

EVALUACIÓN ENTRE CUATRO TÉCNICAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES CAUSADAS POR *BRUCELLA ABORTUS* EN BOVINOS

L.M.S. Paulin, W.A. Andrade-Pacheco, V. Castro, I.S.P. Federsoni

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

ABSTRACT

EVALUATION AMONG FOUR SEROLOGICAL TECHNIQUES OF *BRUCELLA ABORTUS* INFECTION IN BOVINES. Serum samples from 200 vaccinated adult bovine females from two herds were analyzed by buffered antigen acidified plate test (AAT) (Rose Bengal Plate Test), indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAI), 2-mercaptoethanol test (2-ME) and complement fixation test (FC). For ELISAI, the fixed value of 45 percent positivity (PP) was used. Group A was composed of 100 animals, with description of reproductive disturbances compatible with brucellosis and reagent to the AAT. Group B was composed of 100 animals serologically free of *B. abortus* for at least two years. Additionally, all serum samples were tested using the AAT, the 2-ME and the FC to confirm negative status. The combination of two tests, FC and 2-ME was used as the *gold standard*. The relative sensitivity and specificity and the Kappa were calculated for each test. The result of kappa for 2-ME in relation to the FC and of the AAT and the ELISAI in relation to the *gold standard* was, respectively, 0.78, 0.86 and 0.84. The relative sensitivities (Sr) were, respectively, 84.1% (53/63), 100% (53/53) and 98.1% (52/53), and the relative specificities (Er) were 93.3% (111/119), 90.1% (100/111) and 90.1% (100/111). For comparison between the ELISAI and the AAT, there was obtained a Kappa of 0.91, Sr of 93% (93/100) and Er of 98% (98/100). Conclusions: 1 - The option of constituting the *gold standard* based on at least two tests was the most suitable for this study; 2 - The ELISAI resulted in values of Sr and Er similar to the AAT. Therefore, the AAT and the ELISAI are good for screening in regard to the diagnosis of brucellosis.

KEY WORDS: Bovine brucellosis, serum diagnosis, indirect ELISA, 2-mercaptoethanol test, complement fixation test.

RESUMO

AVALIAÇÃO ENTRE QUATRO TÉCNICAS SEROLÓGICAS PARA O DIAGNÓSTICO DE INFEÇÕES CAUSADAS POR *BRUCELLA ABORTUS* EM BOVINOS. O estudo objetivou comparar o desempenho do teste mercaptoetanol (2-ME) com o teste fixação de complemento (FC) e os testes antígeno acidificado tamponado (AAT) e ELISA indireto (ELISAI) frente ao *gold standard*, para o sorodiagnóstico da brucelose em bovinos. Também se comparou o ELISAI com o AAT. Foram processadas 200 amostras de soro de fêmeas bovinas adultas de dois rebanhos, denominados grupos A e B. O grupo A foi composto de 100 fêmeas vacinadas contra brucelose, com histórico de problemas reprodutivos compatíveis com a doença e reatoras ao AAT. O grupo B foi composto de 100 fêmeas vacinadas e não reatoras ao AAT por mais de dois anos. Todos os soros foram submetidos aos quatro testes. Foi empregado, como *gold standard*, a combinação do FC com o 2-ME. O índice Kappa foi usado como medida de concordância e seu resultado, para o 2-ME, o AAT e o ELISAI foi de, respectivamente, 0,78, 0,86 e 0,84. As sensibilidades relativas (Sr) foram de, respectivamente, 84,1%, 100% e 98,1% e as especificidades relativas (Er), 93,3%, 90,9% e 90,1%. Entre o ELISAI e o AAT, obteve-se Kappa de 0,91, Sr de 93% e Er de 98%. Conclusões: 1-A opção de se constituir o *gold standard* baseado em dois testes foi a mais adequada para este estudo; 2-Os valores de Sr e Er do ELISAI foram semelhantes aos do AAT. 3-O AAT e o ELISAI mostraram ser testes muito sensíveis e de boa especificidade e, portanto, adequados para serem usados como triagem no diagnóstico da brucelose.

PALAVRAS-CHAVE: Brucelose bovina, sorodiagnóstico, ELISA indireto, 2-mercaptoetanol, fixação de complemento

INTRODUCCIÓN

La brucelosis, por ser una zoonosis que perjudica la producción de carne y leche, es objeto de programas de control y erradicación en muchos países. Los perjuicios económicos provocados por la brucelosis en bovinos decurren de abortamientos, baja del prestigio de las propiedades infectadas, disminución de sus índices reproductivos, valores más bajos animales y productos provenientes de áreas afectadas y pérdida de mercados potenciales (PAULIN, 2006).

