

ESTUDO COMPARATIVO DOS TESTES 2-MERCAPTOETANOL E REAÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO NO SORODIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE BOVINA

L.M. Paulin, G.E.S. Prado, I.S.P. Federsoni, A.C. Teixeira, V. Castro, M.E. Genovez

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: lispaulin@biologico.br

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo comparar o teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) em relação à reação de fixação do complemento (RFC') no sorodiagnóstico da brucelose, ambos escolhidos como confirmatórios pelo Programa Nacional de Combate à Brucelose Bovina do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Brasil. Para tanto, foram processadas 77 amostras de soro de fêmeas bovinas vacinadas, com idade igual ou superior a 24 meses (grupo A) e 74 amostras de soro de fêmeas de bovinos não vacinadas (grupo B), totalizando 151 animais pertencentes a diferentes tipos de exploração e procedentes de cinco estados brasileiros. Foram identificados, através da RFC', 40,2% de animais reatores e 35,1% para o grupo B. O teste estatístico utilizado para analisar os resultados foi o de McNEMAR, com intervalo de confiança de 5%, não havendo diferença estatística significativa entre os mesmos. O teste KAPPA foi usado como medida de concordância entre as provas e o resultado foi de 91,9% para o grupo A e 88,5% para o grupo B. Baseados nos dados, calculou-se a sensibilidade, a especificidade e a concordância do 2-ME em relação à RFC', teste padrão para a doença. Observou-se sensibilidade do 2-ME de 96,8% e 100% e especificidade 95,6% e 91,7%. Conclui-se que o 2-me é um ótimo teste confirmatório no sorodiagnóstico da brucelose bovina, revelando, também neste trabalho, possuir boa sensibilidade.

PALAVRAS-CHAVE: Brucelose bovina, 2-Mercaptoetanol, reação de fixação do complemento, sorodiagnóstico.

ABSTRACT

COMPARATIVESTUDY OF 2-MERCAPTOETHANOL AND COMPLEMENT FIXATION TEST IN BRUCELLOSIS DIAGNOSIS IN BOVINE SERUM. The objective of the present study was to compare two tests commonly applied in brucellosis diagnosis in bovine serum, 2-Mercaptoethanol (2-ME) and Complement Fixation Test (RFC'). Both tests have been chosen as confirmatory means by the National Program Against Bovine Brucellosis of the Brazilian Agriculture Ministry [*Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*]. In the trial, 77 serum samples from vaccinated female bovines (group A), 24 months old or older, and 74 samples from non-vaccinated females (group B) were analyzed. These 151 samples came from five Brazilian states. RFC' identified 40.2% reactor animals for group A and 35.1% for group B. Statistical comparison of the results was performed by the McNEMAR test, with a 5% confidence interval. There was no statistically significant difference between the results. The KAPPA test was used as an agreement measure between the tests and the result was 91.9% for group A and 88.5% for group B. Based on these data, the sensitivity, specificity, and agreement between 2-ME and RFC' were analyzed. Sensitivity of 2-ME was 96.8% and 100%, and specificity was 95.6% and 91.7%. The 2-ME test is a good confirmatory test for the serological diagnosis of the bovine brucellosis, besides presenting adequated sensitivity, as seen in this trial.

KEY WORDS: Bovine brucellosis, 2-Mercapthoetanol, Complement Fixation Test, serum diagnosis.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas técnicas para o aperfeiçoamento do sorodiagnóstico não necessariamente resulta em testes mais adequados do que os já

existentes, devendo-se considerar a aplicação daqueles já pertencentes ao sorodiagnóstico convencional e que muitas vezes não foram devidamente explorados. Existem bons testes já consagrados para o diagnóstico da doença, como a reação de fixação do complemento

(RFC') e os relativamente novos, como os imunoenzimáticos ou o teste de polarização fluorescente (DAJER, 1999), mas que, em geral, não podem ser aplicados em pequenos laboratórios devido ao elevado custo inicial a ser empregado na sua implantação, além da necessidade de treinamento de pessoal capacitado. Desta forma, deve-se utilizar da melhor maneira possível os testes disponíveis, como o teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME), que apresenta baixo custo, validade e simplicidade na sua execução (ALTON, 1975).

