

Comparação de três testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*

Comparison of three serological tests applied to diagnosis of the *Brucella canis* infection in dogs

Sérgio Santos de AZEVEDO¹;
Sílvia Arruda VASCONCELLOS¹;
Lara Borges KEID¹;
Lília Márcia Paulin da Silva
GRASSO²;
Sônia Regina PINHEIRO¹;
Roberta MASCOLLI¹;
Clebert José ALVES³

1- Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP
2- Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo - SP
3- Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Patos - PB

Correspondência para:

SÉRGIO SANTOS DE AZEVEDO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira
05508-270 - São Paulo - SP
sergio@vps.fmvz.usp.br

Recebido para publicação: 27/08/2003
Aprovado para publicação: 25/03/2004

Resumo

Foram comparados os testes de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), imunodifusão em gel de ágar em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol (IDGA-ME) e reação de fixação de complemento (CFT), aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*. O antígeno utilizado nas técnicas de IDGA e IDGA-ME constituiu-se de lipopolissacarídeos e proteínas de *Brucella ovis*, amostra Reo 198, e na CFT, o antígeno empregado foi a *Brucella ovis*, amostra 63/290. Foram examinadas 80 amostras de soro sanguíneo de cães colhidas durante a campanha de vacinação anti-rábica animal do Município de Santana de Parnaíba-SP, realizada em agosto de 1999. As provas sorológicas foram comparadas, duas a duas, pelo teste de Mc Nemar, e a concordância foi analisada pelo indicador Kappa. A concordância entre as técnicas de CFT e IDGA-ME foi regular (Kappa = 0,54), entre as técnicas de IDGA e CFT foi sofrível (Kappa = 0,36) e entre as provas de IDGA e IDGA-ME também foi sofrível (Kappa = 0,39).

Palavras-chave:

Sorologia.
Diagnóstico.
Brucelose canina.
Brucella canis.

Introdução

A brucelose canina por *Brucella canis* é uma doença infecto-contagiosa, de caráter zoonótico, caracterizada, principalmente, por abortamentos e esterilidade nas fêmeas e orquite e epididimite nos machos, e que tem grande importância econômica para criadores de cães de raça em virtude dos problemas reprodutivos que acarreta^{1,2}. Foi descrita inicialmente por Carmichael³, durante episódios de abortamentos em canis de Nova Jersey, Estados Unidos da América.

O caráter zoonótico da brucelose canina por *Brucella canis* deve ser considerado em virtude da complexa relação da

população canina com os seres humanos⁴, e principalmente pelo estreito contato estabelecido entre cães e crianças. Os principais sinais clínicos nos seres humanos são febre, calafrios, fadiga muscular, sudorese profusa, mal-estar, linfadenomegalia e perda de peso. As complicações incluem endocardite, miocardite, pericardite, meningite, artrite, hepatite e abscessos viscerais.^{1,5,6}

Devido à praticidade, os testes sorológicos são os mais comumente usados para o diagnóstico da infecção por *Brucella canis* em cães. As suas vantagens em relação ao isolamento bacteriano são: facilidade na execução, rápido processamento e a possibilidade do exame de um número

considerável de amostras.^{2,7,8} A desvantagem é que, algumas vezes, a maioria dos testes não são específicos para *Brucella canis* e podem dar resultados falso-positivos. Por outro lado, o cultivo bacteriano fornece um diagnóstico definitivo quando a bactéria é isolada; no entanto, é um procedimento muito laborioso, demorado e pode redundar em resultados falso-negativos.^{1,2,5,9,10}

Dentre as provas sorológicas mais amplamente utilizadas no diagnóstico da brucelose por *Brucella canis* em cães encontra-se o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA).^{1,11} O compartilhamento de antígenos entre *Brucella canis* e *Brucella ovis* possibilita o emprego indistinto de reativos produzidos a partir destes dois microorganismos para o diagnóstico da brucelose em ovinos e caninos. Particularmente, a IDGA tem sido de grande aplicação. Por este teste, os anticorpos podem ser detectados a partir de oito a 12 semanas após a infecção e persistem durante vários anos.¹ No Brasil, o teste de IDGA tem sido executado com o “*kit*” produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), no qual o antígeno é constituído por proteínas e lipopolissacarídeos extraídos da *Brucella ovis*, amostra Reo 198, padronizado por comparação com o antígeno de referência.

