

PREVALÊNCIA DA BRUCELOSE BOVINA NA MICRORREGIÃO DA SERRA DE BOTUCATU – ESTUDO COMPARATIVO DOS RESULTADOS DAS TÉCNICAS DE SOROAGLUTINAÇÃO LENTA EM TUBOS, 2-MERCAPTOETANOL E FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO*

R.B.S. Kuroda¹, L.M.S. Paulin², C.N. Nozaki¹, F.F. Silva Junior¹, L. Geronutti¹, J. Megid¹

¹Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, CP 560, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: jane@fmvz.unesp.br

RESUMO

Investigou-se a prevalência da brucelose bovina nos rebanhos da microrregião da Serra de Botucatu, Estado de São Paulo. Foram colhidos soros de bovinos pertencentes a 96 propriedades totalizando 1.789 amostras. Os soros obtidos foram submetidos às provas de Soroaglutinação com Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAT), 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Reação de Fixação de Complemento (RFC). A prevalência de animais reagentes foi de 3,6%, ressalta-se que 42,7% dos rebanhos apresentavam pelo menos um animal positivo. A análise estatística dos resultados obtidos caracterizou moderada concordância da SAT com a RFC, enquanto que a ATA e 2-ME apresentaram concordância perfeita com a RFC.

PALAVRAS-CHAVE: Brucelose, bovinos, epidemiologia, diagnóstico, prevalência, Brasil.

ABSTRACT

PREVALENCE OF BOVINE BRUCELLOSIS IN THE BOTUCATU MOUNTAINS MICRO-REGION - COMPARATIVE STUDY OF THE RESULTS OF THE TECHNIQUES OF SLOW AGGLUTINATION IN TUBES, 2-MERCAPTOETHANOL AND COMPLEMENT FIXATION. The prevalence of bovine brucellosis in the microregion of Botucatu was evaluated. Sera from 1,789 bovine belonging to 96 herds were collected and submitted to Rose Bengal Plate Test (ATA), Tube Agglutination Test (SAT), 2-Mercapthoetanol Test (2-ME) and Complement Fixation Test (RFC). The regional prevalence was characterized as 3.6%, it must be emphasized that 42.7% of herds had at least one positive animal. The statistical analysis of the obtained results characterized moderate agreement of SAT with RFC, while the ATA and 2-ME presented perfect agreement with RFC.

KEY WORDS: Brucellosis, cattle, epidemiology, diagnosis, prevalence, Brazil.

INTRODUÇÃO

A brucelose bovina, enfermidade infecto-contagiosa de caráter crônico e zoonótico, caracteriza-se nas fêmeas por abortos entre o 7º e 9º meses de gestação seguidos de retenção placentária, placentite e metrite (RADOSTITS *et al.*, 1994; MEADOR & DOYE, 1989), com conseqüente diminuição na produtividade (VASCONCELLOS *et al.*, 1987). Os machos podem apresentar higromas (EAGLESOME & GARCIA, 1992), orquite e epididimite unilateral ou bilateral, podendo disseminar a doença em programas de inseminação artificial (RADOSTITS *et al.*, 1994), não se considerando, no entanto, estas manifestações como patognomônicas

da enfermidade (NICOLETTI, 1980). A infertilidade é conseqüência da localização da bactéria nos testículos (SMITH, 1993).

No Brasil, é conhecida, desde 1922, tendo-se obtido o isolamento da bactéria em fetos abortados no Estado de São Paulo em 1930 (MELO, 1950). Em 1977, um levantamento nacional demonstrou a seguinte prevalência animal para cada região: norte 4,1%, nordeste 2,5%, centro-oeste 6,8%, sudeste 7,5% e sul 4,0% (POESTER *et al.*, 2002). A doença foi relatada em alguns municípios da Bahia, atingindo valores de prevalência em torno de 10% (COSTA *et al.*, 1971). CORRÊA *et al.* (1972) relataram 19% de vacas reativas para brucelose no Estado de São Paulo e FIGUEIREDO (1985)

²Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo, SP, Brasil.