Por esos motivos, se han desarrollado programas de control y erradicación de la brucelosis en varios países que se apoyan en la vacunación masiva de terneras con la cepa *B. abortus* B19 o con *B. abortus* RB51 y en la certificación de rebaños libres. (PAULIN, 2006a). Esta última operación se apoya en el serodiagnóstico: los tests de rutina se realizan a intervalos regulares, con sacrificio de los animales reactivos, hasta la obtención de tres o más tests negativos para todos los animales destinados a la reproducción. Como el diagnóstico positivo significa la remoción del animal de la población, las características de sensibilidad y especificidad relativas de los tests se tornan importantes, pues resultados falso-positivos obligan a sacrificar animales sanos, y resultados falso-negativos a dejar fuentes de infección en contacto con los animales sanos (PAULIN, 2006b).

Los tests oficiales para diagnóstico serológico de la brucelosis, del Programa Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis y de la Tuberculosis (PNCEBT) de Brasil son el antígeno acidificado amortiguado - Rosa Bengala (AAT), el 2-mercaptoetanol (2-ME) y el test de fijación del complemento - FC (BRASIL, 2004). En Argentina, el Programa Nacional es similar, solamente que el AAT es reemplazado por el test del antígeno brucélico ácido amortiguado para prueba rápida en placa - BPA (SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y AGROSLIMENTARIA, 2003).

Una vez que se observa un incremento en los títulos de la sub clase de inmunoglobulinas G₁ (IgG₁), en animales natural o experimentalmente infectados, muchos tests visan la detección de esa clase de anticuerpos. Entre estos, el test inmuno-enzimático ELISA de Competición (ELISAC) y el FC son los que presentan límite de detección más alto para la IgG₁. Estos tests poseen óptimos valores de sensibilidad y especificidad relativas (WRIGHT; NIELSEN, 1990). ELFC es el que presenta mejor correlación con los aislamientos en animales infectados natural o experimentalmente (NIELSEN, 1995), lo que llevó a su adopción como test de referencia para la validación de otros tests serológicos (PAULIN, 2006b). El ELISA posee ventaja por no presentar el fenómeno de prozona además de poder ser automatizado (NIELSEN *et al.*, 1995).

El 2-ME a pesar de poseer buena especificidad, debe ser ejecutado junto con el test de suero aglutinación lenta en tubos (SAL), por que, como no detecta anticuerpos de la subclase IgM, no es adecuado para casos de infecciones agudas, y pueden presentar resultados falso-negativos en títulos que varían de 25 a 200 UI (25-400) en el SAL (BERCOVICH, 1998). Otro motivo está ligado al fenómeno de prozona. NIELSEN (1992) demostró la ocurrencia de resultados falso-negativos en el 2-ME atribuidos al prozona y NICOLETTI (1992) demostró la ocurrencia de resultados falso-negativos al 2-ME atribuidos al fenómeno.

Los tests utilizando antígeno acidificado amortiguado son cualitativos, rápidos, baratos, de ejecución simple y poseen óptima sensibilidad y buena especificidad. El más difundido es el AAT (PAULIN, 2006). Sin embargo, su lectura es subjetiva y estudios relatarán la ocurrencia de resultados falso-positivos (FOSGATE *et al.*, 2002) y falso-negativos por este test (BERCOVICH, 1998).

Considerando estas informaciones y debido a la escasez de estudios sobre el ELISAI para el serodiagnóstico de la brucelosis bovina en Brasil, el objetivo del presente estudio fue comparar el desempeño del 2-ME con relación al FC, el AAT y ELISAI frente al *gold standard* (derivado de la combinación de los tests FC y 2-ME) y el ELISAI con relación al AAT para el diagnóstico de la brucelosis en esta especie visando contribuir para el avance del PNCEBT.

MATERIAL Y MÉTODOS

Delineamento experimental

Fueron utilizados sueros sanguíneos de 200 hembras de bovinos sometidos a cuatro diferentes tests, visando el diagnóstico serológico de la brucelosis. Los tests, realizados simultáneamente considerando las interpretaciones en serie y en paralelo, fueron: AAT, ELISAI, 2-ME y FC.

