzulardan 28 (%93)'ünde 180. günde negatif sonuç alınmıştır. Subkutan canlı aşı uygulamalarında persiste infekte hayvanların ortaya çıkması mümkündür. Bu nedenle konjunktival yolla aşılama gibi aşılama yöntemleri geliştirilmiştir (7, 11). Stournara ve ark. (17)'in yapmış oldukları çalışmada *Brucella* Rev1 aşısını konjunktival yolla uygulamaları, ülkemizde ise subkutan uygulanması elde ettiğimiz pozitiflik oranlarının yüksek kalmasını sebep olabilir.

Çalışmamızda aşılı koyunların ikisine ait kan serumları antikomplementer etki gösterdiklerinden CFT ile sonuç alınmazken, aynı serumlar C-ELISA ile değerlendirilmiştir. Stack ve ark. (1999), yapmış oldukları çalışmada CFT testi ile değerlendirilemeyen kötü kalitedeki 50 adet serumu C-ELISA testi ile doğru olarak değerlendirebildiklerini bildirmişlerdir. Bu durum CFT testi ile değerlendirilemeyen hemolizli ve antikomplementer etkili serum örneklerinin C-ELISA ile değerlendirilebileceğini gösterdi.

Sonuç olarak aşılı sığırlardan benzer sonuçların alınması, daha kolay uygulanabilir bir test olması ve kısa sürede sonuç vermesi gibi nedenlerden dolayı C-ELISA, altın standart test olarak kabul edilen CFT ile karşılaştırıldığında brusellozisin teşhisinde CFT'ye alternatif olarak kullanılabilirliği düşünüldü. Aşılı koyunlarda ise C-ELISA testi ile CFT'den çok daha kısa sürelerde negatif sonuç alınması bu

testin aşılı ve infekte hayvanların ayırımında oldukça önemli olduğunu göstermektedir.

Kaynaklar

1. Agresti A (2002). *Categorical data analysis*. 2nd edition. Wiley-Interscience Publishers, New York.
2. Alton GG, Jones LM, Pietz DE (1975). *Laboratory Techniques in Brucellosis*. 2nd ed. Geneva, World Health Organisation, Monograph Series, No: 55.
3. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM (1988). *Techniques for the Brucellosis laboratory*. I.N.R.A. Paris.
4. Anon (1990): *Brucellosis mücadele talimatnamesi*. III.Baskı, Hayv. Araşt. Ens.Md.lüğü Ofset Tesisleri., Lalahan – Ankara, No:189.
5. Anon (2009a). *Bovine brucellosis*. In: OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Vol. 2, section 2.4, chapter 2.4.3.
6. Anon (2009b). *Caprine and ovine brucellosis (excluding Brucella ovis)*. In: OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Vol. 2, section 2.7, chapter 2.7.2.
7. Diaz-Aparicio E, Aragon V, Marin C, Alonso B, Front M, Moreno E, Perez-Ortiz S, Blasco JM, Diaz R, Moriyon I (1993). *Comparative analysis of brucella serotype A and M and Yersinia enterocolitica 0:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep and goats*. J Clin Microbiol, 31(29): 3136-3147.
8. Fekete A, Bantle JA, Halling MS, Sanborn MR (1990). *Preliminary development of a diagnostic test for brucella using polymerase chain reaction*. J App Bacteriol, 69: 216-227.
9. Gall D, Colling A, Marino O, Moreno E, Nielsen K, Perez B, Samartino L (1998). *Enzyme immunoassays for serological diagnosis of bovine brucellosis: A trial in Latin America*. Clin Diag Lab Immunol, 5(5): 654-661.
10. Mac Millan A (1990). *Conventional serological tests*. In: Animal Brucellosis. Eds: Nielsen K, Duncan JR, CRC press Boca Raton Florida. 154-197.
11. Marin CM, Moreno E, Moriyon I, Diaz R, Blasco JM (1999). *Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis*. Clin Diagn Lab Immunol, 6, 269-272.
12. Nielsen K. (2002). *Diagnosis of brucellosis by serology*. Vet Microbiol 90: 447-459.
13. Nielsen KH, Kelly L, Gall D, Nicoletti P, Kelly W (1995). *Improved competitive enzyme immunoassay for diagnosis of bovine brucellosis*. Vet Immunol Immunopathol, 46(3-4): 285-291.
14. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe publishing, Spain.:261-267.

15. **Samartino L, Gall D, Gregoret R, Nielsen K** (1999). *Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis*. Vet Microbiol, 70 (3-4): 193-200.
16. **Stack JA, Perrett LL, Brew SD** (1999). *Competitive ELISA for bovine brucellosis suitable for testing poor quality samples*. Vet Rec, 145: 735-736.
17. **Stournara A, Minas A, Bourtzi-Chatzopoulou E, Stack J, Koptopoulos G, Petridou E, Sarris K** (2007). *Assessment of serological response of young and adult sheep to conjunctival vaccination with Rev-1 vaccine by fluorescence polarization assay (FPA) and other serological tests for B. melitensis*. Vet Microbiol, 119(1): 53-64