

ARTIGO DE REVISÃO

BRUCELOSE

L.M. Paulin

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

RESUMO

Em 10 de janeiro de 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento lançou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Esse programa deverá ser implementado por todas as unidades federativas brasileiras, respeitando suas especificidades. Assim sendo, com o intuito de colaborar com esse processo, esta publicação, composta por uma revisão da doença, foi elaborada abordando os seguintes temas: definição, importância sócio-econômica, etiologia, patogenia, mecanismos de transmissão, imunologia, vacina B19, diagnóstico (com ênfase para os métodos de sorodiagnóstico) e controle da brucelose.

PALAVRAS-CHAVE: Brucelose, abortamento, sorodiagnóstico, epidemiologia.

ABSTRACT

BRUCELLOSIS. On January 10th, 2001, the Brazilian Ministry of Agriculture [Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento] launched the National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis [Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)]. This program is to be implemented in all Brazilian states according to the specificities of each of them. This article was written in order to collaborate with this process. It is a review on brucellosis and involves the following aspects: definition, socio-economic importance, etiology, pathogeny, mechanisms of transmission, immunology, strain B19 vaccine, diagnosis (with an emphasis in serodiagnosis) and control of the disease.

KEY WORDS: Brucellosis, abortion, serodiagnosis, epidemiology.

A brucelose é uma antropozoonose de evolução preferencialmente crônica, caracterizada pela infecção das células do sistema mononuclear fagocitário, provocada por uma bactéria pertencente ao gênero *Brucella*. Compromete especialmente o sistema reprodutivo ocasionando, freqüentemente, abortamento no terço final da gestação (METCALF *et al.*, 1994). Além dos problemas causados à saúde pública, a brucelose também gera prejuízos econômicos ao tornar o produto vulnerável às barreiras sanitárias, comprometendo a sua competitividade no comércio internacional (BRASIL, 2003). A Organização Internacional de Epizootias (OIE) classifica a brucelose como doença da lista B, onde estão incluídas as enfermidades que têm importância sócio-econômica e/ou para saúde pública e conseqüências significativas no comércio internacional de animais e seus produtos (ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZONTIES, 2002).

A doença causa uma diminuição da produção de carne entre 10 e 15%; dilatação do intervalo entre partos de 11,5 para 20 meses, aumento de 30% na taxa de reposição dos animais, queda de 15% no nascimento

de bezerros e queda de 10 a 24% na produção leiteira (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986; OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZONTIES, 1987; GARCÍA-CARRILLO, 1990; SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL, 1995). Ocorre também perda de prestígio para as propriedades acometidas pela doença. O caráter zoonótico da doença também acarreta perdas, na maioria das vezes relacionadas ao custo do tratamento humano e ao período de ausência no trabalho durante a convalescença.

As brucelas podem ser divididas em dois grupos antigenicamente distintos: as lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) e as rugosas - *B. ovis* e *B. canis* (METCALF, 1994). Não há especificidade quanto ao hospedeiro que infectam, mas existe uma predileção por determinada espécie animal. Assim, a *B. abortus* acomete preferencialmente bovinos, a *B. suis* suínos, a *B. melitensis* caprinos, a *B. ovis* ovinos e a *B. canis* canídeos (CARTER, 1991). ROSS *et al.* (1994), no Reino Unido isolaram, a partir de mamíferos marinhos, um grupo de brucelas distinto das espécies conhecidas, as quais foram referidas provisoriamente como *B. maris* (CORBEL, 1997).

A capacidade de sobrevivência da brucela em condições naturais é grande se comparada a de outras bactérias patogênicas não esporuladas, sobretudo, em ambiente úmido ao abrigo da luz solar direta, pH neutro e em ambiente contendo matéria orgânica (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986). Geralmente, a remoção dos animais infectados, a limpeza e a desinfecção de locais contaminados (eliminar toda matéria orgânica antes da aplicação dos produtos é essencial para que atinjam sua total eficácia) e o vazio sanitário de no mínimo dois meses são suficientes para evitar a sua transmissão (GRASSO-PAULIN, 2000). Submetida à ação de desinfetantes como produtos clorados (2,5% de cloro ativo), soluções de formaldeídos a 2% em temperatura ambiente acima de 15° C ou compostos fenólicos a 2,5%, a brucela é eliminada no prazo máximo de 15 minutos. Álcool 70° destrói prontamente a bactéria. Sob a ação do carbonato de cálcio (1:10), é destruída em 30 minutos (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986).

As brucelas entram no organismo hospedeiro pelas mucosas do trato digestivo, genital ou nasal, conjuntiva ocular ou por soluções de continuidade da pele. A principal porta de entrada para os bovinos é a mucosa orofaríngea (BISHOP *et al.*, 1994). Em seguida, são fagocitadas principalmente pelos macrófagos e carregadas até os linfonodos regionais (como pode ser observado na Figura 1), onde se multiplicam e podem permanecer por semanas a meses (BATHKE, 1988; BISHOP *et al.*, 1994). Após esta multiplicação inicial, ganham a corrente sanguínea por meio do duto torácico, dentro dos macrófagos ou livres no plasma. Vários períodos de bacteremia podem ocorrer. A partir da circulação, difundem-se para os tecidos do hospedeiro, colonizando principalmente órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, quais sejam, baço, fígado e linfonodos (principalmente os supra-mamários), onde podem acarretar alterações inflamatórias e anátomo-patológicas caracterizadas por granulomas difusos levando à esplenomegalia, hepatomegalia e, às vezes, hiperplasia linfóide (BISHOP *et al.*, 1994).

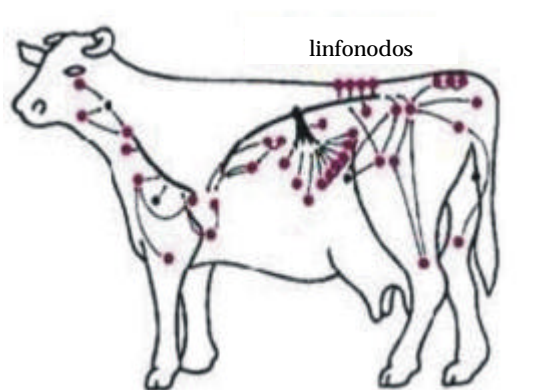


Fig. 1 - Localização da brucela nos linfonodos.
Fonte: Adaptado de <http://trc.ucdavis.edu/mjguinan/apc100/modules/reproductive>, 2003.