No lançamento do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) no Brasil, em 11 de janeiro de 2001, foi previsto que os médicos veterinários e laboratórios fossem credenciados para que pudessem realizar o sorodiagnóstico da brucelose. Foram preconizados o 2-ME e a RFC' como provas confirmatórias (BRASIL, 2001). Por este motivo, o presente trabalho propõe analisar a acurácia destes dois testes, principalmente, a do 2-ME, utilizando a RFC' como prova padrão.

As diferenças nos desempenhos dos testes clássicos baseiam-se, sobretudo, nos anticorpos detectáveis. Assim sendo, a quantidade (em $\mu\text{g/mL}$) de isotipos de IgG contra *B. abortus* necessária para causar sinal nos testes clássicos usados no sorodiagnóstico da brucelose bovina difere, sendo o ELISA IND. e a RFC' os testes com limiar de detecção mais baixos (ALLAN, 1976; WRIGHT & NIELSEN, 1990).

A análise dos resultados dos testes, principalmente, em situações onde a prevalência da doença é baixa deve ser feita com critério. Num estudo analítico dos resultados, o falso positivo ocorre principalmente devido à detecção de IgM. As reações antígeno-anticorpo específicas para a doença são caracterizadas pela detecção da IgG₁ que, embora bivalente, é muito ávida devido à alta afinidade pelos epítomos bacterianos (FERRI *et al.*, 1977).

A SLT, executada em pH neutro, demonstra alta sensibilidade analítica na detecção dos isotipos bovinos com uma exceção importante: a IgG₁ (WRIGHT & NIELSEN, 1990). ALTON (1978) refere que a SLT, em vários experimentos, demonstrou sensibilidade e especificidade baixas em relação a outros testes convencionais. Assim, os soros são tratados visando eliminar a atividade aglutinante da IgM, com o objetivo de aumentar a especificidade da SLT.

O teste do antígeno acidificado tamponado (TAAT) foi desenvolvido a partir da observação de que a IgG₁ bovina é menos ativa em pH neutro, mudando o seu comportamento bioquímico em meio ácido. Assim sendo, o pH $3,65 \pm 0,05$ aumenta o poder de aglutinação da IgG₁, reduz a reatividade da IgM e destrói aglutininas inespecíficas (WRIGHT & NIELSEN, 1990; BISHOP *et al.*, 1994). NICOLETTI (1969) demonstrou que o TAAT detectou 95% de animais

positivos ao exame direto. HUNTER & ALLEN *et al.* (1972), ao compararem diferentes provas sorológicas, constataram que o TAAT detectou o maior número de reatores positivos ao exame direto. Entretanto, como se trata de um processo físico (acidificação do meio), é provável que nem todas as IgM tenham sua reatividade reduzida. ALLAN *et al.* (1976) concluíram que o teste também detecta IgM.

O 2-ME e a RFC' fundamentam sua especificidade de forma diferenciada: o 2-ME inativa a atividade aglutinante da IgM mediante processo químico, reduzindo as pontes dissulfídricas da sua estrutura pentamérica, degradando-a em cinco sub unidades não aglutinantes (FERRI *et al.*, 1977; TIMONEY *et al.*, 1988). Essas sub unidades conservam suas características de antigenicidade, mas deixam de ser anticorpos plurivalentes e passam a se comportar como anticorpos univalentes. Ainda que as sub unidades estejam integradas por suas cadeias pesadas e leves, ao combinarem-se com o antígeno não originam complexos suficientemente grandes para provocarem o fenômeno da aglutinação, provavelmente devido a algum impedimento estérico em consequência de sua nova conformação espacial (FERRI, *et al.*, 1977).

O 2-ME detecta tanto IgG₁ como IgG₂ (NIELSEN, 1984). Embora a tendência analítica a favor da detecção da IgG₁ sobre a IgG₂ não seja tão grande quanto nos testes tamponados, é interessante notar que o tratamento com o 2-ME provoca aumento na sensibilidade do teste, pela promoção da reatividade de IgG₁, aumentando a tendência em detectá-la, enquanto que a reatividade da IgG₂ está reduzida (NIELSEN & DUNCAN, 1990; WRIGHT & NIELSEN, 1990). Provavelmente o fenômeno ocorra devido ao pH ácido (5,5) que a droga proporciona ao meio contendo soro e 1 mL de 2-ME a 0,714% (ALTON, 1975; BADEN, 2002). Desta maneira, embora haja antagonismo que rege a especificidade e sensibilidade nos testes em geral (ou seja, o aumento da especificidade promove a diminuição da sensibilidade e vice-versa), no 2-ME esta condição nem sempre ocorre.