*Apoio Financeiro: FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

referem um índice de prevalência em bovinos de matadouro de 3,9% em Belo Horizonte.

Em São Paulo, FEITOSA *et al.* (1991) relataram uma prevalência de bovinos positivos para brucelose, testados nas provas de Soroaglutinação Rápida em Placa, Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAT), Card-test e 2-Mercaptoetanol (2-ME) de 13,3%. Adicionalmente, SAMARA *et al.* (1996) investigando a situação sanitária da brucelose na pecuária leiteira da região de Pitangueiras, SP, nos anos de 1990, 1991, 1992 e 1993, observaram índices de prevalência de 6,2%, 13,8%, 18,7% e 16,8%, respectivamente, no município.

No Estado do Rio Grande do Sul, como resultado de um sucessivo programa de vacinação, a prevalência animal caiu de 2% em 1977 para 0,3% em 1986. Em Santa Catarina, houve um aumento de 0,2% em 1977 para 0,6% em 1996. Em Minas Gerais, o maior Estado leiteiro do Brasil, a prevalência caiu de 7,6% em 1977 para 6,7% em 1980 (POESTER *et al.*, 2002).

Em 2000, no Brasil, foi lançado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento um Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), que tem como objetivo diminuir a prevalência e a incidência destas enfermidades (BRASIL, 2001).

Desta forma, considerando a implantação do PNCEBT, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a prevalência da brucelose bovina, na microrregião de Botucatu, Estado de São Paulo. Adicionalmente, o estudo objetivou correlacionar a prevalência da enfermidade no rebanho com a percentagem de ocorrência de abortamentos em rebanhos positivos e avaliar a concordância das provas de SAL, 2-ME e RFC.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

O tamanho da amostra foi obtido a partir de um intervalo de confiança 95% com uma prevalência esperada para brucelose em torno de 5%. Tomou-se como base para a amostragem um total de 252.481 bovinos distribuídos em 3.244 propriedades rurais nos 11 municípios da microrregião da Serra de Botucatu (dados cedidos pela Coordenadoria de Defesa Animal – CATI / Botucatu, embasados na campanha de vacinação contra febre aftosa, realizada em novembro de 1998).

Seleção das propriedades e animais

Foram selecionadas propriedades da Serra de Botucatu. De posse dos dados das propriedades, cedidos pelo Departamento de Defesa Agropecuária – CATI de Botucatu, estas foram selecionadas, ao

acaso, através de sorteio, levando-se em consideração a localização das propriedades de um mesmo município para que não houvesse proximidade entre elas.

Os animais foram selecionados de acordo com o tamanho do rebanho. Em propriedades com número de animais superior a 15 cabeças, foi realizada a escolha aleatória. Em propriedades, com número de animais inferior ou igual a 15, foram colhidas amostras de todos os animais.

Colheita de material

A colheita de material foi iniciada no mês de abril de 1999, sendo finalizada em junho de 2000. Foram colhidas, 1.789 amostras de soro sanguíneo de bovinos de 96 propriedades visitadas, nos 11 municípios que constituem a microrregião da serra de Botucatu (Anhembi, Areiópolis, Bofete, Botucatu, Conchas, Laranjal Paulista, Itatinga, Pardinho, Pereiras, Pratânia e São Manuel).

A colheita do material foi realizada, após assepsia local, com álcool iodado. O sangue foi colhido através de venopunção jugular utilizando-se sistema a vácuo estéril sem anticoagulante (Vacuttainer), com agulha 21G, retirando-se, aproximadamente, 10 mL de sangue por animal. Este material foi mantido em posição de descanso por, no máximo, 24 horas, para a formação do coágulo visando a obtenção do soro. Após a retração do coágulo e liberação do soro, garantindo-se a ausência de hemólise, as amostras foram identificadas e aliquotadas em tubo tipo eppendorf® e conservadas em freezer (-20° C), para posterior realização das provas sorológicas.

