

## KOYUNLARDA *B. melitensis*'in MİKROAGLÜTİNASYON TESTİ (MAT) İLE TEŞHİSİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR\*

### Studies on Diagnosis of *B. melitensis* with Microagglutination Test (MAT) in Sheep\*

Turgay ŞEYDA\*\* M. Ali GÜLER\*\*\*\* Oktay GENÇ\*\*\*\*

#### ÖZET

Bu çalışmada *Brucella melitensis* enfeksiyonuna karşı serumda şekillenen antikorlar Plate Test (PT), Rose Bengal Plate Test (RBPT), Tüp Aglütinasyon Testi (TAT) ve Mikroaglütinasyon Testi (MAT) ile saptanarak sonuçlar sensitiflik ve duyarlık açısından karşılaştırıldı. MAT'de *B. melitensis*'ten hazırlanan ve Safranin-0 ile boyalı antijen kullanıldı ve test U tabanlı mikropleytlerde gerçekleştirildi.

Teste tabi tutulan 1580 adet koyun kan serumundan PT'de 341 (%21.6), RBPT'de 358 (%22.7), TAT'de 463 (%29.3) ve MAT'de 587 (%37.1) adet pozitif reaksiyon saptandı.

Mikroaglütinasyon Testi'nin *brucella* antikor titrelerinin belirlenmesi için daha az zaman, kısa inkübasyon süresi ve daha az antijen kullanımı gerektirdiğinden avantajlı olduğu saptandı. Koyunlarda *B. melitensis* enfeksiyonunun serolojik tanısında diğer testlerin yanı sıra MAT'nin kullanılmasının enfeksiyonun saptanmasında yararlı olacağı sonucuna varıldı.

**Anahtar Sözcükler:** *B. melitensis*, Koyun serumu, PT, RBPT, TAT, MAT.

#### SUMMARY

In this study, Plate Test (PT), Rose Bengal Test (RBPT), Tube Agglutination Test (TAT) and Microagglutination Test (MAT) were used for the detection of *Brucella melitensis* antibodies in sheep sera. Each results of these tests were compared with other tests.

The antigen which prepared by *B. melitensis* and stained Safranin-0 was used to microagglutination Test (MAT) and the test was confirmed in the U bottom microplates.

Among 1580 blood serum samples examined and 341 (21.6%), 358 (22.7%), 463 (29.3%), 587 (37.1%) samples were determined as positive in PT, RBPT, TAT and MAT respectively.

Advantages of the microagglutination test were that it required less time to perform, had a shorter incubation period, and uses less antigen.

In detecting *B. melitensis* infection in sheep the use of MAT, together with other tests was found to be useful.

**Key Words:** *Brucella melitensis*, Sheep sera, PT, RBPT, TAT, MAT.

#### GİRİŞ

Türkiye'de koyun yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen çeşitli faktörler arasında enfeksiyöz karakterlerdeki yavru atmaların ilk sırayı aldığı ve koyun yetiştiriciliği yapanların en büyük sorunlarından biri olduğu bildirilmektedir (1).

*Brucella*'ların neden olduğu brucellosis, daha çok sığır, koyun, keçi, domuz, köpek gibi hayvanlarda genital organ, meme bezleri, testislere yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olan kronik bulaşıcı ve nekrotik yangınel enfeksiyonlarla ortaya çıkan zoonoz bir hastalıktır (1,3-5).

Koyunlarda genellikle *B. melitensis*, brucellosis'e neden olur. Bu mikroorganizma aynı zamanda insanlarda Malta Humması'nın (Mediterranien Fever) etkenidir ve enfeksiyon dünyanın hemen bütün ülkelerinde görülmektedir. Enfeksiyonun tanısı direkt (etken izolasyonu ve identifikasyonu) ve indirekt (kan, serum, süt ve süt serumu vs. ile serolojik testler) yöntemlerle yapılabilmektedir. Ayrıca son yıllarda biyoteknolojik yöntemlerle de (PCR, Hibridizasyon vs.) et-

kenin tanımı mümkün olmaktadır (1,4,5).