NIELSEN *et al.*, (1995) citam a IgG₁ como único anticorpo detectado no RFC' em bovinos, o que eleva a especificidade do teste e não chega a interferir no seu desempenho, pois a detecção de IgG₁ compensa a restrição da IgG₂, além da resposta de IgG₁ ser predominante sobre IgG₂ em animais naturalmente infectados (WRIGHT & NIELSEN, 1990). O Código Zoonosológico Internacional da OIE refere a RFC' como importante suporte técnico, além de ser o teste exigido pelo comércio internacional de animais e produtos de origem animal (OIE, 2002).

Na RFC', o excesso ou predominância de IgG₂ pode induzir o fenômeno de prozona e reações falso negativas. Não está muito claro quais as causas desse fato, mas as sugeridas são: idade avançada do animal,

exposições repetidas ao agente, condições ambientais levando a estresse e a transferência ativa de IgG₁ para o colostro no período peri-parto (CHAPPEL, 1989). BRANDON *et al.* (1971) também referem-se ao mecanismo fisiológico de transferência ativa de IgG₁ para o colostro neste período, fazendo com que a concentração de IgG₁ circulante não seja suficiente para propiciar o sinal. Conforme afirmaram TIMONEY *et al.* (1988) a IgG₂ bloqueia competitivamente o acesso de IgG₁ ao antígeno, na RFC'. Ainda que a IgG₂ não fixe complemento, reage normalmente com o antígeno, gerando o prozona. O resultado é uma reação falso negativa. Nesses casos, o 2-ME tem importante papel na análise final do sorodiagnóstico da amostra em estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: foram processadas 151 amostras de soro de fêmeas de bovinos com idade entre 36 e 60 meses, não levando em consideração a forma de criação de exploração econômica, procedentes de cinco estados brasileiros. Todos os soros foram submetidos às duas provas (2-ME e RFC'). Executou-se primeiro o 2-ME seguido da RFC', para preservar o protocolo do 2-ME, que não prescreve a inativação do soro. Os animais foram divididos em dois grupos: **Grupo A:** 77 soros de animais vacinados com a amostra viva de *B. abortus* estirpe B19. **Grupo B:** 74 soros de animais não vacinados.

Antígeno: utilizou-se para o 2-ME, para a RFC' e para a soroaglutinação lenta em tubos (SLT) o mesmo antígeno com concentração de massa bacteriana de 4,5%, sem corante, padronizado a partir da cepa 1119-3 de *Brucella abortus* inativada pelo calor, produzido no Instituto Biológico de São Paulo, de acordo com o protocolo descrito pelo CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES (1969).

Testes: O 2-ME foi executado e interpretado conforme ALTON *et al.* (1975) e para permitir melhor análise comparativa, objeto deste trabalho, a escala de diluição do soro estendeu-se até 1:400. O teste foi considerado como reator de acordo com a tabela do PNCEBT, executado junto com a SLT (BRASIL, 2001).

A execução RFC' a quente em microplaca, assim como a titulação da hemolisina, complemento e antígeno foram feitos de acordo com a técnica descrita por ALTON (1988). Utilizou-se soro de cobaio como complemento e antisoro de coelho como hemolisina. As reações foram executadas em placas de poliestireno de fundo em "U" com 25 µL de soro a uma diluição inicial de dois, com igual volume de antígeno e soro de cobaio, contendo cinco unidades de complemento capazes de hemolisar 50% das hemácias de carneiro sensibilizadas pela hemolisina (sistema hemolítico). Após a placa ser incubada por 30 minutos em estufa

bacteriológica a 37° C, o mesmo volume de sistema hemolítico foi colocado, incubando-se novamente a placa por mais 30 minutos. O título do soro foi obtido determinando a recíproca da sua diluição, onde ocorreu fixação de 50% de complemento. Converceu-se o resultado em Unidades Internacionais de acordo com a técnica padronizada no Laboratório Central de Veterinária em Weybridge, Reino Unido, que considera positivos soros com títulos iguais ou acima de 20 UI (MINISTRY OF AGRICULTURE, 1978). Empregou-se uma escala de lise para a leitura das reações (grau de hemólise).