Provas sorológicas

Todas as 1.789 amostras colhidas foram submetidas às provas de ATA (MAC MILLAN, 1990), SAT e 2-ME (ALTON *et al.*, 1975) e RFC (ALTON *et al.*, 1976).

Os resultados do ATA, SAT e 2-ME foram interpretados conforme os critérios do PNCEBT (BRASIL, 2001). Para a RFC, foram consideradas positivas quaisquer reações de uma a quatro cruces, a partir da diluição 1:8; reações na diluição 1:4, em qualquer percentual de hemólise, foram consideradas suspeitas, enquanto que na diluição 1:2 foram consideradas negativas; as amostras que apresentaram hemólise completa (100%), foram classificadas como negativas; o resultado final foi dado de acordo com a última diluição, em que se observou a sedimentação de hemácias (ALTON *et al.*, 1976).

Inquérito epidemiológico

Foi aplicado um questionário epidemiológico em todas as propriedades que participaram deste estudo.

Para a avaliação dos resultados, as propriedades foram classificadas com base no número de animais existentes em cada propriedade; dessa forma as que apresentaram de 1 a 50 animais foram classificadas como de pequeno porte (PPP), de 51 a 100 animais como de médio porte (PMP) e as que apresentaram acima de 100 animais como de grande porte (PGP). Também foram classificadas como abertas as que executavam com frequência a compra e venda de animais, ou fechadas, as que, normalmente, trabalhavam com cria e recria, sem entrada ou saída frequente de animais.

Análise estatística

A análise estatística foi baseada no estudo da concordância entre os métodos através do coeficiente Kappa (K), com base em MACKINNON (2000). Para efeito desta análise, as amostras que resultaram suspeitas foram consideradas negativas.

RESULTADOS

Houve 50 amostras positivas à SAT; destas, 45 (90%) foram positivas ao ATA, 29 (1,6%) foram positivas ao 2-ME, 28 (56%) positivas e 3 (6%) suspeitas à RFC. Quando comparada às provas de ATA, 2-ME e RFC, a SAT apresentou respectivamente, 90,3%, 89,6% e 89,3% de resultados concordantes positivos e negativos entre as provas. Os coeficientes Kappa foram, respectivamente, 0,72; 0,48 e 0,46.

Em relação aos resultados da ATA 73 reagiram positivos; destes, 66 (90,4%) foram positivos ao 2-ME, 61 (83,6%) positivos e 5 (6,8%) suspeitos à RFC. Quando comparada às provas de 2-ME e RFC, a ATA apresentou, respectivamente, 99,6% e 97,3% de resultados concordantes. Os coeficientes Kappa foram, respectivamente, 0,94 e 0,86.

Do total de amostras avaliadas, 149 foram inconclusivas no 2-ME, destas, 18 (12,1%) e 131 (87,9%) resultaram, respectivamente, suspeitas e negativas à RFC.

Das amostras positivas ao 2-ME, 64 (97%) resultaram positivas, uma (1,5%) suspeita e uma (1,5%) negativa a RFC. Foi observado 97,8% de resultados concordantes positivos e negativos entre os 2 testes. A avaliação estatística demonstrou $K = 0,96$ caracterizando uma perfeita concordância entre estas duas provas.

A faixa etária compreendeu apenas animais acima da puberdade, sendo em sua maioria vacas em produção (72%), com idade média de 5 anos. Foram avaliados 26 (1,4%) machos.

Das 96 propriedades avaliadas 8 (8,3%) eram PGP, 12 (12,5%) PMP e 76 (79,2%) eram PPP. Dos 1.789 animais utilizados, 1.720 (96,08%) eram destinados à

exploração leiteira. Foi geralmente observado o regime de semi-confinamento (96,9%), apenas 3 (3,1%) propriedades criavam os animais em regime extensivo.