Com o objetivo de diminuir o número de reações falso-positivas na IDGA, tem sido realizado o tratamento prévio dos soros pelo 2-mercaptoetanol (2-ME).⁹ O 2-ME desnatura a IgM através da destruição das pontes dissulfídicas. A molécula de IgM tem uma maior característica de aglutinação não-específica que a molécula de IgG^{2,12}, e, dessa forma, o emprego do 2-mercaptoetanol reduz o número de reações inespecíficas.

A reação de fixação de complemento é amplamente utilizada para o diagnóstico da infecção por *Brucella ovis* e *Brucella abortus* e apresenta sensibilidade e especificidade elevadas. Nas campanhas de erradicação da brucelose bovina e ovina realizadas com sucesso em diversos países, essa foi a prova sorológica utilizada como teste confirmatório.^{13,14,15,16} No entanto, é pouco utilizada na rotina para o diagnóstico da

infecção de cães por *Brucella canis* no Brasil.

O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo comparativo das técnicas de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), imunodifusão em gel de ágar em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol (IDGA-ME) e reação de fixação de complemento (CFT), aplicadas ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*.

Materiais e Métodos

Amostras de soro sanguíneo de cães

Em 2002, foi realizado um inquérito sorológico para a brucelose por *Brucella canis* em cães do Município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo¹⁷, aproveitando como momento estratégico a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. Para este estudo, a amostra utilizada foi de 410 animais, dos quais 39 (9,51%) foram positivos pela IDGA. Essa amostra foi calculada com base na população total de cães do município, estimada a partir da população humana de 60.000 habitantes. Para o cálculo da proporção cão/homem foi utilizada a relação de 1:6, que redundou em um total de 10.000 animais. O cálculo da amostra foi executado considerando-se um nível de confiança de 95%, a possibilidade de detecção da doença de 50% (correspondente a doenças de desconhecida ocorrência em determinada população) e um erro estatístico de 4,7%, resultando no N amostral de 410. No presente estudo, foram utilizadas estas 39 amostras positivas pela IDGA e 41 amostras negativas sorteadas aleatoriamente, totalizando 80 amostras, nas quais foram aplicadas as técnicas de imunodifusão em gel de ágar em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol (IDGA-ME) e reação de fixação de complemento (CFT).

Provas sorológicas

Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)

Foram utilizados “*kits*” produzidos

pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). A técnica foi executada de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando-se antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas de *Brucella ovis*, amostra Reo 198. As leituras foram realizadas com 24, 48 e 72 horas, utilizando-se sistema de iluminação com luz indireta e fundo escuro. O resultado considerado foi o da leitura de 72 horas. O soro cuja linha de precipitação apresentou identidade com a linha formada pelo soro padrão foi considerado positivo. O soro foi considerado negativo quando não houve formação de linha de precipitação ou a linha formada não apresentou identidade com a do soro padrão.

Imunodifusão em gel de ágar em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol (IDGA-ME)

Os soros foram submetidos à diluição em solução de 2-mercaptoetanol 0,2M. Assim, em 50 mL de soro, foram adicionados 50 mL da solução de 2-mercaptoetanol, permanecendo em reação durante 30 minutos⁹. Logo após, os soros tratados com 2-mercaptoetanol foram submetidos à prova de IDGA.

Reação de fixação de complemento(CFT)

Foi empregada uma microtécnica, realizada em placas de poliestireno com fundo em “Ü”, com incubação à temperatura de 37°C durante 30 minutos em estufa bacteriológica, nas duas fases da reação¹⁸, utilizando-se como antígeno a *Brucella ovis*, amostra 63/290, na diluição de uso de 1:50. Inicialmente, os soros eram submetidos à diluição de 1:5 em tampão Veronal e em seguida deixados em banho-maria a 56°C durante 30 minutos, com o objetivo de inativar o complemento, para que não houvesse interferência na reação. Logo após os soros eram distribuídos na placa de poliestireno e submetidos a uma série de diluições geométricas de razão dois, obtendo-se as diluições 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Cada poço

continha 25 microlitros do soro diluído, 25 microlitros de antígeno, 25 microlitros de complemento e 25 microlitros de sistema hemolítico. Para cada placa, foram utilizados soros controles positivo e negativo, além de serem realizados os controles do soro, complemento, antígeno sem complemento e sistema hemolítico. Na interpretação, foi considerada a formação ou não de um botão de hemácias no fundo dos poços, levando-se em consideração o grau de hemólise. Os títulos dos soros foram determinados pela recíproca da maior diluição que apresentou 50% ou menos de hemólise. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram título igual ou superior a 5 (cinco).