Os testes foram executados contemporaneamente utilizando a interpretação em série, visando o aumento de especificidade - valor preditivo positivo (TRUSFIELD, 1986).

Análise estatística: para verificar se houve independência entre o resultados das duas provas, utilizou-se o teste de McNemar, considerando os resultados como reatores e não reatores aos testes (MACLURE & WILLET, 1987). O teste KAPPA foi usado como medida de concordância entre testes sob condição real de acordo com TRUSFIELD, 1986.

RESULTADOS

GRUPO A: Animais vacinados

O resultado do teste aplicado mostra que houve concordância de 96,1% entre o 2-ME e a RFC' (74/77). A sensibilidade encontrada foi de 96,8% e a especificidade 95,6% (Tabela 3). O estudo identificou 40,2% (31/77) de animais positivos para brucelose na prova de RFC'. Aplicando-se o teste de McNemar para um intervalo de confiança de 5% obteve-se $p = 1.000$, não havendo diferença estatística significativa entre os resultados discordantes dos dois testes, mostrando independência entre os mesmos. A concordância ao teste KAPPA obtida foi de 91,9%. Os resultados obtidos no 2-ME comparado com a RFC' podem ser observados na Tabela 1.

GRUPO B: Animais não vacinados

O resultado do teste aplicado mostra concordância de 94,6% entre a 2-ME e a RFC'. A sensibilidade encontrada foi de 100% e, a especificidade, 91,7% (Tabela 3). O estudo identificou 35,1% (26/74) de animais reatores para brucelose na prova de RFC'. Aplicando-se o teste de McNemar para um intervalo de confiança de 5% obteve-se $p = 0,3711$, não havendo diferença estatística significativa entre os resultados discordantes dos dois testes, mostrando independência entre os mesmos. A concordância ao teste KAPPA obtida foi de 88,5%. Os resultados obtidos no 2-ME comparado com a RFC' podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 1 - Resultado da prova do 2-ME e a RFC' para o sorodiagnóstico da *Brucella abortus* em 77 amostras do grupo A: animais vacinados.

Idade	2-ME	RFC'									
		Negativos				Positivos					
		nr.*	0 a <20	total	≥20 a 106,4	>106,4 a 212,8	>212,8 a 425,6	>425,6 a 851,2	>851,2	total	total
	*não reatores	42	02	44 (d)	01					01 (c)	45
	reatores										
	1:25	02		02							02
36	1:50 i				04					04	04
a	1:100 i				07					07	07
60	1:100				02	01				03	03
meses	1:200 i						01			01	01
	1:200					01	02			03	03
	1:400 i							01		01	01
	≥ 1:400				01			03**	07***	11	11
	total de reatores	02	00	02 (b)	14	02	03	04	07	30 (a)	32
Total		44	02	46	15	02	03	04	07	31	77

* Não reagente

** Ocorrência do fenômeno de prozona em três amostras (positivando no título 1:400).

*** Ocorrência do fenômeno de prozona em duas amostras (positivando no título 1:400).

Tabela 2 - Resultado da prova do 2-ME e a RFC' para o sorodiagnóstico da *Brucella abortus* em 74 amostras do grupo B: animais não vacinados.

Idade	2-ME	RFC'							total		
		Negativo			Positivos						
		nr.*	0 a <20	total	≥20 a 106,4	>106,4 a 212,8	>212,8 a 425,6	>425,6 a 851,2	>851,2	total	total
	não reatores	44		44 (d)						00 (c)	44
	reatores										
36	1:50	01	01	02	02					02	04
a	1:100		02	02	04					04	06
60	1:100				01					01	01
meses	1:200 i				06	05	03		05	19	19
	1:200										
	total de reatores	01	03	04 (b)	13	05	03		05	26 (a)	30
Total		45	03	48	13	05	03		05	26	74

* nr.: Não reagente

Tabela 3 - Valores epidemiológicos relativos obtidos das respostas ao 2-ME nos soros reatores à brucelose, usando o teste de RFC' como referência. Grupo A (animais vacinados) e Grupo B (animais não vacinados).