Das 96 propriedades estudadas, apenas 8 (8,3%) adquiriam animais em leilão, uma (1,0%) permutava com vizinhos e as 87 (90,6%) restantes trabalhavam no regime de cria e recria de animais. Nove (9,4%) eram abertas (trabalhavam com compra e venda de animais), enquanto que 87 (90,6%) eram fechadas. Das propriedades abertas, 14 (66,7%) apresentaram animais positivos em seus rebanhos e apenas 3 (3,1%) exigiam a apresentação do atestado de brucelose antes da aquisição dos animais. Das 75 propriedades fechadas, em 27 (36,0%) foi observada a presença de animais positivos.

A atenção profilática em 100% das propriedades foi direcionada à febre aftosa. Quando questionados sobre a vacinação contra brucelose bovina, somente 2,1% a executaram mesmo fora da idade ideal.

Foi observada a ocorrência de aborto, no terço médio de gestação, em 8 (8,3%) das propriedades. Cem por cento das propriedades já tinham o conhecimento da doença, entretanto 87 (90,6%) não davam importância ao aspecto zoonótico da enfermidade.

Foram observados animais positivos em 41 propriedades, caracterizando 42,7% de rebanhos infectados com prevalência intra-rebanho, com base na RFC variando de 2,1% a 26,3%.

A prevalência da brucelose bovina na microrregião da serra de Botucatu, no período de 1999 a 2000, foi de 3,7% e 3,6 % se considerarmos, respectivamente, a positividade no 2-ME e RFC.

DISCUSSÃO

Quando comparada às provas de ATA, 2-ME e RFC, a SAT apresentou, respectivamente, 90,3%, 89,6% e 88,4% de resultados concordantes. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por ALTON *et al.* (1975), CAMPERO *et al.* (1990), MORGAN (1969) e NICOLETTI (1969).

Foram observados 97,3% de resultados concordantes entre ATA e RFC, similares aos encontrados por BERCOVICH *et al.* (1998), que afirmam ter encontrado resultados semelhantes entre a RFC e ATA. Em contrapartida, das 1.716 amostras negativas ao ATA, 30 (1,7%) e 6 (0,3%) foram, respectivamente, suspeitas e positivas a RFC. Este fato justifica-se pelo menor limiar de detecção da RFC em relação ao ATA (ALTON *et al.*, 1975; NICOLETTI, 1969), e é reforçado por SZULOWSKI *et al.* (1996) que afirmaram a superior sensibilidade da RFC, quando comparada a ATA, pois, ao testarem 87 sorossuínos suspeitos para brucelose, observaram 81 (93,1%) positivos a RFC, enquanto que 78 (89,6%) foram positivos à ATA.

ABDELRAHIM *et al.* (1990), avaliando a prevalência da brucelose bovina por 2 anos consecutivos, referiram a RFC como o método diagnóstico mais confiável da enfermidade e o indicaram como teste confirmatório para resultados positivos a ATA. A afirmação destes autores é corroborada pelo elevado percentual de resultados negativos a RFC obtidos em soros considerados positivos ao ATA e inconclusivos ao 2-ME observados neste experimento.

O presente estudo está de acordo com MEGID *et al.* (2000) e BRASIL (2001) quando preconizam a utilização do ATA como teste de triagem para rebanhos, complementado pelo 2-ME e concordam com JACQUES *et al.* (1998) que se referem ao ATA como teste de triagem em rebanhos que necessita de um teste sorológico complementar mais sensível e mais específico, o que é confirmado por UZAL *et al.* (1996), SARAVI *et al.* (1995), JACQUES *et al.* (1998), NICOLETTI (1969) e MAC MILLAN (1990), que consideram a FC como o mais sensível e o mais específico dos testes.

A análise estatística dos resultados obtidos caracterizou moderada concordância da SAT com a RFC, enquanto que a ATA e 2-ME apresentaram concordância perfeita com a RFC.

A prevalência de 3,7 e 3,6% obtidas, respectivamente, com o 2-ME e RFC são discrepantes ao encontrado por FEITOSA *et al.* (1991), que relataram 63,4% de animais positivos ao 2-ME, no Estado de São Paulo, em 10 anos de levantamento, porém podem ser justificados pelo delineamento experimental e amostragem diferentes.