Animales y muestras

En el período de enero a diciembre de 2002, fueron obtenidas muestras de suero de 200 hembras bovinas adultas (24 a 60 meses) de la raza Nelore (aptitud para carne), provenientes de dos propiedades situadas en la región de Araçatuba, norte del Estado de São Paulo y denominadas, en el presente estudio, de propiedad A (grupo A) y propiedad B (grupo B).

Grupo A: rebaño compuesto de 100 hembras vacunadas para brucelosis con la cepa B19 y con histórico de problemas reproductivos compatibles con la enfermedad. Todos los animales del rebaño fueron reactivos al AAT, ejecutado por el veterinario responsable del rebaño.

Grupo B rebaño compuesto de 100 hembras vacunadas para brucelosis con la B19 y no reactivas al AAT por más de dos años. El test fue ejecutado por el veterinario responsable por el rebaño.

Antígenos

Los antígenos utilizados para el serodiagnóstico por AAT, SAT, 2-ME y FC fueron producidos en el Instituto Biológico, de acuerdo con el protocolo descrito por el Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO, 1969). Todos fueron producidos a partir de la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*.

Para detectar los anticuerpos de la clase IgG₁ contra *B. abortus* en las hembras, fue utilizado el ELISAI (*kit* Ceditest® *B. abortus*) desarrollado por el IASH-Institute for Animal Science and Health, cuyo antígeno se constituyó del lipopolisacárido (LPS) de la pared de *B. abortus* muestra 99 en la dosis de reactividad óptima (INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE AND HEALTH, 2000).

Protocolo de los tests

Los tests AAT, 2-ME y SAT fueron realizados de acuerdo con ALTON *et al.* (1988). La interpretación de sus resultados fue realizado de acuerdo con el reglamento del PNCEBT (BRASIL, 2004). Se incrementaron las diluciones 1:400 y 1:800 del 2-ME, a fin de evitar el fenómeno de prozona. Los resultados considerados sospechosos por el 2-ME fueron excluidos de los análisis.

El *kit* de ELISAI Ceditest® *B. abortus* fue ejecutado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE AND HEALTH, 2000). La lectura de la densidad óptica fue hecha en aparato Multiskan, utilizándose filtro de 405nm. Los resultados fueron expresos en porcentaje de positivos (PP), considerándose como reactivos sueros con PP \geq 45% y como no reactivos, sueros con PP < 45% (WRIGHT *et al.*, 1993).

La ejecución de la FC, así como la titulación de la hemolisina, complemento y antígeno fueron hechos de acuerdo con la técnica descrita por ALTON *et al.* (1988). El título del suero fue obtenido determinándose la recíproca de la mayor dilución de la fijación del 25% del complemento. Fueron considerados como positivos sueros con títulos iguales o sobre cuatro.

Análisis de datos

Para elaborar el *gold standard* se tomó la combinación de dos tests de referencia, FC y 2-ME, (realizados simultáneamente las interpretaciones en serie y en paralelo), considerándose animales positivos para los reactivos en FC (título \geq cuatro) y en 2-ME (criterio para hembra vacunada) y como negativos los animales no reactivos en FC (título < cuatro) y en 2-ME (criterio para hembra vacunada). Ese criterio fue adoptado siguiendo

la recomendación de MARTIN *et al.* (1987). La interpretación del 2-ME siguió la legislación del PNCEBT (BRASIL, 2004) y los resultados considerados sospechosos para el 2-ME fueron excluidos de los análisis. El índice de concordancia Kappa fue calculado para todos los tests y los valores obtenidos fueron interpretados de acuerdo con LANDIS; KOCH (1977).

RESULTADOS

Todos los tests combinados detectaron 52% (52/100) sueros reactivos para el Grupo A y 98% (98/100) sueros no reactivos (para el Grupo B).

Para el grupo A, el estudio identificó 80% (80/100) de animales reactivos para brucelosis apenas en el FC y 53% (53/100) de animales reactivos para brucelosis en los tests FC y 2-ME. En ese grupo, XVIII sueros presentaron resultados sospechosos al 2-ME.

La Tabla 1 trae el resultado del 2-ME con relación al FC. Los valores encontrados de sensibilidad relativa (Sr) y especificidad relativa (Er) para el 2-ME fueron, respectivamente, 84,13% (53/63) y 93,28% (111/119). La mayor parte de los sueros (71% - 27/38) con títulos grandes al 2-ME (\geq 200 UI) mostraron títulos igualmente grandes al FC (> 32). El resultado del índice de concordancia Kappa fue 0,78 (óptimo). El porcentaje de falso-positivos fue de 6,7% (8/119) y de falso-negativos, 15,9% (10/63).