valores epidemiológicos relativos - Grupo A						
2-ME x RFC'	prevalência real	sensibilidade	especificidade	concordância	falso positivo	falso negativo
	31/77	30/31	44/46	74/77	2/46	1/31
%	40,3	96,8	95,6	96,1	4,4	3,2
valores epidemiológicos relativos - Grupo B						
2-ME x RFC'	prevalência real	sensibilidade	especificidade	concordância	falso positivo	falso negativo
	26/74	26/26	44/48	70/74	4/48	0/28
%	35,1	100	91,7	94,6	8,3	0

DISCUSSÃO

A RFC' é considerada a melhor prova de sorodiagnóstico para a confirmação da brucelose, apresentando a melhor correlação com os isolamentos em animais natural ou experimentalmente infectados (NIELSEN, 1995). A variação da RFC' a quente, utilizada neste estudo, é mais prática, diminui as reações anticomplementares e elimina a IgM, aumentando a especificidade do teste (CHAPPEL, 1989). A técnica detecta precocemente IgG₁ no soro, em torno do 14º dia (HILL, 1963) e também, devido ao seu baixo limiar de detecção, é capaz de revelar casos crônicos, onde a IgM já desapareceu a IgG₁ está em baixa concentração (KRUZE, 1975).

Os testes 2-ME e a RFC' têm alta especificidade na detecção de anticorpos anti *Brucella abortus* (UZAL *et al.*, 1995; NIELSEN, 1995), desempenhando papel fundamental na validação do sorodiagnóstico da brucelose bovina, porque confirmam o resultado das provas de triagem (DAJER *et al.*, 1999). Dessa maneira, a utilização de um bom teste confirmatório pode evitar o sacrifício de animais sãos (WRIGHT & NIELSEN, 1990).

NICOLETTI (1969) relatou concordância entre o 2-ME e a RFC', cerca de 97%, ratificando os resultados encontrados neste estudo, já que a concordância obtida ao teste KAPPA foi de 91,9% (grupo A) e 88,5% (grupo B) e os valores obtidos na Tabela 3.

Observou-se sensibilidade do 2-ME de 96,8% e 100% e especificidade 95,6% e 91,7% (Tabela 3), valores semelhantes à literatura consultada: sensibilidade de 89,6% (POESTER *et al.*, 1998) e especificidade de 97,0% (NICOLETTI & MURASCHI, 1966), 93,1% (POESTER *et al.*, 1998) e 89,37% (UZAL *et al.*, 1998).

A obtenção de dois reatores ao 2-ME e não reatores à RFC', neste estudo, sugere a detecção de IgG₂ no primeiro teste, porém não detectável no segundo (LEVIEUX, 1973; QUINN *et al.*, 1984). A ocorrência de fenômeno de prozona (FERRI *et al.*, 1977) somente no RFC' também sugere a não detecção da IgG₂ pelo 2-ME. Se por um lado a promoção da reatividade da IgG₁ e a detecção tanto de IgG₁ quanto de IgG₂ explique o bom desempenho do 2-ME, na RFC' sobretudo o baixo limiar de detecção para IgG₁ caracterizariam seu excelente desempenho, superando o 2-ME e ratificando a sua utilização como *gold standard* para a doença.

No Grupo A, comparando-se os resultados obtidos no 2-ME com os da RFC', observa-se que dos 46 não reatores à RFC', 44 também não foram reatores ao 2-ME. Das 32 amostras reatoras ao 2-ME, somente duas foram qualificadas como não reatoras ao RFC', resultando numa percentagem de falsos positivos de 4,4% (2/46). Dos 45 soros não reatores ao 2-ME, todos foram não reatores à RFC', não ocorrendo resultados falsos negativos. Dos 32 soros reatores ao 2-ME, 30

também foram reatores à RFC' e dos 31 soros reatores a esta prova, todos foram reatores ao 2-ME.