Neste trabalho, observou-se uma concordância entre o 2-ME e a RFC de 97,0%, revelando similaridade de especificidade do 2-ME com a RFC de acordo com CARRASCO *et al.* (1995), MARIÑO *et al.* (1991), NICOLETTI *et al.* (1969), porém, discordando de ANÍBAL BELLO *et al.* (1976) e SARAVI *et al.* (1995) que afirmaram ter encontrado maior sensibilidade e especificidade do 2-ME frente a RFC em animais não vacinados.

Os resultados demonstraram uma elevada concordância do 2-ME comparativamente a RFC. A prova de 2-ME é considerada como um dos métodos diagnósticos mais específicos para brucelose bovina (MARIÑO *et al.*, 1991; NICOLETTI, 1969; SARAVI *et al.*, 1995; UZAL *et al.*, 1996).

Neste estudo, a prevalência da brucelose bovina, obtida na prova de RFC, foi de 3,7%, percentual bastante inferior ao encontrado por MOLNÁR *et al.* (2000) que avaliando a ocorrência da brucelose bovina no Estado do Pará em 3.338 amostras de soro sanguíneo, provenientes de 13 rebanhos encontraram 11,29% de animais positivos.

Adicionalmente, este trabalho está de acordo com os dados de notificações oficiais que indicam uma prevalência de animais soropositivos entre 4 e 5% no período de 1989 a 1998 (BRASIL, 2001), uma vez que a

prevalência da enfermidade com base na RFC foi de 3,6%.

Embora a prevalência da brucelose tenha situado-se em 3,7%, com base na RFC, 42,7% das propriedades avaliadas apresentaram, pelo menos, um animal positivo em seus rebanhos, caracterizando elevado percentual de rebanhos infectados na região estudada.

Os proprietários demonstraram total desinformação quanto à importância e à idade da vacinação e a realizavam na época do desmame, independentemente, da idade em que o desmame era realizado. Uma vez que a idade de desmame variou de 10 meses a 1 ano e 6 meses, observou-se a aplicação de forma inadequada da vacinação, considerando-se que a idade máxima indicada para imunização dos animais é 8 meses de idade (NICOLETTI, 1990).

O percentual de proprietários conscientes da necessidade de vacinação observado neste trabalho foi bastante reduzido, aspecto que favorece a disseminação da enfermidade, uma vez que o nível vacinal diminui a susceptibilidade em função da redução do número de animais infectados e, conseqüentemente, na prevalência intra-rebanho (NIELSEN *et al.*, 1990). Este aspecto reforça as normas oficiais do PNCEBT, em que a primeira medida, objetivando o controle da enfermidade é a vacinação do rebanho bovino (BRASIL, 2001).

O maior percentual (66,7%) de rebanhos infectados foi observado em propriedades que realizavam a compra e venda freqüente de animais, consideradas propriedades abertas e este alto índice está, diretamente, relacionado com o desconhecimento dos proprietários, no momento da aquisição de animais, relativo à exigência do atestado de brucelose, aspecto que possibilita a disseminação da enfermidade intra-rebanhos e inter-rebanhos. NIELSEN *et al.* (1990) consideram que os fatores que influenciam a transmissão inter-rebanhos envolvem a reposição de animais, a freqüência e origem da compra, a proximidade com rebanhos infectados e, ainda, o transporte de materiais infectados por aves e animais que se alimentam de matéria em decomposição, reforçando os dados obtidos neste experimento, relacionados à ausência de destino adequado dos fetos abortados a campo, possibilitando o transporte por aves com conseqüente contaminação de rebanhos vizinhos.

A maior positividade em rebanhos abertos foi evidenciada neste estudo concordante com NIELSEN *et al.* (1990).