Os órgãos de predileção são aqueles em que há maior disponibilidade de elementos necessários para seu metabolismo, como o eritrítol (álcool polihídrico de quatro carbonos), que está presente no útero gravídico, tecidos mamários e ósteo articulares e órgãos do sistema reprodutor masculino (CARTER, 1991). A partir do quinto mês de gestação, a concentração do eritrítol eleva-se atingindo níveis máximos próximo ao parto, estimulando a multiplicação da bactéria de forma crescente (BISHOP *et al.*, 1994). Na fêmea, a infecção deixa de ser latente geralmente no terço final da gestação, quando o tecido córion-alantoideano está bem desenvolvido e há disponibilidade dos metabólitos. Neste período, a multiplicação da brucela é intensa e as endotoxinas liberadas após sua destruição (CARTER, 1991) geram lesões na placenta, principalmente, no tecido córion alantoideano, levando a processo inflamatório dos tecidos e órgãos, causando placentite necrótica dos cotilédones, resultando no seu descolamento pela lise das suas vilosidades (GRASSO-PAULIN, 2000). Essas lesões comprometem a circulação materno-fetal, prejudicando sua respiração e alimentação, podendo levá-lo à morte. Nos casos agudos da doença, quanto maior a necrose, maior a chance de ocorrer abortamento, único sintoma aparente na maioria das infecções brucélicas (BATHKE, 1988). Por outro lado, quanto menos intensa a necrose maior será a deposição de fibrina e mais tardio o abortamento. Nesse caso, pode ocorrer a retenção de placenta, ou a gestação vir a termo, porém gerando produtos fracos que poderão morrer em alguns dias. O quadro pode evoluir para metrite ou endometrite crônica e consequente subfertilidade, infertilidade ou esterilidade (TIMONEY, 1988), com ou sem presença de corrimento vaginal (ACHA & SZYFRES 1986; BATHKE, 1988). Na Figura 2, observa-se o útero gravídico com a localização da

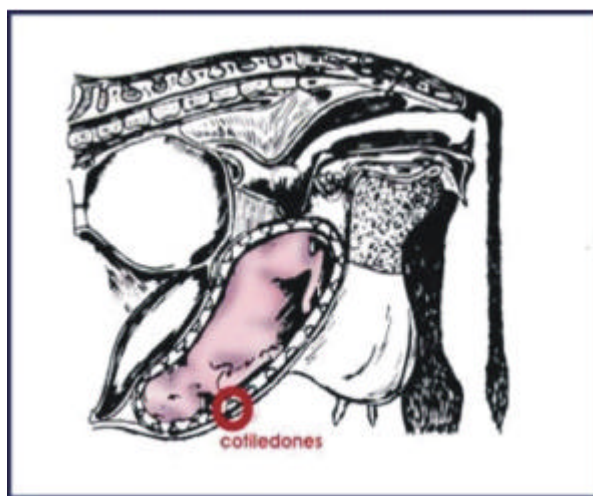


Fig. 2 - Localização da lesão causada pela brucelose: nos cotilédones.
Fonte: Adaptado de <http://trc.ucdavis.edu/mjguinan/apc100/modules/reproductive>, 2003.

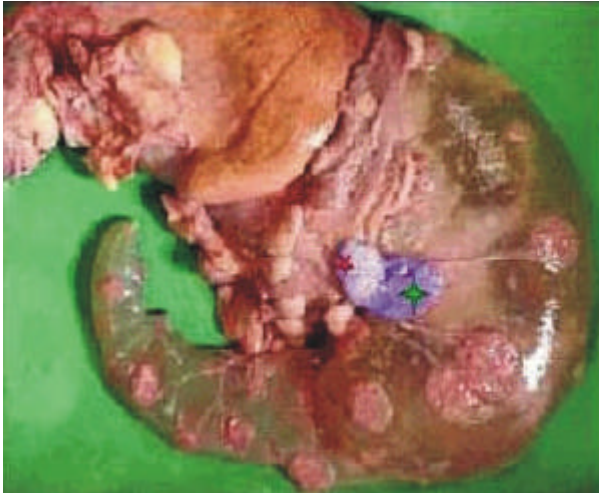


Fig. 3 - Placenta com feto e placentomas (fechados e abertos). X: placentoma; F: cotilédone (colorido em roxo).; H: carúncula (colorido em lilás). Fonte: Adaptado de <http://trc.ucdavis.edu/mjguinan/apc100/modules/reproductive>, 2003.



Fig. 4 - Placentoma aberto evidenciando carúncula e colilédone. X: placentoma; F: cotilédone (colorido em roxo).; H: carúncula (colorido em lilás). Fonte: Adaptado de <http://trc.ucdavis.edu/mjguinan/apc100/modules/reproductive>, 2003.

lesão causada pela brucelose e, nas Figuras 3 e 4, uma visão mais próxima dessa área. A Figura 5 representa a localização do feto bovino dentro da placenta, evidenciando o tecido córion-alantoideano e o local de necrose e/ou deposição de fibrina (principalmente no córion).

No aparelho reprodutivo masculino, a brucela pode levar à reação inflamatória do tipo necrosante nas vesículas seminais, testículos e epidídimos, com aumento de seu volume uni ou bilateral, provocando subfertilidade, infertilidade ou esterilidade. Como seqüela pode haver atrofia do órgão afetado, como pode ser observado na Figura 4 (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986).

No aparelho locomotor, causa infecções articulares levando a bursites, principalmente nas articulações carpianas e tarsianas e espondilites, especialmente nas vértebras torácicas e lombares, podendo também atingir medula óssea e bainha dos tendões. Em eqüídeos, o principal sinal é um abscesso localizado nas regiões da cernelha (zona de junção das duas escápulas), ou da espinha da escápula (bursite supra-espinhosa) e que é comumente chamado de "mal de cernelha" (BATHKE, 1988; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986). Também podem ocorrer osteoartrites, tenosinovites, abortamentos e esterilidade (TIMONEY *et al.*, 1988).