Koyun brucellosis'inin serolojik tanısında Plate Test (PT), Rose Bengal Testi (RBPT), Serum Aglütinasyon Testi (SAT), Komplemant Fikzasyon (CF) ve ELISA gibi tekniklerden yararlanılmaktadır (1,4,6,7,13,15).

Rose Bengal Plate Test (RBPT), hem laboratuvar şartlarında ve hem de sahada tarama testi olarak kullanılmaktadır (1,3,6,8,13). Rose Bengal boyası ile boyalı bu antijen, pH 3.65'e ayarlanmıştır. Antijenin asidik pH derecesi serumdaki IgM aktivitesini engelleyerek IgG'lerin (özellikle IgG 1) reaksiyona katılmalarına yardımcı olurken nonspesifik aglutininlerin etkinliğine de engel olur (1,13).

Tüp (serum) aglütinasyon testi (TAT), brucellosis'in serolojik tanısında eskiden beri başvurulan en önemli testlerden biri olup günümüze kadar bu yöntemden geniş çapta yararlanılmaktadır. Yapılan çalışma-

\* Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (97-VF 005 Nolu Proje).

\*\* Dr., KAÜ Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

\*\*\* Arş.Gör., KAÜ Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE



larda, TAT'de IgM'lerin, IgA, IgG<sup>1</sup> ve IgG<sup>2</sup> 'lerden daha yüksek reaksiyon verdiği bu sebeple TAT'nin akut Brucellosis olgularının serolojik tanısında kroniklere oranla daha etkili olduğu bulunmuştur. Hastalığın erken dönemlerinde, özellikle yüksek titrel serumlarda prozon ve diğer bloke fenomenler nedeniyle testte negatif sonuç elde edilebilir (6). Bu nedenle TAT'nin fazla spesifik olmadığı, koaglutininler ve nonspesifik aglutininlerin spesifiteyi etkilediği bildirilmektedir (1). Brucella grubu mikroorganizmalar ile ortak antijenik yapıya sahip olan bazı bakteriler (Yersinia enterocolitica 0:9, Escherichia coli 0:116 ve 0:157, Francisella tularensis, Kaufman-White N grup Salmonella'lar, Pseudomonas matophilica, Vibrio cholera ve Campylobacter fetus vs.) koaglutininlerin nedeni olarak gösterilmiştir (1,9). Nonspesifik aglutininlerin nedeni henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Çeşitli araştırmacılar bu durumu serum glikoproteinlerinin desializasyonuna bağlı olarak, serumda bulunan IgM'lerin modifiye olması ve bu serumlarla yapılan TAT'de IgM'lerin brucella antijenleri ile nonimmün reaksiyon vermelerine bağlamışlardır (1,8).

Tüp aglutinasyon testi aynı zamanda fazla miktarda serum, tüp, pipet ve antijen gerektirdiği için çok sayıda örneğin işlenmesinde dezavantaja da sahiptir (1,9,10).

Mikroaglutinasyon testi (MAT), az miktarda serum ve antijen gerektirmesi uygulandığı mikroplyetlerden çok sayıda örneğin değerlendirilmesi gibi avantajlara sahiptir. MAT sonuçlarının okunması sırasında oluşabilecek güçlükler de antijenin boyanması ile ortadan kaldırılmıştır. MAT'de antijenin boyanması için çeşitli boya maddelerinden (Safranin-0, Trifenil Tetrazolium klorid vs.) yararlanılmıştır (7). Araştırmacılar (1,2,7,11, 12) safranin-0 ile boyalı antijenle yapılan MAT'de sonuçların daha net değerlendirildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada MAT'nin koyunlarda B. melitensis infeksiyonlarının tanımındaki rolü saptanarak diğer testlerle (PT, RBPT, TAT) karşılaştırılması yapılmış ve duyarlık derecesi belirlenmiştir.

## MATERYAL ve METOT

### Serumlar

**Test Serumları:** Çalışmada; Kars, merkez ve çevre köylerde, Belediye Mezbahanesinden ve Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kliniklerine gelen aşısız koyunlardan toplam 1580 adet kan serumu kullanılmıştır. Köylerden alınan kan örnekleri enfeksiyondan şüpheli birimlerden alınmıştır.