Observou-se relação direta crescente entre os títulos positivos apresentados nas duas provas, ou seja, os resultados seguem um padrão dentro da zona de interpretação positiva (Tabela 1): para os reatores na faixa de > 20 a 106,4 na RFC', 86,7% (13/15) os resultados obtidos ao 2-ME flutuaram entre 1:50i ou 1:100 e 6,7% (1/15), igual ou acima de 1:400. Para a faixa > 106,4 a 212, 50% dos resultados do 2-ME resultaram em um título 1:100 e 50% 1:200. Entre 212,8 e 425,6, os títulos variaram em 1:200i - 33,3% (1/3) e 1:200 - 66,7% (2/3). Para os títulos > 425,6 a 851,2, os títulos variaram entre 1:400i 25% (1/4) e 1:400 75% (3/4). Acima de 851,2, 100% dos títulos obtiveram 1:400 (7/7). Em cinco amostras reatoras ao 2-ME ao título igual ou acima de 1:400 ocorreu o fenômeno de prozona à RFC': três a um título entre > 425,6 e 851,2 e duas num título acima de 851,2 (Tabela 1).

Sobre os discordantes, vale lembrar que os dois reatores ao 2-ME e negativos à RFC' tiveram títulos mínimos (1:25), o mesmo ocorrendo com o resultado positivo à RFC' e negativo ao 2-ME (> 20 a 106,4 UI). Os dois soros que reagiram na faixa de 0 a < 20 UI (negativos para a prova) foram não reatores ao 2-ME, sugerindo maior sensibilidade da RFC' em relação ao 2-ME, devido ao seu limiar de detecção ser mais baixo (KRUZE, 1975; SECRETARIA DE AGRICULTURA, 1995). As correlações entre os dois testes são demonstradas na Tabela 1.

No Grupo B, a relação direta crescente entre os títulos positivos apresentados nas duas provas também ocorreu neste grupo: para os reatores na faixa de > 20 a 106,4 na RFC', 46,2% (6/13) dos resultados obtidos ao 2-ME flutuaram entre 1:100i ou 1:100 e 53,8% (7/13) entre 1:200i a 1:200. Para a faixa > 106,4 a 212, 100% dos resultados do 2-ME resultaram em título 1:200 (5/5), o mesmo ocorrendo entre 212,8 e 425, com títulos a 1:200 (3/3) e acima de 851,2, 100% dos títulos deram 1:400 (7/7) - Tabela 2.

Sobre os discordantes, quatro resultados reatores ao 2-ME e negativos à RFC' tiveram títulos que variaram entre 1:50 e 1:100. Três destes soros reagiram na faixa de 0 a < 20 UI (negativos para a prova), sugerindo a presença de IgG₂, que pode ser detectada no 2-ME, mas não na RFC' (NIELSEN *et al.*, 1984). As correlações entre os dois testes são demonstradas na Tabela 2.