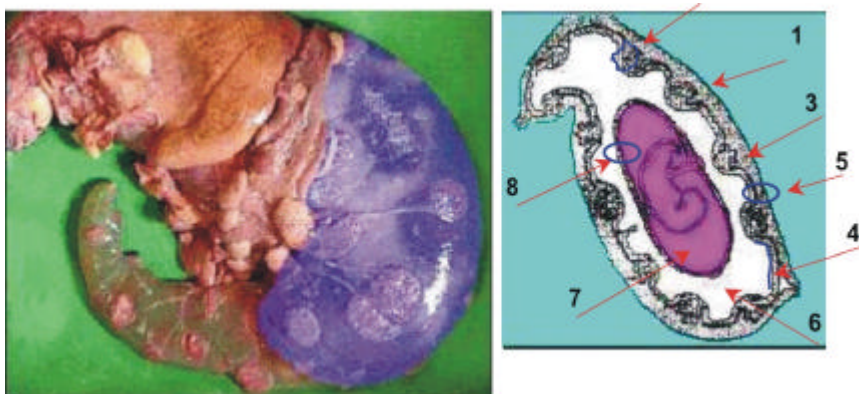


Fig. 5** - Localização do feto bovino dentro da placenta: cavidade amniótica com líquido amniótico e feto (em rosa e roxo) e líquido alantoideano em branco (foto à direita). e roxo + incolor (figura à esquerda). 1- cotilédone; 2- epitélio coriano; 3- tecido conjuntivo córion alantoideano; 4- epitélio alantoideano; 5- tecido córion alantoideano; 6- líquido alantoideano; 7- cavidade amniótica com líquido amniótico e feto; 8- membrana âmion alantoideana.

**Fonte: Adaptado de <http://trc.ucdavis.edu/mjguinan/apc100/modules/reproductive>, 2003; adaptado de GRASSO-PAULIN, 2000.



Fig. 6 – Orquite em um bovino e suíno - acúmulo de líquido (exudato) entre o escro e a túnica vaginal.
Fonte: Adaptado de ATLAS DE DOENÇAS DE BOVINOS, EQÜIDEOS, OVINOS E SUÍNOS, 2000.

As vacas são mais susceptíveis à doença, sobretudo, quando prenhes e quase todas permanecerão cronicamente infectadas, com o agente presente no útero e linfonodos (BISHOP *et al.*, 1994). Touros também possuem papel importante na transmissão da brucelose, pois eliminam a bactéria através do sêmen o que não deve ocorrer com novilhos e animais castrados (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986; BATHKE, 1988). Vacas não gestantes expostas a pequenas quantidades de brucelas podem desenvolver a condição de portadoras assintomáticas.

Filhos de vacas brucélicas se infectam durante a gestação, com a brucela persistindo em seus pulmões e linfonodos regionais (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986). As novilhas serão sorologicamente negativas ou possuirão títulos sorológicos instáveis (ACHA & SZYFRES, 1986; NIELSEN & DUNCAN, 1990), soro convertendo-se a partir da metade de sua primeira gestação (BISHOP *et al.*, 1994), podendo, inclusive, eliminar o agente etiológico (KELLAR, 1976). Nesse caso, a vacinação é ineficaz (TIMONEY, 1988). Acredita-se que tal fenômeno, chamado de "portador latente", ocorra numa frequência de 2,5 a 9% em condições naturais de campo (BISHOP *et al.*, 1994). A outra maneira de transmissão da vaca para o produto é através do leite. Os bezerros, ao ingerirem leite contaminado, poderão albergar o agente nos linfonodos que drenam o trato gastrointestinal, e excretar brucelas nas fezes (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986). Todavia, seis a oito semanas após a suspensão do alimento tornam-se livres, pois até seis meses de idade os bezerros são pouco susceptíveis à infecção e geralmente infectam-se de forma transitória (ACHA & SZYFRES, 1986).

Entre os bovinos, a bactéria é eliminada do animal infectado pelas descargas uterinas, leite, sêmen e fezes (BATHKE, 1988). No momento do parto ou abortamento de vaca infectada, com a expulsão do feto e anexos, há eliminação de grande quantidade de brucelas, contaminando o ambiente e propiciando a infecção de animais susceptíveis. No leite, a eliminação

do agente começa cerca de duas semanas após o parto ou abortamento e pode persistir durante meses (BATHKE, 1988; ACHA & SZYFRES, 1986). Embora haja risco de transmissão venérea da brucelose do touro para a vaca através da monta natural, considera-se que seja baixo e pouco importante devido às barreiras existentes na mucosa vaginal (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986). Para os animais, as vias de transmissão são representadas principalmente por pastagens, alimentos e águas contaminadas com brucelas e também fômites ou sêmen contaminados (ACHA & SZYFRES, 1986).

A *B. abortus* também pode infectar outras espécies domésticas, tais como eqüideos, suínos, ovinos, caprinos, bubalinos e cães. Geralmente, não é transmitida aos suínos e, quando isso ocorre, a infecção é transitória, podendo servir de fonte de infecção para bovinos. Os ovinos são mais resistentes que caprinos, mas, em ambos pode ocorrer infecção ocasional, sendo a epididimite e o abortamento os principais sintomas nos ovinos e caprinos, respectivamente (BATHKE *et al.*, 1988; CARTER, 1991). Eqüideos são menos sensíveis à



Fig. 7 – Sinal clínico patognomônico da brucelose em dois eqüideos "mal de cernelha".

Fonte: Adaptado de ATLAS DE DOENÇAS DE BOVINOS, EQÜIDEOS, OVINOS E SUÍNOS, 2000.

B. abortus e considerados elementos quase sempre terminais na cadeia de transmissão. Em búfalos, a brucelose parece ser similar a dos bovinos (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986). Os reservatórios naturais, representados pelos ungulados silvestres, desempenham papel importante na epidemiologia da doença, pois funcionam como mantenedores do agente no ambiente não modificado pelo homem.