Análise estatística

A comparação das técnicas sorológicas duas a duas foi estabelecida pelo teste estatístico de Mc Nemar¹⁹, para populações relacionadas, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade, através do programa Dag Stat²⁰. A comparação entre as concordâncias observadas e esperadas empregou o indicador Kappa, com o auxílio do programa Dag Stat²⁰.

Resultados e Discussão

Os testes sorológicos são utilizados freqüentemente para o diagnóstico da infecção de cães por *Brucella canis* por serem rápidos e de fácil execução¹. Dessa forma, a disponibilidade de métodos confiáveis é fundamental para o diagnóstico correto da doença. Por essa razão, uma diversidade relativamente grande de testes sorológicos tem sido avaliada para o uso no diagnóstico dessa doença. No presente trabalho, foram comparados os testes de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), imunodifusão em gel de ágar em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol (IDGA-ME) e reação de fixação de complemento.

Tabela 1

Comparação de três técnicas sorológicas aplicadas ao diagnóstico da brucelose canina por *Brucella canis* em 80 amostras de soros caninos colhidas durante a campanha de vacinação anti-rábica do Município de Santana de Parnaíba-SP, realizada em agosto de 1999, segundo o tipo de teste e a natureza do resultado. São Paulo, 2002

IDGA	IDGA-ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	15	24	39 (48,75%)
Negativo	0	41	41 (51,25%)
TOTAL	15 (18,75%)	65 (81,25%)	80 (100%)

$P < 0,0001$ (Teste de Mc Nemar)
 Kappa: 0,39 (concordância sofrível)
 IDGA: Imunodifusão em gel de ágar
 IDGA-ME: Imunodifusão em gel de ágar em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol

Tabela 2

Comparação de três técnicas sorológicas aplicadas ao diagnóstico da brucelose canina por *Brucella canis* em 80 amostras de soros caninos colhidas durante a campanha de vacinação anti-rábica do Município de Santana de Parnaíba-SP, realizada em agosto de 1999, segundo o tipo de teste e a natureza do resultado. São Paulo, 2002

IDGA	CFT		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	14	25	39 (48,75%)
Negativo	0	41	41 (51,25%)
TOTAL	14 (17,5%)	66 (82,5%)	80 (100%)

$P < 0,0001$ (Teste de Mc Nemar)
 Kappa: 0,36 (concordância sofrível)
 IDGA: Imunodifusão em gel de ágar
 CFT: Reação de fixação de complemento

Tabela 3

Comparação de três técnicas sorológicas aplicadas ao diagnóstico da brucelose canina por *Brucella canis* em 80 amostras de soros caninos colhidas durante a campanha de vacinação anti-rábica do Município de Santana de Parnaíba-SP, realizada em agosto de 1999, segundo o tipo de teste e a natureza do resultado. São Paulo, 2002

CFT	IDGA-ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	9	5	14 (17,5%)
Negativo	6	60	66 (82,5%)
TOTAL	15 (18,75%)	65 (81,25%)	80 (100%)

$P = 0,763$ (Teste de Mc Nemar)
 Kappa: 0,54 (concordância regular)
 CFT: Reação de fixação de complemento
 IDGA-ME: Imunodifusão em gel de ágar em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol

Na tabela 1 é apresentada a comparação das provas de IDGA e IDGA-ME. Das 39 amostras positivas pela IDGA, a IDGA-ME confirmou 15 e todas as amostras negativas na IDGA também foram negativas na IDGA-ME. A concordância observada foi sofrível, com um valor de $Kappa = 0,39$. A análise estatística dos resultados discordantes revelou diferença entre as técnicas ($P < 0,0001$). Resultado semelhante foi obtido por Keid⁹, que encontrou uma concordância fraca entre as provas de IDGA e IDGA-ME, e observou que todas as amostras negativas na IDGA também foram negativas na IDGA-ME. Essas diferenças na proporção de resultados positivos detectados pelas duas técnicas podem ser justificadas pela ocorrência de reações inespecíficas quando da utilização da IDGA, pois os antígenos da parede celular (LPS) de algumas bactérias Gram negativas apresentam reação cruzada com a *Brucella canis*.^{1,2,11} O 2-mercaptoetanol age desnaturando as moléculas de IgM, que são as responsáveis pelas reações inespecíficas, diminuindo, assim, a ocorrência dessas reações.^{2,5,12}