Para el AAT, las Sr y Er encontradas, con relación al *gold standard*, fueron respectivamente 100% (53/53) y 90,09% (100/111) - Tabla 2. El índice Kappa fue 0,86 (óptimo). El porcentaje de falsos positivos fue de 9,9% (11/111) y de falsos negativos 0% (0/53). Si apenas el FC hubiese sido considerado como *gold standard*, el Sr continuaría la misma - 100% (100/100) pero Er caería para 83,33% (100/120). El valor del Kappa continuaría óptimo (0,80).

Los resultados del ELISAI con relación al *gold standard* se presentan en la Tabla 3. Los valores de Sr y Er fueron, respectivamente, 98,11% (52/53) y 90,09% (100/111). La mayor parte de los sueros (72,4% - 21/29) con títulos grandes al ELISAI (PP > 112%) mostraron títulos igualmente grandes al FC (\geq 64). De los 63 sueros reactivos al ELISAI, 52 (82,5%) fueron positivos al FC y 11 fueron negativos al FC (17,5%). Apenas un suero fue positivo al FC y negativo al ELISAI, generando un porcentaje de muestras con resultados falso-negativos de 1,9% (1/53). El resultado del índice Kappa fue de 0,78 (óptimo). El porcentaje de muestras con resultado falso-positivos fue de 9,9% (11/111). Considerando apenas el FC como *gold standard*, los valores de Sr y Er caerían de, respectivamente, 98,11% para 95,0% (76/80) y de 90,09% para 84,17% (101/120). El Kappa continuaría óptimo (0,77). Sin embargo, al envés de 11, habrían 17 resultados falso-positivos.

ELISAI x AAT

Comparando el ELISAI con el AAT como padrón para el serodiagnóstico en este estudio, se obtuvo un Sr de 93% (93/100) y un Er de 98% (98/100), con apenas tres resultados discordantes (Tabla 4). El resultado del Kappa fue óptimo (0,91). El porcentaje de muestras con resultados falso-positivos fue de 2,0% (2/100) y con resultados falso-negativos 7,0% (7/100).

DISCUSIÓN

El valor de Er del 2-ME encontrada en este estudio (93,3%) fue poco mas baja de los resultados relatados por STEMSHORM *et al.* (1985) y PAULIN *et al.* (2002), respectivamente 99,8% y 95,6%. La Sr (84,13%) también fue mas baja del relatado por PAULIN *et al.* (2002), 96,8% así como el resultado del Kappa - 0,78 contra 0,92 encontrado por PAULIN *et al.* (2002).

De las 18 muestras discordantes del Grupo A, ocho sueros fueron reactivos al 2-ME, entretanto negativos al FC y 10 (55,6%) fueron positivos al FC pero no reactivos al 2-ME (Tabla 1).

Un dato que llama la atención es el porcentaje de resultados falso negativos del 2-ME en relación al FC. Este hecho tal vez pueda ser explicado analizándose la epidemiología de la brucelosis, caracterizada por expandirse rápidamente en el rebaño. Si el organismo del hospedero afectado no tuvo tiempo hábil para desenvolver respuesta inmune humoral, no habrá concentración de anticuerpos suficiente para causarseñal en un test con limite de detección bajo, como es el caso del 2-ME. De los 63 sueros positivos al FC (en títulos que variaran de cuatro a 32), diez (55,6%) no reaccionaron al 2-ME, lo que sugiere mayor sensibilidad del FC con relación al 2-ME, debido al límite de detección del primer test ser mas alto de que del segundo (KRUZE, 1975).

Tabla 1 - Resultados del 2-ME frente al test FC (criterio para hembra vacunada). São Paulo, 2007.