**Standart Serumlar:** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanan, titresi TAT ile 1/640 olarak belirlenen serumdaki pozitif kontrol; negatif kontrol serum için ise sağlıklı bir hayvandan elde edilen ve serolojik testlerle de (RBPT, TAT) reaksiyon vermeyen serum kullanılmıştır.

**Suşlar:** MAT antijeninin hazırlanmasında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonundan sağlanan ve Kars yöresinden izole edilen *Brucella melitensis* suşundan yararlanılmıştır. Suşun karakterleri bakteriyoskopi, kültür, biyokimyasal ve serolojik testlerle de incelenmiştir.

**Besiyeri:** MAT antijenini hazırlamak için kullanılan B. melitensis suşunu üretmede % 5 at serumlu brucella agar (DIFCO) kullanılmıştır.

### Antijenler

**Plate Test Antijeni:** Serumların Plate Test ile değerlendirilmesinde Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü'nde B. abortus S99 suşundan üretilen kristal violet ve brilland green ile boyalı Plate Test Antijeninden yararlanılmıştır.

**Rose Bengal Plate Test Antijeni:** RBPT'de Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen ve B. abortus S99 suşundan hazırlanan Rose Bengal boyası ile boyanmış RBPT antijeni kullanılmıştır.

**Tüp Aglutinasyon Antijeni:** TAT'de, Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü tarafından hazırlanan standart B. abortus Tüp aglutinasyon antijeni kullanılmıştır.

**Mikroaglutinasyon Test Antijeni:** MAT'de kullanılan antijen Brown ve ark. (7)'nin bildirdikleri yöntemle göre B. melitensis suşundan safranin-0 ile boyanarak hazırlanmıştır. Bu amaçla B. melitensis'in %5 at serumlu brucella agardaki 72 saatlik kültürü %0.85'lik fizyolojik tuzlu su (FTS) ile toplanmış, %0.05'lik formalin içeren %0.85'lik (FTS) ile +4°C'de bir gece bekletilmiş, formalin ile öldürülmüş olan bakteri, formalinli FTS ile iki kez yıkılmıştır. Hazırlanan bu stok solüsyonun, negatif, düşük ve yüksek titrel referans serumlarla yapılan standartize çalışmalarında 1:10'dan 1:100'e kadar çeşitli sulandırmaları denenmiş ve en iyi sonucun 1:50 dilüsyonda elde edildiği görülmüş ve stok solüsyonun 1:50 oranında dilüe edilerek çalışma solüsyonu olarak kullanılmıştır. 1:50 oranında Phosphate-Buffered Saline (PBS) (pH 7.2) ile sulandırılan solüsyona 100 ml'ye 1.1 ml miktarında %0.005'lik safranin-0 ilave edilmiştir.



**METOT**

**Karakterizasyon:** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonundan sağlanan *B. melitensis* suşunun karakterizasyonu amacıyla yapılan bakteriyoskopik, kültürel, biyokimyasal ve serolojik değerlendirmelerle suşun *B. melitensis* olduğu ortaya konulmuş ve bu suş MAT antijeni hazırlamada kullanılmıştır.

**Plate Test (PT):** Toplam 1580 koyun kan serumu lam üzerinde bir damla (0.03 ml) ve bir damla (0.03 ml) PT antijeni 150 rpm'de 2-3 dakika karıştırılmış, süre sonunda aglütinasyon verenler pozitif, vermeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

**Rose Bengal Plate Test (RBPT):** Bu testte kan serumları, lam üzerinde bir damla (0.03 ml) RBPT antijeni ve bir damla (0.03 ml) serum olacak şekilde karıştırılmış ve 4 dakika içinde aglütinasyon verenler pozitif ve vermeyenler negatif kabul edilmiştir.