Na tabela 2 é apresentada a comparação das técnicas de IDGA e CFT, onde se observou um nível de concordância sofrível entre as duas técnicas ($Kappa = 0,36$). Das 39 amostras positivas na IDGA, 14 foram positivas pela CFT e todas as amostras negativas na IDGA também foram negativas na CFT. A análise estatística dos resultados discordantes revelou diferença entre as provas ($P < 0,0001$). Essa diferença entre as duas técnicas pode ser explicada pela ocorrência de reações cruzadas com outros microorganismos na IDGA.^{1,2,9,11} A técnica de fixação de complemento é uma prova de alta sensibilidade e especificidade^{14,16} e detecta IgG₁²¹, que é mais específica do que a IgM, reduzindo, assim, o número de reações falso-positivas.

Comparando-se os resultados da técnica de IDGA com os resultados da IDGA-ME e CFT, observou-se que todas as amostras negativas na IDGA também foram negativas nas provas de IDGA-ME

e CFT, e que todas as amostras positivas nas provas de IDGA-ME e CFT também foram positivas na IDGA, ou seja, a sensibilidade da IDGA em relação aos testes de IDGA-ME e CFT foi de 100%, fato este que reforça a utilização desta prova como teste de triagem no diagnóstico da brucelose canina por *Brucella canis*. A eficácia da IDGA como teste de triagem no diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis* foi constatada por vários autores^{8,9}, utilizando-se como teste padrão um método direto.

A comparação das provas de IDGA-ME e CFT é apresentada na tabela 3. Das 15 amostras positivas na IDGA-ME, seis foram negativas na CFT, e das 14 amostras positivas na CFT, cinco foram negativas na IDGA-ME. As provas apresentaram concordância regular ($Kappa = 0,54$), e a análise estatística dos resultados discordantes entre os dois testes não revelou diferença significativa ($P < 0,763$). A presença de animais positivos na IDGA-ME e negativos na CFT pode ser decorrência de reações inespecíficas, pois a IDGA-ME reduz o número de resultados falso-positivos, mas não os elimina totalmente².

Relativamente à correlação entre os diferentes testes, os menores valores do indicador Kappa foram observados na comparação da IDGA – considerada prova de triagem – com a IDGA-ME e CFT, consideradas provas confirmatórias. O maior coeficiente de concordância foi observado entre as provas de IDGA-ME e CFT. Estes resultados podem ser justificados pelo fato da IDGA reagir indistintamente com IgM e IgG, contrariamente à IDGA-ME e CFT, que apresentam reações preferencialmente com IgG, considerada a classe de imunoglobulina de maior especificidade no diagnóstico da doença^{2,5,12}.

A prova de IDGA-ME vem sendo utilizada no diagnóstico da infecção por *Brucella canis*⁹ e destaca-se por apresentar elevada especificidade. Keid⁹, observou uma especificidade de 98,7% para a IDGA-ME, utilizando-se como teste padrão a hemocultura. O mesmo autor refere que a

prova de IDGA deve ser utilizada como teste de triagem para o diagnóstico da brucelose canina por *Brucella canis*, e que os resultados positivos neste procedimento deverão ser confirmados pela IDGA-ME associada a um método de diagnóstico direto, como a hemocultura ou PCR de sêmen ou *swab* vaginal.

No presente trabalho, a concordância regular da CFT comparativamente à IDGA-ME sugere a sua utilização para o diagnóstico sorológico da brucelose canina por *Brucella canis*, no entanto, estudos futuros de validade são necessários, utilizando-se como teste padrão um método direto, visto que esta técnica ainda não é padronizada para o

diagnóstico da brucelose canina por *Brucella canis* no Brasil.

Conclusões

A concordância entre as técnicas de CFT e IDGA-ME foi regular (Kappa = 0,54), entre as técnicas de IDGA e CFT foi sofrível (Kappa = 0,36) e entre as provas de IDGA e IDGA-ME também foi sofrível (Kappa = 0,39). Os dados sugerem a utilização da reação de fixação de complemento no diagnóstico sorológico da brucelose canina por *Brucella canis*, no entanto, estudos futuros de validade são necessários, utilizando-se como teste padrão um método direto.