2-ME	FC									Total
	positivos						negativos			
	≥4 a 16	>16 a 32	>32 a 64	>64 a 128	>128	total	negativo	>0 a <4	total	
25/25	1	01				02	04		04	06
25/50										
25/100										
50I/50I							02		02	02
50/50	1					01				01
50I/100	1					01	01		01	02
50/100		01				01				01
100I/100I		01				01				01
100I/100							01		01	01
100/100	3		01			04				04
100/200	1	01	01			03				03
200I/200I		01		01		02				02
200/200	4	07	12	09	06	38				38
Total	11	12	14	10	06	53 (a)	08	-	08 (b)	61
No Reactores	06	04				10 (c)	110	01	111 (d)	121
Total	17	16	14	10	06	63	118	01	119	182

2-ME - test 2-mercaptoetanol; FC - teste fijación del complemento. Kappa - 0,78 (concordancia óptima)

Tabla 2 - Resultados del AAT frente al *gold standard* (combinación de los tests FC y 2-ME). São Paulo, 2007.

<i>gold standard</i> (FC + ME)	Positivo	Negativo	Total
AAT			
Positivo	53	11	64
Negativo	0	100	100
Total	53	111	164

AAT - test del antígeno acidificado amortiguado Rosa de Bengala; 2-ME - test 2-mercaptoetanol; FC - test fijación del complemento. Kappa - 0,86 (concordancia óptima)

Tabla 3-Resultados ELISAI frente al *gold standard* (combinación de los tests FC y 2-ME). São Paulo, 2007.

ELISAI	<i>gold standard</i> (FC + 2-ME)									Total
	positivos					negativos				
Reactores	≥ 4 a 16	>16 a 32	>32 a 64	>64 a 128	>128	total	negativo	>0 a <4	total	
>45 a 67,2					1	1	1	1	2	
>67,2 a 90	1	3		1		5	3		3	
>90 a 112	7	4	3	2	1	17	5		5	
>112	4	4	11	5	5	29	1		1	
Total de reactores	12	11	14	8	7	52 (a)	10	1	11 (b)	63
No reactores										
≥6 a < 45				1						
Totais no reactores				1		1 (c)	100		100 (d)	101
Total						53	110	1	111	164

ELISAI - test inmunoenzimático ELISA indirecta; 2-ME - test 2-mercaptoetanol; FC - test fijación del complemento. Kappa - 0,84 (concordancia óptima).

Tabla 4 - Resultados del test ELISAI frente al test AAT. São Paulo, 2007.

AAT ELISAI	Positivo	Negativo	Total
Positivo	93	2	95
Negativo	7	98	105
Total	100	100	200

ELISAI - test inmunoenzimático ELISA indirecta; AAT - test del antígeno acidificado amortiguado. Kappa - 0,91 (concordancia óptima).

Para el AAT, la Sr encontrada fue de 100%, mayor que las encontradas por DAVIES (1971) y DAJER *et al.* (1999), respectivamente 99,6% y 98,3%. Además, el AAT detectó la mayor Sr y el mayor número de animales infectados de que cualquier otro test en este estudio, dato importante para un test generalmente adoptado como tamiz. Este resultado viene al encuentro de la actual situación epidemiológica de la brucelosis en Brasil, en que la prevalencia es de mediana a alta y donde, o los animales son vacunados o poseen historia de vacunación irregular con la cepa B19. En ambos casos, un test de Sr elevada debe ser elegido.

Sin embargo, este resultado puede incluir también falso-positivos debido a las reacciones inespecíficas (ALLAN *et al.*, 1976), generalmente, asociadas a la presencia de la inmunoglobulina de la clase IgM en el suero sanguíneo (CORBEL, 1985). La acidificación de la suspensión de antígenos aumenta el poder de aglutinación del anticuerpo de la clase IgG₁ y reduce la reactividad de la mayor parte de los anticuerpos de la clase IgM (WRIGHT; NIELSEN, 1990). Por otro lado, CHAPPEL (1989) refiere que no hay total inactivación de esta anticuerpos. Por lo tanto, el AAT puede ser utili-

zado como tamiz, con tanto que uno o mas tests específicos y de sensibilidades relativas elevadas sean usados como confirmatorio.

El valor de la Er fue óptimo (90,1%) y mejor que el encontrado por DAVIES (1971) y DAJER *et al.* (1999), respectivamente 83,1% y 68,8%.

Para el ELISAI, la Sr obtenida en este estudio fue de 98,1%, número semejante a los encontrados por UZAL *et al.* (1995), SAMARTINO *et al.* (1999) y VANZINI *et al.* (1998). UZAL *et al.* (1995) relataron Sr de 98,7%, adoptándose punto de corte de 40% de PP (mas bajo del adoptado en este estudio, que fue de 45% de PP), mientras que SAMARTINO *et al.* (1999) demostraron Sr de 98,2% con punto de corte también de 40% PP. Sin embargo, VANZINI *et al.* (1998) verificaron Sr un poco mas elevada (99,6%). Entre tanto, el punto de corte adoptado por este autor fue mas alto de que el adoptado en el trabajo (53% PP).