Embora os proprietários tivessem conhecimento da enfermidade, foi observada ausência de medidas de profilaxia específicas e inespecíficas contra a brucelose bovina. Adicionalmente, embora soubessem do caráter zoonótico, demonstraram descrença na possibilidade de adquirirem a doença. As condições

higiênicas da maioria das propriedades favoreciam, não somente a disseminação da brucelose, como também de outras enfermidades.

CONCLUSÕES

- a) A ATA apresentou perfeita concordância com o 2-ME e a RFC, justificando sua utilização como método de triagem.
- b) A prova de 2-ME apresentou concordância perfeita com a RFC, reforçando a sua realização como método complementar.
- c) A região possui elevado percentual de rebanhos infectados, caracterizado principalmente por pequenas propriedades.
- d) A prevalência microrregional de brucelose bovina na Serra de Botucatu é de 3,7%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRAHIN, A.I.; SULIMAN, H.B.; SHOMMEIN, A.M.; BAKHEIT, H.A. Prevalence of bovine brucellosis in dairy herd pre and post isolation of reactors. *Bull. An. Health Prod. Africa.*, v.38, n.1, p.19-21, 1990.
- ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A. Serological diagnosis of bovine brucellosis an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose bengal tests. *Aust. Vet. J.*, v.51, p.57-63, 1975.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; RETZ, D.E. Las tecnicas de laboratorio en la brucellosis. *World Health Organ Monogr. Ser.*, v.55, p.55-133, 1976.
- ANÍBAL BELLO, N.; MOGOLLÓN, P.; MARTÍNEZ, H. Resultados comparativos de cinco metodos de diagnostico de la brucellosis. *Vet. Trop.*, v.1, p.79-87, 1976.
- BERCOVICH, Z.; GÜLER, L.; BAYSAL, T.; SCHREUDER, B.E.C.; ZUDERVELD, F.G. Evaluation of the currently used diagnostic procedures for the detection of *Brucella melitensis* in sheep. *Small Rumin. Res.*, v.31, p.1-6, 1998.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT: legislação. Brasília: 2001. 47p.
- CAMPERO, C.M.; LADDS, P.W.; HOFFMANN, D.; DUFFIELD, B.; WATSON, D.; FORDYCE, G. Immunopathology of experimental *Brucella abortus* strain 19 infection of the genitalia of bulls. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.24, p.235-246, 1990.
- CARRASCO, E.A.; UZAL, F.A.; NIELSEN, K. Comparacion de cuatro tecnicas de ELISA en la evaluacion de la respuesta com *Brucella abortus* Cepa 19. *Ars Med. Vet.*, v.27, p.51-57, 1995.
- CORRÊA, C.N.M.; GOTTSCHALK, A.F.; CORREA, W.M.; SILVA, A.S. DA; TERUYA, J.M. Brucelose e leptospirose bovina em São Manuel - Estado de São Paulo, Inquérito sorológico. *Biológico*, São Paulo, v.38, p.46-51, 1972.
- COSTA, M.D.M.; VIEGAS, E.A.; TEIXEIRA, E.M.L. Contribuição ao estudo da brucelose bovina na Bahia. I prevalência nos municípios de Itapetininga, Itambié, Itororó. *Bol. Inst. Biol. Bahia*, v.10, p.16-24, 1971.
- EAGLESOME, M.D. & GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen Part I: *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Trichomonas fetus*. *Vet. Bull.*, v.62, p.743-775, 1992.
- FEITOSA, M.H.; BITTAR, C.R.; GOMES, S.P. Brucelose: Levantamento sorológico no Estado de São Paulo no período de 1977 a 1987. *Vet. Zootec.*, v.3, p. 9-15, 1991.
- FIGUEIREDO, B.L. Brucelose como doença ocupacional: I. Aglutininas anti-*Brucella* sp em grupos ocupacionais dos frigoríficos da grande Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: II. Aglutininas anti-*Brucella* sp. em bovinos e suínos abatidos nestes frigoríficos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.37, p.385-407, 1985.
- GARCIA-CARRILLO, C. La brucellosis de los animales en la América y su relación con la infección humana. *Rev. Sci. Tech. O.I.E. (Off. Int. Epizoot.)*, v.6, p.43-295, 1987.
- JACQUES, I.; OLIVER-BERNARDIN, V.; DUBRAY, G. Efficacy of ELISA compared to conventional tests (RBPT and CFT) for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Vet. Microbiol.*, v.64, p.61-73, 1998.
- MAC MILLAN, A. Conventional serologic tests In: NILSEN, K. & DUNCAN, J.R. (Eds.). *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.154-300.
- MARIÑO, J.O.C.; GALLEGO, M.M.I.; SEDANO DE DELEON, L.; ALMANSA, M.J.; FRANK, J.F. Comparacion de tecnicas serologicas en la evaluacion de bovinos infectados naturalmente por *Brucella abortus*. Networking in brucellosis research: Report of the United Nations University Brucellosis Research Network, 1991. p.120-130.
- MEADOR, V.P. & DEYOE, B.L. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Vet. Pathol.*, v.26, p.513-515, 1989.
- MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MARCOS JUNIOR, G.; CROCI, A.J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.37, n.5, p.1-10, 2000.
- MELLO, M.T. Animal Brucellosis in Brazil. In: INTER-AMERICAN CONGRESS ON BRUCELOSIS, 3., 1950, Washington. *Proceedings*. Washington: 1950. p.56-89.
- MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L.; DIAS, H.L.T.; SOUSA, J.S.; VALE, W.G. Ocorrência de brucelose bovina no Estado do Pará confirmada por métodos sorológicos. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.22, n.3, p.117-121, 2000.
- MORGAN, W.J.B.; MACKINNON, D.J.; LAWSON, J.R.; CULLEN, G.A. The rose Bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet. Rec.*, v.85, p.636-641, 1969.
- NICOLETTI, P. Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.30, p.1811-1861, 1969.
- NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v.24, p.698-699, 1980.
- NICOLETTI, P. Vaccination. In: NIELSEN, K.H. & DUNCAN, J.R. (Eds.). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC, 1990. p.283-300.