**Tüp Aglütinasyon Testi (TAT):** Bu test, Brown ve ark. (7)'nin bildirdikleri yöntemle yapılmıştır. Başlangıçta TAT antijeni 1/50 oranında sulandırılmıştır. 13 x 100 mm 'lik on adet tüp alınmış, ilk tüpe 0.9 ml; diğerlerine 0.5 ml % 0.9'luk FTS konulmuştur. İlk tüpe incelenen serumdan 0.1 ml ilave edilerek iyice karıştırılmış ve II. tüpe pipetajla 0.5 ml I. tüpten aktarılmıştır. Bu işlem son tüpe kadar devam etmiş ve son tüpten (10.) 0.5 ml dışarı atılmıştır. Böylece serumların iki katlı sulandırılmaları elde edilmiştir. Daha sonra her tüpe 0.5 ml miktarında antijen ilave edilmiştir (10. tüp hariç). Bu testte kontrol amacıyla pozitif ve negatif serumlardan da yararlanılmıştır. Antijen ve serumun iyice karışması için portüp iyice karıştırılarak su banyosunda 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış, süre sonunda siyah zemin üzerinde ve ışıkta aglütinasyon durumu incelenerek sonuçlar okunmuştur.

**Mikroaglütinasyon Testi (MAT):** Brown ve ark. (7)'nin bildirdikleri yöntemle göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

Başlangıçta tüplerde serumun 1:10' luk dilüsyonları (0.1 ml serum + 0.9 ml dilüent) yapılmıştır. Stok antijen süspansiyonu % 0.5 formalin ve % 0.005 Safranin-0 içeren (%0.5'lik stok solusyondan) %0.85'lik FTS' da 1:10 oranında sulandırılmıştır.

MAT'nin başlangıcında (U) tabanlı mikropleytin ilk gözüne 1:10 dilüsyonlu 0.05 ml serum, geri kalan diğer gözlere de %0.85'lik FTS'dan 0.025 ml konulmuş ve serum seri şekilde dilüe edilerek otomatik pipetle tüm gözlere 0.025 ml antijen ilave edilmiştir. Böylece serum dilüsyonları 1:20 ile 1:40.960 arasında düzenlenmiştir. Pleytler plastik bir koruyucu ile kapatılarak 20 saniye shaker'da vertikal olarak karıştırılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda pleytler floresan lamba ışığı altında okuma aynası ile okunarak değerlendirilmiştir. Dügme tarzında çöküntüler negatif ve dantela benzeri çöküntüler pozitif olarak kabul edilmiştir. Bu testte de kontrol amacıyla pozitif (düşük ve yüksek titreli) ve negatif serumlardan da yararlanılmıştır.

**BULGULAR**

**Suşun Karakterizasyonu:** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonundan sağlanan ve Kars yöresinde izole edilen *B. melitensis* suşunun karakterizasyonu amacıyla yapılan değerlendirmelerde bakteriyoskopik olarak; Gram negatif, kokobasil olması; kültürel olarak CO<sub>2</sub>'ye gereksinim duymayan; % 5 serumlu Brucella agar'da 72 saatte 0.5-1 mm çapında (S) tipi, mat sarı koloniler oluşturması; biyokimyasal olarak 1/50.000 bazik fuksin ve tioninde üreme; D-glikoz, üre, oksidaz, katalaz ve nitrat testlerinin pozitif; L-arabinoz, D-galaktoz ve H<sub>2</sub>S testlerinin negatif sonuç vermesi ve serolojik olarak da lamda anti-Brucella serumları ile aglütinasyon vermesi ile akriflavin testi suşun *B. melitensis* olduğunu ortaya koymuş, özellikleri bakımından *B. melitensis*'e benzerlik gösteren bu suş MAT antijeni hazırlamada kullanılmıştır (14).

**Plate Test (PT) Sonuçları:** Araştırmada kullanılan 1580 adet koyun kan serumu PT ile değerlendirilmiş ve 341 (%21.6) adet serum pozitif ve 1239 (%78.4) adet serum negatif olarak saptanmıştır.

**Rose Bengal Plate Test (RBPT) Sonuçları:** Bu araştırmada 1580 adet koyun kan serumu RBPT ile değerlendirilmiş 358 (% 22.7) adet serum pozitif ve 1222 (%77.3) adet serum negatif sonuç vermiştir.