Cuanto Er, el presente estudio obtuvo el valor de 90,1%, mas bajo dos que los obtenidos por UZAL *et al.* (1995) e SAMARTINO *et al.* (1999), respectivamente 98,9%, y 98,6%. Importante reiterar que los tres autores adoptaran puntos de corte distintos del presente estudio, lo que puede alterar el resultado del test.

Cuando se comparó el ELISAI con el AAT, la Sr del ELISAI fue mas baja do que la del AAT (98,1% versus 100%). Todavía, la Er fue la misma (90,1%) y, cuando el ELISAI fue comparado con el AAT, el Kappa encontrado fue 0,91 (óptimo), así como los valores de Sr y Er, respectivamente 93% e 98%.

Uno dato interesante que merece ser mencionado es que VANZINI *et al.* (1998) no notaram diferencia significativa en los valores epidemiológicos cuando sometieron sueros al ELISAI tanto para hembras adultas vacunadas como para hembras adultas no vacunadas.

CONCLUSIONES

Analizando los resultados de sensibilidad y especificidad relativas de los tests, el porcentaje de falso-negativos por los resultados sospechosos presentados por el 2-ME, los resultados falso-positivos del ELISAI, así como la facilidad de realización de los tests, podemos concluir:

1 - La opción de constituirse el *gold standard* basado en al menos dos tests fue la mas adecuada para este estudio;

2 - El AAT y el ELISAI son buenos métodos de tamiz para el diagnóstico serológico de la brucelosis. Sin embargo, el uso del AAT como tamiz es recomendado si un o más tests específicos y de óptimas sensibilidades sean utilizados como confirmatorios. Para esta finalidad, el ideal seria trabajar con tests cualitativos con alto límite de detección, en que los sueros no necesitasen ser inactivados o tratados, no hubiese necesidad de titulación periódica de los reactivos utilizados y el operador no manipulase elementos tóxicos, como ocurre con los tests FC y 2-ME;

3 - El ELISAI generó valores de especificidad y sensibilidad relativas semejantes al AAT. Sin embargo, el ELISAI ofrece ventajas como: a) Su punto de corte puede ser ajustado de acuerdo con la prevalencia de enfermedad en la población; b) La manipulación de datos es hecha electrónicamente, o sea, la lectura es objetiva; c) El ELISAI puede ser automatizado, permitiendo el procesamiento de gran número de muestras; d) La literatura consultada relata que no hay diferencia significativa en los valores epidemiológicos cuando se analiza suero tanto de hembras vacunadas como de no vacunadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Eliana Monteforte Cassaro Villalobos por la gentileza en asistir en la ejecución del test de ELISAI.

REFERENCIAS

- ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; McPHERSON, G.G. The serological diagnosis of bovine brucellosis: as evaluation of the complement fixation test, serum agglutination, and rose bengal tests. *Australian Veterinary Journal*, v.51, n.2, p.57-63, 1978.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: Intitut National de la Recherche Agronomique, 1988. 545p.
- 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. *Journal of Hygiene of Cambridge*, v.76, p.287-298, 1976.
- BERCOVICH, Z. Maintenance of *Brucella abortus* - free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. *Veterinary Quarterly*, v.20, n.3, p.81-88. 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Planos e Programas. Programas. Área Animal. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCBT)*. Instrução Normativa do Serviço Nacional Animal número 6, de oito de janeiro de 2004. Regulamento PNCEBT. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2007.
- CORBEL, M.J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. *Veterinary Bulletin*, v.55, n.12, p.927-942, 1985.
- CASAS-OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis animal. Boletín do Centro Panamericano de Zoonosis. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, v.18, n.3/4, p.107-139, 1976.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. *Elaboración y normatización de antígenos para las pruebas de sero-aglutinación de la brucelosis*. Ramos Mejía: Organización Panamericana de la Salud, Organización 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.; GURRIA, F.; NIELSEN, K.; GALL, D. Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, v.40, n.4, p.67-73, 1999.
- DAVIES, G. The Rose Bengal test. *The Veterinary Record*, v.88, p.447-449, 1971.