As brucelas apresentam duas possíveis morfologias de colônias – lisas ou rugosas, decorrentes da constituição química da parede celular (Fig. 9). Quando lisas, possuem uma membrana citoplasmática interna, um espaço periplasmático contendo uma camada de peptídeoglicano e uma parede externa (PE). Na PE existe uma estrutura formada por moléculas de constituição lipopolissacáride, a LPS, composta pelos lipídios A, um oligossacarídeo central e uma cadeia polissacáridica mais exposta denominada cadeia O, associada aos epítomos A ou M. Onze epítomos, presentes na LPS, já foram relatados. Quatro deles, estão na cadeia O (C/Y, C, A e M); três estão no oligossacarídeo central das brucelas rugosas; três no lipídeo A e dois associados ao peptídeo à proteína de membrana externa OMP₃. A maioria dos anticorpos estão direcionados contra C/Y e contra o NH, um hapteno de composição polissacáride antígenicamente relacionado à LPS (MORENO *et al.*, 1998). Após a infecção, as células do sistema mononuclear fagocitário, sobretudo macrófagos, ligam-se à brucela por meio de receptores específicos ou com a ajuda dos anticorpos opsonizantes. A bactéria é interiorizada, digerida e suas frações antigênicas são expostas na superfície

celular, permitindo o seu reconhecimento pelos linfócitos T, linfócitos B e pelas moléculas das classes I do CMH (TIZARD, 1996).

No curso da doença ou vacinação, são formados anticorpos como resposta ao estímulo antigênico, presentes nas secreções e no soro. As classes de anticorpos produzidos contra a *B. abortus* são variáveis, dependendo da sua função, afinidade e especificidade com os epítomos bacterianos. As IgM são a primeira classe de anticorpos a serem produzidos (ao redor do 5^o - 7^o dia), alcançando nível máximo ao redor do 13^o-21^o dia. São seguidas pela IgG, detectáveis um dia após a IgM, com a máxima concentração entre 28^o-42^o dia. Nos animais infectados, as IgM diminuem rapidamente sua concentração, como pode ser observado na Figura 10. Porém, a IgG persiste por mais tempo sobretudo a IgG₁, principal subclasse de anticorpo presente no soro sanguíneo de animais infectados (BUTLER *et al.*, 1981). Proporcionalmente, a IgG₁ apresenta-se numa concentração duas vezes maior que a IgG₂ (SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADEIRA Y DESARROLLO RURAL, 1995; NIELSEN & DUNCAN, 1990). Em caso de vacinação, as IgM começam a desaparecer após alguns meses (Fig. 9), a IgG₂ diminui paulatinamente sua concentração e a IgG₁ se mantém e até aumenta sua produção, devido aos estímulos antigênicos. Nas Figuras 9 e 10, observa-se o comportamento da IgM e da IgG frente à vacinação e à infecção.

Vacinas

A vacina B19 é produzida segundo normas internacionais com amostra viva (que possui maior capacidade em ativar macrófagos) da *B. abortus* estirpe B19.

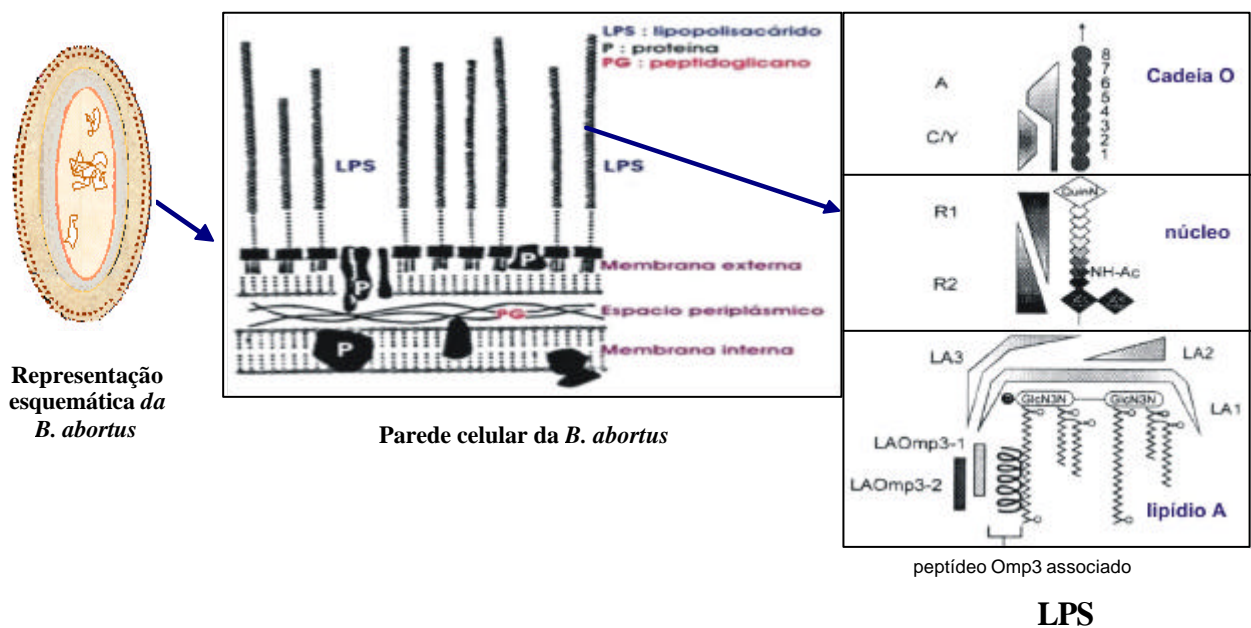
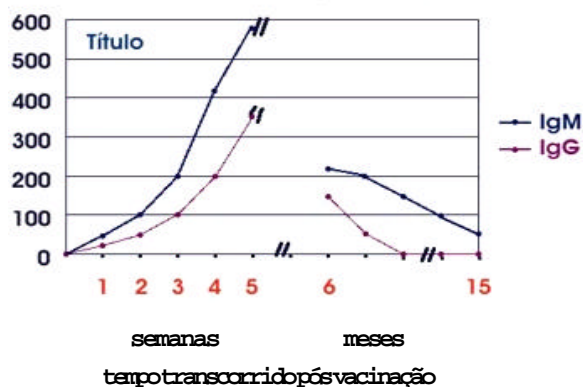


Fig. 9 - Estrutura antigênica da *Brucella abortus*. Adaptado de TRABULSI; MORENO *et al.* (1998).