**Tüp Aglütinasyon Test (TAT) Sonuçları:** TAT'de değerlendirilen 1580 adet koyun kan serumunun 463 (% 29.3) adedi pozitif ve 1117 (%70.7) adedi negatif olarak bulunmuştur.



**Mikroaglutinasyon Test (MAT) Sonuçları:** İncelenen 1580 serumdan 587 (% 37.1) pozitif ve 993'ü (%62.9) ise bu testte negatif bulunmuştur.

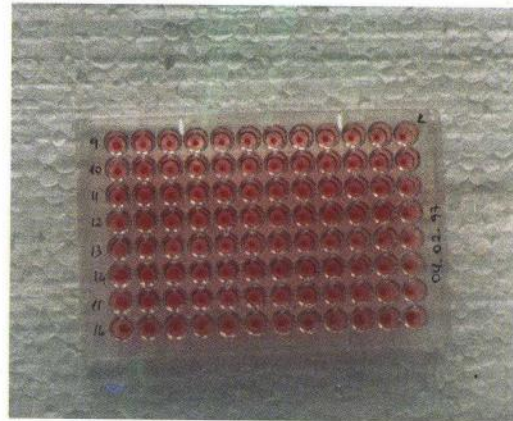
Çalışmada incelenen serumların PT, RBPT, TAT ve MAT sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir.

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Brucellosis'in tanısı genellikle serolojik olarak yapılmaktadır. Ancak serolojik testlerden yalnız bir tanesi ile tanı yapmak mümkün olmadığından en az iki testin yapılmasının gerektiği bildirilmektedir (4, 6,8). Brucellosis'in serolojik tanısında, Çabuk ve Yavaş Aglutinasyon, Rivanol, Komplemant Fiksasyon, Antiglobulin Test, Sütle yapılan Ring Test, Floresan Antikor Tekniği ve ELISA kullanılmaktadır (4,6,8, 9,15). Bu amaçla en çok PT, RBPT ve TAT'den yararlanılmaktadır (4,8). Bu yöntemlerden TAT, tanı için en geçerli yöntem olmuştur. TAT, serum aglutininlerinin tayini ve ölçümü amacıyla tercihen kullanılmışsa da non-spesifik antikorlardan ileri gelen olumsuzluklar, fazla miktarda serum, tüp, pipet ve antijen gerektirdiği için çok sayıda örneğin işlenmesinde de önemli bir dezavantaja sahip olması gibi bazı olumsuzlukları bildirmiştir (1,7,10).

Mikroaglutinasyon testi, çeşitli hastalıkların tanısında araştırmacılar tarafından tanımlanmış, az miktarda serum ve antijenin kullanılması, uygulandığı mikroplyetlerde çok sayıda örneğin değerlendirilmesi gibi özelliklere sahip olduğu bildirilmiş ve bu teknikle *F. tularensis* antikorları araştırılmış (11,12,16,17) daha sonra insanlarda ve sığırlar da *Brucella* antikorlarının araştırılmasında yararlanılmıştır (7,10). MAT'de sonuçların okunması sırasında oluşabilecek güçlükler antijenin boyanması ile ortadan kaldırılmış, araştırmacılar Safranin-0 ile boyalı antijenle yapılan MAT'de sonuçların daha net değerlendirildiğini bildirmişlerdir (1,2,7, 11,12). Safranin-0 ile boyanarak duyarlılığı artırılan antijenin düşük konsantrasyonlarının kullanılması ile erken aglutininlerin bulunmasına neden olmuştur (11). Ayrıca makroteknikle genellikle yüksek antikor düzeylerinin saptanmasına karşılık, mikroteknikle genellikle düşük antikor se-