CONCLUSÃO

Utilizando a RFC' como técnica padrão para o sorodiagnóstico da brucelose bovina, ratifica-se o 2-ME como teste confirmatório e, ainda, que sua aplicação seja para validar os testes de triagem, revelou possuir também boa sensibilidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dra. Cláudia Del Fava, Pesquisador Científico do Instituto de Zootecnia, pela sua colaboração na leitura crítica do presente texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, G.S.; CHAPPEL, R.J.; WILLIAMSON, P.; MACNAUGHT, D.J. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *J. Hyg. Camb.*, v.76, p.287-298, 1976.
- ALTON, G.G. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. *Aust. Vet. J.*, v.54, p.551-557, 1978.
- ALTON, G.G. The control of bovine brucellosis. Recent developments. *World Anim. Rev.*, v.39, p.17-24, 1981.
- ALTON, G.G.; JONES, I.M.; PIETZ, D.E. Laboratory technique in brucellosis. 2.ed., Geneva: *World Health Organization*, 1975. 175p.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. 545p.
- BADEN, W. *Reactivos productos químicos*. Darmstadt: Merck KgaA, 2002. p686.
- BISHOP, G.C.; BOSMAN, P.P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J.A.N.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (Eds.). *Infectious diseases of livestock*. Austin: Texas A&M University Press, College Station, 1994. v.2, p.1053-1066.
- BRASIL. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina. 9p. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Defesa Animal. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>>. Acesso em: 8 fev. 2001.
- BRANDON, M.R.; WATSON, D.C.; LASCELLES, A.K. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. *Aust. J. Exp. Biol. and Med. Sci.*, v.49, p.613-623, 1971.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. *Elaboration y normalizacion de antígenos para las pruebas de sero - aglutinacion de la brucellosis*. Ramos Mejia: Organizacion Panamericana de la Salud, Organizacion Mundial de la Salud, 1969, 21p. (Nota Técnica n.3, rev.3).
- CHAPPEL, R.J. Diagnosis of bovine brucellosis: principles, practice and problems. *Surveillance*, v.16, n.2, p.3-5, 1989.
- DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E.; ZAPATA, D.; VILLEGAS, S.; GUTIÉRREZ, E.; PEÑA, G.; GURRÍA, F.; NIELSEN, K.; GALL, D.; Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in México. *Prev. Vet. Med.*, v.40, n.3-4, p.67-73, 1999.
- FERRI, R.G.; CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C. *Imunología*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1977. 316p.
- KRUZE, M.V. Metodos de diagnostico en el control de brucelosis bovina. II. Metodos serologicos. *Arch. Med. Vet.*, v.7, n.2, p.52 - 64, 1975.
- HUNTER, D. & ALLEN, J. An evaluation of milk and blood test used to diagnose brucellosis. *Vet. Rec.*, v.91, p.310-312, 1972.
- LEVIEUX, D. Immunoglobulines bovines et brucellose. II. Activité des IgG1, IgG2 et IgM du serum dans des reactions d' aglutination, de Coombs, fixation du complement et dans le test au Rose Bengale. *Ann. Rech. Vet.*, v.5, p.343-353, 1973.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe Publishing, 1996. 648p.
- MACLURE, M.; WILLET, W.C. Misinterpretation and missure of the kappa statistic. *Am. J. Epidemiol.*, v.126, p.161, 1987.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. *Brucellosis diagnosis standard laboratory techniques*. New Haw: Central Veterinary Laboratory, 1978. 52p.
- NICOLETTI, P. Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.30, p.1811-1816, 1969.
- NICOLETTI, P. & MURASCHI, T.F. Bacteriologic evaluation of serologic test procedures for the diagnosis of brucellosis in problems cattle herds. *Am. J. Vet. Res.*, v.27, p.689-694, 1966.
- NIELSEN, K. Developend of Live Brucella Vaccines. In: ADAMS, L.G. (Editor). *Advances in Brucellosis Research*. Texas A&M University Press, College Station, 1990. p.251-276.
- NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. *Arch. Med. Vet.*, v.27, n.Extraordinary, p.9-17, 1995.
- NIELSEN, K. & DUNCAN, J.R. *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. 453p.
- NIELSEN, K.; HECH, F.; WAGNER, G.; STILLER, J.; ROSENBAUM, B.; PUGH, R.; FLORES, E. Comparative assessment of antibody isotypes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assays. *Prev. Vet. Med.*, v.2, p.197-204, 1984.
- ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. *Códigozoosanitário internacional, Enfermidades dos bovinos da lista B, Recomendaciones aplicáveis à enfermidades específicas*. Disponível em: <<http://www.oie.int.htm>>. Acesso em: 8 julho 2002.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucellosis.*, 1986. Ginebra: 149p. (Série de informes técnicos, 740).
- POESTER, F.P.; RAMOS, E.T.; THIERSSEN, S.V. Application of enzyme linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis in Rio Grande do Sul, Brazil. In: COLLING, A. (Ed.). *Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1998. p.61-68.
- SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL. *Manual de actualizacion tecnica para la aprobacion del medico veterinario en tuberculosis bovina y brucelosis*. Palo Alto: 1995. 99p.
- TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. *Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals*. London: Comstock Publishing Associates. Division of Cornell University Press, 1988. p.135-144.
- TRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. London: Butterworth, 1986. 273p.

UZAL, F.A.; CARRASCO, E.A.; ECHAIDE, S.; NIELSEN, K.; ROBLES, C.A. Evaluation of an indirect ELISA for diagnosis of bovine brucellosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.7, n.4, p.473-475; 1995.

UZAL, F.A.; CARRASCO, E.A.; ECHAIDE, S.; NIELSEN, K.; ROBLES, C.A. Evaluation of na indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in Patagonia, Argentina. In: COLLING, A. (Ed.). *Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1998. p.69-76.

WRIGHT, P. & NIELSEN, K.H. Current and future serological methods. In: ADAMS, G. (Ed.). *Advances in brucellosis research*. Austin: Texas A&M University Press, College Station, 1990. p.305-319.

Recebido em 28/8/02

Aceito em 2/11/02