Respuesta inmune de bovinos vacunados con dosis clásica de la cepa 19 de *B. abortus*



Fonte: SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADEIRA Y DESARROLLO RURAL, 1995

Fig. 9- Resposta imune de bovinos vacinados com a dose clássica da B19.

É estável, não se multiplica em presença de eritritol e causa mínimas reações locais e sistêmicas após sua inoculação (ALTON *et al.*, 1988). A dose padrão única tradicionalmente recomendada é 5×10^{10} ou 4 a 12×10^{10} células, via subcutânea (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986; TIMONEY *et al.*, 1988; BISHOP *et al.*, 1994). ADAMS (1990), refere que o grau de proteção pode variar dependendo da idade da fêmea, via de aplicação, dose da vacina, dose de desafio, mas, se utilizada de forma convencional, protege de 60% a 75% contra o abortamento. As falhas de vacinação estão relacionadas principalmente a altas doses de contato com o agente e não a um aumento na virulência do microorganismo (CRAWFORD *et al.*, 1988). Admite-se que fêmeas vacinadas com a vacina B19 na idade correta estarão protegidas por um período de sete anos após a vacinação (BATHKE, 1988).

A B19 é atenuada para fêmeas bovinas, vacinadas até determinada idade e pode ser patogênica para machos e quaisquer outras espécies incluindo o homem, devido à virulência residual que conserva. Leva os machos a permanecerem com títulos vacinais por toda vida, além de haver a possibilidade de desenvolverem orquite (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986). A vacinação de fêmeas prenhes pode provocar abortamento, sobretudo no seu terço final, na ordem de 1% a 2,5% em condições de campo (MACDIARMID, 1999).

A recomendação usual da B19 é para fêmeas entre três a oito meses de idade mas, como algumas raças de bovinos leiteiros amadurecem mais cedo, nesses casos é recomendada a vacinação entre três a seis meses, a fim de diminuir interferência dos anticorpos persistentes no sorodiagnóstico de forma que as novilhas irão apresentar resultado negativo ou desprezível quando submetidas ao seu primeiro teste (RICHEY & HARELL, 1997). A presença da cadeia O na B19 é a

Respuesta inmune de bovinos vacunados con *B. abortus*

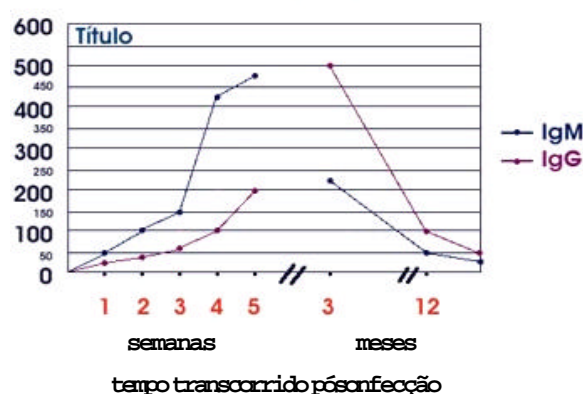


Fig. 10- Resposta imune de bovinos infectados com *abortus*.

responsável pelo aparecimento e persistência de anticorpos no soro após a vacinação (KING & FRANK, 1961).

O objetivo da utilização da B19 é baixar a taxa de infecção em zonas de alta prevalência, propiciando a erradicação da doença. Quando a imunização é aplicada sistematicamente numa região, existe uma redução gradual da frequência da brucelose. Quando a cobertura vacinal atinge 80%, a prevalência da doença estará em níveis inferiores a 2% (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986).

Diagnóstico

Diagnóstico indireto

O sorodiagnóstico é a base do combate à brucelose em rebanhos. Permite o monitoramento tanto de propriedades como de regiões inteiras, além de vigiar zonas de onde a doença já foi erradicada. Todos os testes devem ser utilizados respeitando-se as normas técnicas estabelecidas pelos organismos internacionais, com antígenos padronizados e específicos para cada prova (ALTON, 1988). Os principais testes, para brucelose, são os que buscam detectar anticorpos no soro e no leite.

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) no Brasil, em 10 de janeiro de 2001, preconiza o TAAT como prova de triagem e, como provas confirmatórias, o 2-ME e a RFC' (BRASIL, 2001). Os principais testes indiretos para o diagnóstico da brucelose bovina são:

Soroaglutinação lenta em tubos (SLT) ou prova de Wriht

Descrita por Wright & Smith, em 1897, foi a primeira prova sorológica criada para brucelose. Executada num pH neutro, a SLT demonstra uma boa sensibili-

dade analítica na detecção dos isotipos bovinos com uma exceção importante: a IgG₁, (WRIGHT & NIELSEN, 1990). Por isso, causa muitas reações falso positivas, devendo, portanto, dispor de provas mais específicas para confirmação do resultado (NIELSEN, 1995). ALTON (1977) refere que a SLT, em vários experimentos, demonstrou sensibilidade e especificidade baixas em relação a outros testes.

Teste do antígeno acidificado tamponado (TAAT)

O TAAT é uma prova qualitativa rápida, prática e de boa sensibilidade, (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986). Foi desenvolvido a partir da observação de que a IgG₁ bovina é menos ativa em pH 7, mudando de comportamento com a acidificação do meio. O pH $3,65 \pm 0,05$ aumenta o poder de aglutinação da IgG₁, reduz a reatividade da IgM (WRIGHT & NIELSEN, 1990). Como se trata de um processo físico, é provável que nem todas as IgM tenham sua reatividade reduzida. ALLAN *et al.* (1976) concluíram que o teste também detecta IgM. Vale lembrar que a não detecção da IgM em fases iniciais da infecção não é tão importante porque, embora a IgM seja o primeiro anticorpo produzido, as IgGs aparecem logo depois (WRIGHT & NIELSEN, 1990). NICOLETTI *et al.* (1969) demonstraram que a TAAT detectou 95% de animais positivos ao cultivo. HUNTER *et al.* (1972) ao compararem diferentes provas sorológicas, constataram que o TAAT detectou o maior número de reatores positivos ao cultivo. O TAAT é considerado a melhor alternativa para o diagnóstico massal de rebanhos (ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA SALUD, 2002)