- NIELSEN, K. & DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press., 1990. 453 p.
- POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.55-62, 2002.
- RADOSTITIS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. *Veterinary medicine: a textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 8.ed. London: Bailliere Tindall, 1995. p.570-579.
- SAMARA, S.I.; SEIXAS, L.F.Z.; OLIVEIRA, M.A. Diagnóstico da situação sanitária do gado leiteiro em Pitangueira-SP: II – brucelose. *Ars Vet.*, v.12, p.137-140, 1996.
- SARAVI, M.A.; GREGORET, R.J.; WRIGHT, P.F.; GALL, D.E.J. *Comparison of an indirect enzyme immunoassay and conventional serological techniques for the detection of bovine antibody to Brucella abortus. Regional network for Latin America on animal disease diagnosis using immunoassay and labelled DNA probe techniques. Proceedings of a final Research Coordination Meeting of FAO/IAEA/SIDA*. Vienna: IAEA, 1995. p.151-162.
- SMITH, B.P. *Tratado de medicina interna de grandes animais*. São Paulo: Manole, 1993. p.250, 1387, 1394-1395, 1416, 1418.
- SZULOWSKI, K.; IWANIAK, I.; PILASZEK, J.; TRUSZCZYNSKI, M.; CHROBOCINSKA, M. The ELISA for the examination of hare sera for anti-*Brucella* antibodies. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.22, p.33-40, 1999.
- UZAL, F.A.; CARRASCO, A.E.; NIELSEN, K.; ECHAIDE, S.; CABRERA, R.E. An indirect ELISA using a monoclonal anti TgG1 enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v.52, n.1-2, p. 175-180, 1996.
- VASCONCELLOS, S.A.; IFO, F.H.; CORTES, J.A. Bases para a prevenção da brucelose animal. *Comun. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São. Paulo*, v.11, p.25-36, 1987.

Recebido em 25/5/04

Aceito em 26/6/04