viyelerini saptamada bir fark olduğu bildirilmektedir (7). İnsan Brucellosis'inin tanısında MAT ile yapılan bir çalışmada pozitiflikleri saptamada MAT'nin % 60, TAT'inin % 36 bulunduğu bildirilmektedir (7). Şeyda ve ark. (10), sığırlarda *brucella* antikorlarını MAT ile saptadığı bir çalışmada pozitiflikleri, saptamada RBPT'de % 59.7, TAT'de % 65.7, MAT'de ise % 74.6 sonuç elde etmişlerdir. Kızılyer (2), Safranin-0 ile boyalı *B. abortus* antijeni kullandığı Mikroaglutinasyon Testinde %84 pozitiflik belirlerken RBPT ile %47.6 pozitif serum belirlemiştir. Yardımcı ve ark. (1)'nin 101 koyun kan serumu ile yaptıkları çalışmada MAT, ME-MAT ve RBPT'de sırasıyla %64, %65 ve %59 oranlarında pozitif sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışmada da brucellosis'in serolojik tanısında yararlanılan diğer serolojik testlerle MAT 'de elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış, MAT'nin diğer serolojik testlere göre duyarlılığı araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan serum örnekleri brucellosis olduğu bilinen birimlerden ve aşısız sürülerden alınmıştır. Aynı antikor sınıfları ile çalışan TAT ve MAT'de birinin pozitif olduğu tüm serumlarda diğerleri de pozitif bulunmuştur. Ancak RBPT'de bu iki testin pozitif olduğu 27 serumda negatif sonuç vermiştir. Bu farklar aynı sürü içindeki hayvanların hastalığın değişik periyotlarında (akut, kronik) bulunmasından ileri gelebileceği bildirilmektedir (1). Test edilen 1580 adet serum örneğinde TAT'de 38, MAT'de ise 47 serum şüpheli olarak bulunmuştur. Şüpheli sonuçlar örneklerin enfekte ve aşısız sürülerden



**Resim 1.** MAT'de pozitif ve negatif sonuçlar  
**Figure 1.** Positive and negative results of MAT



alınmış olmasından dolayı pozitif sonuçlarla birlikte değerlendirilmiştir.

Çalışmada kullanılan 1580 adet koyun serumuna uygulanan dört serolojik test sonucu elde edilen pozitiflikler PT'de 341 (%21.6), RBPT'de 358 (%22.7), TAT'de 463 (%29.3) ve MAT'de 587 (%37.1) olarak bulunmuştur. Bu dört testin pozitiflikleri sıptamada sırasıyla PT-TAT %13.6, PT-MAT %17.2; RBPT-TAT %13, RBPT-MAT %16.4; TAT-MAT %12.7 olarak bulunmuştur.

Çalışmada koyunlarda brucellosis'in pozitiflikleri sıptamada >160 eşiğine göre (18) TAT ile 195, MAT ile 267 serum pozitif sonuç vermiş, TAT ile 1/5120 seviyesinde herhangi bir titre elde edilemezken MAT ile 2 serumda bu titrede sonuç alınmıştır. Tablo 2'de iki test titrelerinin dağılımı gösterilmektedir. Pozitiflikleri belirlemede MAT'de TAT'e göre 72 (%13.7) adet fazlalık elde edilmiştir.

Çalışma sonucunda; pozitiflikleri belirlemede, MAT'nin daha duyarlı olduğu, antikor titrelerinin belirlenmesi için daha az zaman, daha az antijen kullanımını gerektirdiğinden TAT'e tercih edilebilir sonucuna varılmıştır.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan örneklerin PT, RBPT, TAT, MAT sonuçları

**Table 1.** PT, RBPT, TAT, MAT, results of serum samples.

Serum Sayısı	PT		RBPT		TAT		MAT	
	+	-	+	-	+	-	+	-
	341	1239	358	1222	463	1117	587	993
	(21.6)*	(78.4)	(22.7)	(77.3)	(29.3)	(70.7)	(37.1)	(62.9)

(\*) Yüzde oranı

**Tablo 2.** Çalışmada kullanılan serum örneklerinin TAT ve MAT titreleri

**Table 2.** TAT and MAT titres of serum samples

	TAT	MAT
Negatif	1117	993
20	81	93
40	90	103
80	97	124
160	105	141
320	63	72
640	21	39
1280	5	9
2560	1	4
5120	-	2
	463	587