Teste do Mercaptoetanol (2-ME)

O teste do Mercaptoetanol tem sua especificidade aumentada por inibição da atividade aglutinante da IgM mediante processo químico, que consiste no tratamento do soro com a droga 2-mercaptoetanol (FERRI *et al.*, 1977; TIMONEY *et al.*, 1988). A droga degrada a IgM em cinco sub unidades monoméricas semelhantes não aglutinantes, por redução branda das pontes dissulfídicas desestabilizando o polímero ao degradá-lo em sub unidades que conservam suas características de antigenicidade, mas deixam de compor o anticorpo plurivalente (IgM) e não 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). A utilização do 2-ME impede a ocorrência da maioria das reações inespecíficas (CASAS-OLASCOAGA, 1976). WRIGHT & NIELSEN, 1990 relatam que tratamento com o mercaptoetanol promove

uma maior reatividade da IgG₁, ao passo que a reatividade da IgG₂ diminuirá. Assim, embora o 2-ME detecte tanto IgG₁ como IgG₂, 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 será reduzida (NIELSEN & DUNCAN, 1990; WRIGHT & NIELSEN, 1990). Provavelmente o fenômeno ocorra devido ao pH ácido da droga (BADEN, 2002). A mistura de soro em diversas diluições a um mL de antígeno diluído a 2%, com um mL de 2-ME a uma concentração de 0,714% (ALTON, 1975), converte o meio de neutro para ácido. NICOLETTI & MURASCHI (1966) relataram concordância entre o 2-ME e a RFC em 97%.

Reação de fixação do complemento (RFC')

A RFC' é considerada a melhor prova para a confirmação da brucelose pelo sorodiagnóstico, mostrando a melhor correlação com os isolamentos em animais natural ou experimentalmente infectados (NIELSEN, 1995). Porém, trata-se de uma prova mais laboriosa e mais cara que as de aglutinação, por isso recomenda-se seu uso como confirmatória para os soros positivos à triagem. A variação da técnica a quente é mais prática, diminui as reações anticomplementares e elimina a IgM, aumentando a especificidade do teste (CHAPPEL, 1989). A RFC' a quente tem sido usada como prova confirmatória em programas de controle e erradicação de muitos países (GRASSO-PAULIN, 2000). A técnica detecta precocemente IgG₁ no soro, em torno do 14º dia e também é capaz de revelar casos crônicos, onde a IgM já desapareceu e os níveis de IgG₁ são baixos, devido ao seu baixo limiar de detecção (KRUZE, 1969). Para os resultados da RFC' sejam comparáveis é necessária a adoção de um padrão internacional único. Muitos países possuem um padrão nacional e, na Comunidade Européia, o teste é padronizado pelo Laboratório Central de Veterinária em Weybridge, Reino Unido (MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, 1991). O Código Zoonosológico Internacional da OIE refere a RFC' como um importante suporte técnico e exigência do mercado externo e a recomenda como prova confirmatória, triada pela TAAT (ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS, 2002).

Testes imunoenzimáticos (ELISA)

Os testes imunoenzimáticos que têm apresentado melhores resultados para brucelose são os ELISA indiretos e competitivos. São muito utilizados na Europa e América do Norte. COLLING (1998) relata que a Agência Internacional de Energia Atômica, junto com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (AIEA/FAO) já padronizou o ELISA para o diagnóstico da brucelose. Possuem boa especificidade e sensibilidade com a vantagem de não

ocorrer o fenômeno de zona como ocorre na RFC'. Uma das limitações do ELISA é que requer um laboratório equipado e pessoal treinado para a sua execução (COLLING, 1998). Devido as suas vantagens, alguns países já estão empregando o IELISA e o CELISA nas rotinas sorológicas, em substituição à tradicional combinação do TAAT para triagem e RFC' para confirmação.

O IELISA apresenta como vantagens altas sensibilidade e especificidade (Tabela 1) e a possibilidade de automatização total do processo. Os problemas estão no investimento inicial e na impossibilidade, tal e qual os demais testes, de se distinguir animais vacinados dos infectados, além do tempo para sua realização ser relativamente maior que o TAAT. Porém, em processo automatizado, é possível realizar uma média de 1.000 soros por dia (NIELSEN, 1995).

O CELISA também apresenta altas especificidade e sensibilidade no diagnóstico da brucelose bovina (Tabela 1) e é tecnicamente menos trabalhoso, além de poder diferenciar animais vacinados dos naturalmente infectados (NIELSEN, 1995). Além disso, um mesmo conjugado pode ser utilizado para testar soros de diversas espécies animais (MACMILLAN *et al.*, 1990). Os custos para a realização do ELISA competitivo ou indireto são similares, porém superiores aos do TAAT e, inicialmente, semelhantes aos da RFC' e aos do Teste da polarização da fluorescência - FPA (NIELSEN, 1995).

Teste da polarização da fluorescência (FPA)

O FPA parte da seguinte premissa: uma molécula contida em uma solução gira aleatoriamente a uma taxa inversamente proporcional ao seu tamanho. Essa taxa de rotação pode ser medida em planos horizontal e vertical utilizando-se um indicador fluorescente e uma luz polarizada. A molécula de antígeno solúvel (LPS), conjugada ao isotiocianato de fluoresceína, girará a uma velocidade alta, resultando em uma baixa despolarização de luz, enquanto o complexo antígeno-anticorpo, bem maior e mais pesado, girará mais lentamente, levando a uma despolarização da luz com velocidade muito maior. Desta forma, se o anticorpo estiver presente no soro, irá ligar-se ao antígeno, e a taxa rotacional desse antígeno conjugado

do será alterada, e esta mudança poderá ser determinada pelo analisador de polarização fluorescente, baseado nas diferenças rotacionais entre a LPS e o complexo antígeno-anticorpo. O FPA é uma prova de simples execução, onde apenas o antígeno, com um indicador, é adicionado nas amostras diluídas. O teste também é rápido, pois não requer lavagens intermediárias dos reagentes. Como é executado em um equipamento de características portáteis, pode ser feito em um laboratório com condições mínimas (SAMARTINO, 1999). O FPA já foi validado para o sorodiagnóstico da brucelose em bovinos, suínos, ovinos, caprinos, bisões e cervídeos, já que a reação cruzada com epítomos comuns à *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* encontrados na cadeia O, permite o uso de um só antígeno para todas as espécies de brucelas lisas. Além disso, requer volumes menores de soro que os demais métodos sorológicos e é menos afetado pela hemólise (NIELSEN *et al.*, 2001).