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION . FAO. *Bovine brucellosis*. Health and diseases cards. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 23 mai 2005.
- FOSGATE, G.T.; ADESIYUN, A.A.; HIRD, D.W.; JOHNSON, W.O.; HIETALA, S.K.; SCHURIG, G.G.; RYAN, J. Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). *American Journal of Veterinary Research*, v.63, n.11, p.1473-1608, 2002.
- INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE AND HEALTH. *Ceditest® Brucella abortus. ELISA for detection of antibodies against Brucella abortus in bovine serum and milk*. Lelystad: I.A.S.H., 2000. 9p.
- KRUZE, M.V. Métodos de diagnóstico en el control de brucelosis bovina. II. Métodos serológicos. *Archivos Medicina Veterinaria*, v.7, n.2, p.52-64, 1975.
- LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, n.33, p.159-174, 1977.
- MARTIN, S.W., MEEK, A.H., WILLEBERG, P. *Veterinary epidemiology: principles, and methods*. Ames: Ames University Press, 1987. 343p.
- NICOLETTI, P. An evaluation of serological tests used to diagnose brucellosis in buffalos (*Bubalus bubalis*). *Tropical Animal Health and Production*, v.24, n.1, p.40-44, 1992.
- NIELSEN, K.; HECH, F.; WAGNER, G.; STILLER, J.; ROSENBAUM, B.; PUGH, R.; FLORES, E. Comparative assessment of antibody isotopes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assays. *Preventive Veterinary Medicine*, v.2, p.197-204, 1984.
- NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.27, p.9-17, 1995. [Extraordinary. Revisões Bibliográficas].
- NIELSEN, K.; KELLY, L.; GALL, D.; NICOLETTI, P.; KELLY, W. Improved CELISA for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.48, p.285-295, 1995.
- ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. *Bovine brucellosis*. Article 2.3.1.1. Terrestrial Animal Health Code 2005, Part 2, Section 2.3, chapter 2.3.1. Disponível em: <<http://www.oie.int.htm>>. Acesso em: 23 set. 2005.
- PAULIN, L.M.S.; 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. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.69, n.4, p.41-47, 2002.
- PAULIN, L.M.S. *Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por Brucella abortus em búfalos (Bubalus bubalis)*. São Paulo, 2006. 92p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006a.
- PAULIN, L.M.S. Brucelosis en animales de América del Sur. Estrategias de control. In: CACHIONE, R. A.; DURLACH, R.; LARGHI, O.P.; MARTINO, P. (Ed.). *Temas de zoonosis III*. Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis, 2006b. p.130-140.
- SAMARTINO, L.E.; GALL, D.; GREGORET, R.J.; NIELSEN, K. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine. *Veterinary Microbiology*, v.70, p.193-200, 1999.
- SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA. (Argentina). Marco legal. Resoluciones ex SENASA n. 1484/83. Producto veterinario, diagnóstico. Brucelosis. Artículo n. 10, parágrafo VI. Disponível em: <<http://www.senasa.gov.ar>>. Acesso em: 12 set. 2003.
- STEMSHORN, B.W.; FORBES, L. B; EAGLESOME, M. D.; NIELSEN, K. H.; ROBERTSON, F.J.; SAMAGH, B.S. A comparison of standard serological tests for the diagnosis of bovine brucellosis in Canada. *Canadian Journal Comparative Medicine*, v.49, n.4, p.391-394, 1985.
- TIZARD, I.R. Serologic assays. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.181, n.10, p.1162-1165, 1982.
- UZAL, F.A.; CARRASCO, E.A.; ECHAIDE, S.; NIELSEN, K.; ROBLES, C.A. Evaluation of an indirect ELISA for diagnosis of bovine brucellosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.7, n.4, p.473-475, 1995.
- VANZINI, V.R.; AGUIRRE, N.; LUGARESI, C.I.; DE ECHAIDE, S.T.; DE CANAVESIO, V.G.; GUGLIEMONE, A.A.; MARCHESINO, M.D.; NIELSEN, K. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, v.36, p.21-217, 1998.
- WRIGHT, P.F.; NIELSEN, K. Current and future serological methods. In: ADAMS, G. (Ed.). *Advances in Brucellosis research*. Texas: A&M University Press, College Station, 1990. p.305-319.
- WRIGHT, P.F.; NILSSON, E.; VAN ROOIJ, E.M.A.; LELENTA, M.; JEGGO, M.H. Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Revue Scientifique et Technique*, v.12, p.435-450, 1993.

Recibido en 17/4/07

Aceptada en 10/12/08