## KAYNAKLAR

1. Yardımcı, H., Esenal, Ö.M., Küçükkayan, U., Erdemoğlu, A.: Koyun brucellosisi'nin serolojik teşhisinde dithiothreitol ve EDTA'nın kullanılması. AÜ Vet. Fak. Derg., 42:241-245, 1995.
2. Çetin, E. T., Çoral, B., Bilgiç, A., Bilgehan, H., Sipahioğlu, Ü., Gürel, M., Kılıçturgay, K., Arıkan, E., Özenli, H., Babacan, M., Mutlu, G., Yılmaz, S., Sarısayın, F., Eroğlu, M.: Türkiye'de insanda bruselloz insidensinin saptanması. Doğa-Tr. J. of Med. Sci., 14:324-334, 1990.
3. Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Akay, Ö.: Özel mikrobiyoloji, epidemiyoloji, bakteriyel ve mikotik infeksiyonlar. AÜ Yay. No:741, 1992.
4. Bilgehan, H.: Klinik mikrobiyoloji, Özel bakteriyoloji ve bakteri infeksiyonları. Barış Yay. İzmir, 1987.
5. Güllüce, M.: Kars ve çevresinde sığırlarda brucella abortus'a karşı oluşan antikorların ELISA ve diğer serolojik yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) saptanması ve sonuçların karşılaştırılması. KAÜ. Sağlık Bilimleri Ens-titüsü Müdürlüğü, Doktora Tezi, 1993.
6. Brown, S.L., Klein, G.C., Mc Kinney, F.T., Jones, W.L.: Safranin-0 stained antigen microagglutination test for detection of brucella antibodies. J. Clin. Microbiol., 13 (2): 398-400, 1981.
7. İzgür, M., Akay, Ö., Arda, M., Erdeğer, J.: Sığır brucellosisi'nin teşhisinde EDTA ve 56 °C'de aglutinasyon testlerinin kullanılması. AÜ Vet. Fak. Derg., 39(1-2): 191-200, 1982.
8. Blood, D.C., Radostits, O.M., Arundel, J.H., Gay, C.C.: Veterinary Medicine. A textbook of the disease of cattle, sheep, goats and horses. Seventh Ed. ELBS, London, U.K., 1987.
9. Şeyda, T., Genç, O., Güler, M.A., Baz, E.: Sığır serumlarında mikroaglutinasyon testi (MAT) ile brucella antikorlarının araştırılması. KAÜ Vet. Fak. Derg., 3(1) (Baskıda), 1997.
10. Sato, T., Fujita, H., Ohara, Y., Homma, M.: Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. J. Clin. Microbiol., 28(10): 2372-2374, 1990.
11. Şeyda, T.: Kars bölgesinde koyunlarda tularemi infeksiyonunun insidensi üzerinde serolojik ve kültürel çalışmalar. KAÜ. Vet. Fak. Derg., 2(1): 49-60, 1996.

12. Ünel, S.: Rose Bengal Plate Test ve önemi. Türk Mikrobiol. Cem. Derg., 2: 47-52, 1972.
13. Cordel, M.J., Brinley-Morgan, W.J.: Genus brucella mayer and shaw. 1920, 377-388. In N.R. Krieg and J.G. Holt (Ed). Bergey's Manual of Sys. Bac. Vol. 1, The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1984.
14. Ocholi, R.A., Ezeokoli, C.D., Akerejola, O.O., Saror, D.I.: Use of the enzymelinked immunosorbent assay for screening cattle for brucella antibodies in Nigeria. Vet. Quart., 18(12): 22-24, 1996.

15. Behan, K.A., Klein, G.C.: Reduction of brucella species and Francisella tularensis crossreacting agglutinins by dithithretiol. J. Clin. Microbiol., 16(4): 756-757, 1992.
16. Gaultney, J.B., Wende, R.D., Williams, R.P.: Microagglutination procedures for febrile agglutination tests. Appl. Microbiol., 22: 635-640, 1971.
17. Kimberling, C.V.: Disease of sheep disease of breeding and nursing lamb. Third Ed. p. 49-54, 1988.

**Grafik 1. TAT ve MAT'de titrelerin dağılımı.**  
Graphic 1. Results of the TAT and MAT titers.