Prova do anel em leite (PAL)

Revela anticorpos preferencialmente da classe IgA, presentes no leite e aderidos às moléculas de gordura pela sua fração F_c. Geralmente é utilizada em amostras compostas em média por leite de 15 animais e deve ser realizada de três a quatro vezes ao ano, com a finalidade de triar rebanhos infectados a partir das plataformas de usinas de beneficiamento de leite (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986). A prova é prática, rápida, barata e de alta sensibilidade. Tem grande valor em investigações epidemiológicas como teste presuntivo para a identificação de rebanhos potencialmente infectados em áreas problema. Também é empregado na vigilância epidemiológica para controlar sistematicamente áreas livres (CASAS-OLASCOAGA, 1976). Quando o anticorpo interage com o antígeno corado (hematoxilina ou tetrazólio), forma-se a malha de aglutinação que flutua, junto com a gordura, para a superfície da amostra, revelando o anel colorido (NIELSEN, 1995).

Sêmen plasma aglutinação (SPA)

Trata-se o sêmen com azida sódica 1%, centrifuga-se e retira-se o seu plasma, que será submetido às provas usuais: TAAT, RFC' ou 2-ME (MINISTRY OF

Tabela 1 - Sensibilidade e especificidade (%) de testes utilizados no sorodiagnóstico da brucelose bovina.

teste	sensibilidade	especificidade	autor
TAAT	99,6	83,1	DAVIES <i>et al.</i> , 1971
SLT	70,4	94,7	NIELSEN, 1990
2-ME	97,0	97,0	NICOLETTI & MURASCHI, 1966; PAULIN, 2002
RFC'	97,5	99,9	NIELSEN, 1995
IELISA	99,7	98,0	UZAL <i>et al.</i> , 1998
CELISA	99,3	99,6	NIELSEN <i>et al.</i> , 1998
FPA	99,2	99,7	NIELSEN <i>et al.</i> , 1998

AGRICULTURE, FICHIERIES AND FOOD, 1991). Se o teste for positivo há fortes indícios da doença. Como se trata de prova individual, a possibilidade de reação falso negativa não deve ser afastada. Por isso, o ideal seria utilizá-la junto com o sorodiagnóstico convencional.

Diagnóstico direto

O exame bacteriológico é executado a partir de espécimes suspeitos semeados em meios de cultura especiais. Uma vez isolada, a brucela, que é uma bactéria intracelular facultativa, é identificada até gênero estudando-se suas características culturais, tintoriais, morfológicas e bioquímicas (BATHKE, *et al.*, 1988; NIELSEN, 1995). Em meio sólido e condições ideais, uma cultura leva de três a sete dias para a visualização das colônias, embora se recomende a incubação por no mínimo por três semanas (CARTER, 1991). As colônias são pequenas, translúcidas, brilhantes, convexas, de bordos arredondados e bem definidos e, geralmente, de coloração leitosa (BATHKE, 1988). As brucelas são cocobacilos curtos, pequenos e pleomórficos. Não formam cápsulas ou esporos e nem se movimentam ativamente. São consideradas Gram negativas e coram-se bem pelos métodos de Ziehl-Neelsen e Koster modificados (TIMONEY, 1988; CARTER, 1991). À microscopia óptica comum apresentam-se isoladas, aos pares ou em pequenos grupos (METCALF, 1994). O diagnóstico direto também pode ser realizado por meio da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR). Neste procedimento detecta-se um fragmento específico do DNA bacteriano presente nas amostras analisadas.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece aos colegas Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto (FMVZ/USP), Dra. Ana Cristina Teixeira e Dra. Simone Miyashiro (Instituto Biológico) pela colaboração na elaboração do presente texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Brucellosis. In: ACHA, P.N. (Ed.). *Zoonoses y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales*. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986. p.14-35. (Publicación Científica 503)
- ADAMS, L.G. Developend of live brucella vaccines. In: ADAMS, L.G. (Ed.). *Advances in brucellosis research*. Austin: Texas A&M University Press, College Station, 1990. p.251-276.
- ALLAN, G.S.; CHAPPEL, R.J.; WILLIAMSON, P.; MAC NAUGHT, 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.; JONES, L.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.
- ALTON, G.G. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. *Aust. Vet. J.*, v.54, p.551-557, 1977.
- ATLAS DE DOENÇAS DE BOVINOS, EQUINOS, OVINOS E SUÍNOS. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. 1.ed., Campo Grande: UFMS, 2000 [CD-ROM].
- BADEN, W. *Reactivos productos químicos*. Darmstadt: Merck KgaA, 2002. p686.
- BATHKE, W. Brucellosis. In: BEER, J. (Ed.). *Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose*. São Paulo: Roca, 1988. v.2, p.144-160.
- 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. 2003.
- BUTLER, J.E.; SEAWRIGHT, G.I.; MCGIVERN, P.L.; GILSDROF, M. Class and subclass antibody response of *B. abortus* strain 19-vaccinated and field-strain-challenged cattle: evidence for a predominant IgG₁ response in infected animals. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.137, p.790-791, 1981.
- 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.
- CARTER, G.R. & CHENGAPPA, M.M. Brucella. In: CARTER, G.R. & CHENGAPPA, (Eds.). *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. 4.ed. Philadelphia: London, 1991. p.196-201.
- CASAS-OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucellosis animal. *Bol. Centro Panam. Zoon.*, Ramos Mejia: Oficina Sanitaria Panamericana/Organizacion Mundial de la Salud: Buenos Aires, 1976. v.18 n.3/4, p.107-139.
- CHAPPEL, R.J. Diagnosis of bovine brucellosis: principles, practice and problems. *Surveillance*, v.16, n.2, p.3-5, 1989.
- COLLING, A. Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America. In: INTERNATIONAL ATOMIC ANERGY AGENCY. *Diagnosis and epidemiology of animal siseases in Latin America*. Vienna: IAEA, 1998. p.3-14. (TECDOC 1005)
- CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING ZOOSES, EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 1., Jerusalem, Israel. *Resumos*. Jerusalem: 1997. v.3, n.2, p.213-221.
- CRAWFORD, R.P.; ADAMS, L.G.; CHILDERS, A.B. Value of serologic reactions following Strain 19 vaccination. *Prev. Vet. Med.*, v.5, p.275-280, 1988.

- DAVIES, G. The Rose bengal test. *The Veterinary Record*. v.88, p.447-449, 1971.
- FERRI, R.G.; CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C. *Imunologia*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1977. 316p.
- GARCIA-CARRILLO, C. *La brucellosis de los animales en América y su relación com la infección humana*. Paris: Office International des Epizooties, 1990, 299p.
- GRASSO-PAULIN, L.M.S. *O combate à brucelose bovina*. São Paulo: 2000. 112p. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Univ. de São Paulo].
- HUNTER, D. & ALLEN, J. An evaluation of milk and blood test used to diagnose brucellosis. *Vet. Rec.*, v.91, p.310-312, 1972. Disponível em <<http://trc.ucdavis.edu/mjguinan/apc100/modules/reproductive>>. Acesso em: 5 fev. 2003.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucellosis*. Ginebra: OMS, 1986. 149p. (Série de informes técnicos, 740).
- KELLAR, J.; MARRA, R.; MARTIN, W. Brucellosis in Ontario: a case control. *Can. J. Comp. Med.*, v.40, n.2, p.119-28, 1976.
- KING, N.B. & FRANK, N.A. Effect of age on resistance and retention of titer in cattle vaccinated with strain 19 *Brucella abortus* vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.91, p.101-104, 1961.
- 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.
- MACDIARMID, S.C. Bovine brucellosis eradication and surveillance strategies in pastoral dairy and beef cattle production. Wellington: National Adviser (Animal Health), Ministry of Agriculture and Fisheries (MAF), 1999.
- METCALF, H.E.; LUCHSINGER, D.W.; RAY, W.C. BRUCellosis. In: BERAN, G.W.; STEELE, J.H. (Eds.). *Handbook of zoonoses. section A: bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic*. 2.ed. Raton: CRC Press, 1994. p.9-39.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. *Brucellosis diagnosis standard laboratory techniques*. New Haw: Central Veterinary Laboratory, 1991. 52p.
- MACMILLAN, A.P.; GREISSER-WILKE, I.; MOENINNING, V.; MATHIAS, L.A. A competition enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, v.97, n.2, p.83-5, 1990.
- MORENO, C.; ROJAS, N.; NIELSEN, K.; GALL, D. Comparison of different serological assays for the differential diagnosis of brucellosis. In: DIAGNOSIS AND EPIDEMIOLOGY OF ANIMAL DISEASES IN LATIN AMERICA. Vienna: IAEA, 1998. p.3-14. (IAEA TECDOC 1005)
- 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.; 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.
- NIELSEN, K. & DUNCAN, J.R. *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. 453p.
- NIELSEN, K. Developend of Live Brucella Vaccines. In: ADAMS, L.G. (Ed.). *Advances in Brucellosis Research*. Austin: 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.; GALL, D.; LIN, M.; MASSANGILL, C.; SAMARTINO, L.; PEREZ, B.; COATS, M.; HENNAGER, S.; DAJER, A.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. *Vet. Immunol. Immunopatol.*, n.66, p.321-329, 1998.
- NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HENEGHAN, T.; MCNAMARA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROLL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L.; DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. *Vet. Microbiol.*, v.21, n.80, n.2, p.163-170, 2001.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Brucellosis bovina, ovina y caprina*. Paris: OIE, 1987, 282p., Série Técnica n.6)
- ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIES. *Código zoonosario internacional, Enfermedades dos bovinos da lista B, Recomendaciones aplicáveis à enfermidades específicas*. Disponível em: <<http://www.oie.int.htm>> Acesso em: 8 jul. 2002.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucellosis*. Ginebra: OMS, 1986. 149p. (Série de informes técnicos, 740).
- PAULIN, L.M.; PRADO, G.E.S.; FEDERSONI, I.S.P.; TEIXEIRA, A.C.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo dos testes 2- Mercaptoetanol e Reação de Fixação do Complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.69, n.4, 2002. (No prelo)
- NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HENEGHAN, T.; MCNAMARA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROLL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L.; DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. *Vet. Microbiol.*, v.21, n.80, n.2, p.163-170, 2001.
- PEARCE, J.H.; WILLIAMS, A.E.; HARRIS-SMITH, P.W.; FITZGEORGE, R.B.; SMITH, H. The chemical basis of the virulence of of *Brucella abortus*. II. Erythritol, a constituent of bovine foetal fluids which stimulates the growth of *B. abortus* in bovine phagocytes. *Br. J. Exper. Pathol.*, v.43, p.31-37, 1961.
- SAMARTINO, L.; GREGORET, R.; GALL, D.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *J. Immunoassay*, v.20, n.3, p.115-126, 1999.
- RICHEY, E.J. & DIXHARRELL, C. *Brucella abortus Disease (Brucellosis) in Beef Cattle 1*. Document of the Department of Large Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville. 17p. Disponível em: <<http://hammoch.ifas.ufl.edu.htm>> Acesso em 8, jul. 2000.

- 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.
- TIZARD, I.R. *Veterinary Immunology. An Introduction.* Philadelphia: W.B. Saunders, 1996.
- TRABULSI, M.J.; ALTERTHUM, F.; CANDEIAS, J.A.N.; GOMPETZ, O.F.
Microbiologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu, 1999. 586p.
- UZAL, F.A.; CARASCO, E.A.; ECHAIDE, S.; ROBLES, C.A. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in Patagonia, Argentina. In: INTERNATIONAL ATOMIC ANERGY AGENCY. *Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America.* Vienna: IAEA, 1998. p.3-14. (IAEA TECDOC 1005)
- 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 11/3/03

Aceito em 9/4/03