Abstract

The agar gel immunodiffusion test (AGID), agar gel immunodiffusion test in sera treated by 2-mercaptoethanol (ME-AGID) and complement fixation test (CFT), applied to diagnosis of the canine brucellosis due to *Brucella canis*, were compared. For this purposes, 80 blood samples from dogs were collected during the rabies vaccination campaign of Santana de Parnaíba municipality, State of São Paulo, in August 1999. The antigens used in the AGID and ME-AGID tests were lipopolysaccharides and proteins from *Brucella ovis*, strain Reo 198, and in the CFT, the antigen employed was *Brucella ovis*, strain 63/290. The serological tests were compared two by two by Mc Nemar test, and the agreement was analyzed by the Kappa indicator. The agreement between the CFT and ME-AGID was moderate (Kappa = 0.54), between the AGID and CFT was fair (Kappa = 0.36) and between the AGID and ME-AGID was fair (Kappa = 0.39).

Key words:

Serology.
Diagnosis.
Canine brucellosis.
Brucella canis.

Referências

1. CARMICHAEL, L. E.; GREENE, C. E. Canine brucellosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p. 248-257.
2. JOHNSON, C. A.; WALKER, R. D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. Small Animal**, v. 14, n. 6, p. 763-772, 1992.
- 3 - CARMICHAEL, L. E. Abortions in 200 Beagles. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 149, n. 8, p. 1126, 1966.
4. CÔRTEZ, J. A.; OLIVEIRA, M. C. G.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Reações sorológicas para *Brucella canis* em cães errantes capturados na proximidade dos parques públicos, reservas florestais e em áreas periféricas do município de São Paulo-Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 101-107, 1988.
5. GREENE, C. E.; GEORGE, L. W. Canine brucellosis. In: GREENE, C. E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1984. p. 646-662.
6. HARTIGAN, P. J. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. **Irish Veterinary Journal**, v. 50, n. 3, p. 179-180, 1997.
7. ALMEIDA, A. C.; MENESES, A. M.; BERNIS, V. M. O.; SOARES, T. M. P.; LOIOLA, C. F.; MARINOVICK, C.; PEREIRA, P. A. S. S oroprevalência de brucelose canina na cidade de Alfenas, MG. Dados preliminares. **Arquivo Brasileiro de Medicina**

- Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 3, p. 358-360, 2001.
8. IRIBARREN, F.; BREGLIA, J.; CASTILLO, M.; ESCOBAR, V.; HOFFMAN, F. Comparación de las pruebas de inmunodifusión del gel de agar con antígeno de *Brucella ovis* y de aglutinación en placa con *Brucella canis* M(-) para el diagnóstico de la brucelosis canina. **Veterinaria Argentina**, v. 16, n. 152, p. 146-151, 1999.
 9. KEID, L. B. **Diagnóstico da brucelose canina por *Brucella canis***. Correlação entre exames clínicos e laboratoriais: imunodifusão em gel de ágar, imunodifusão em gel de ágar com emprego do 2-mercaptoetanol, cultivo e reação em cadeia pela polimerase. 2001. 96 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
 10. MOORE, J. A. *Brucella canis* infection in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 155, n. 12, p. 2034-2037, 1969.
 11. CARMICHAEL, L. E. Brucelosis canina causada por *B. canis*: enfermidade clínica; problemas em imunodiagnóstico. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 80, n. 2, p. 102-106, 1998.
 12. CARMICHAEL, L. E.; SHIN, S. J. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 11, n. 3, p. 161-165, 1996.
 13. ESTEIN, S. M. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 31, n. 1, p. 5-17, 1999.
 14. HILBINK, F.; WRIGHT, M.; ROSS, G. Use of the double immuno gel diffusion test and the enzyme-linked immunosorbent assay to distinguish false from true reactors in the complement fixation test for *Brucella ovis*. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 41, n. 3, p. 111-115, 1993.
 15. MATHIAS, L. A.; ALBERTO, L. H.; ROXO, E.; PERECIN, D.; GIRIO, R. J. S. Avaliação de uma microtécnica de fixação de complemento no diagnóstico sorológico da brucelose bovina e comparação entre os antígenos particulado e lipopolissacáride. **Ars Veterinária**, v. 7, n. 1, p. 38-48, 1991.
 16. WORTHINGTON, R. W.; STEVENSON, B. J.; LISLE, G. W. Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 33, n. 6, p. 84-86, 1985.
 17. AZEVEDO, S. S. **Brucelose por *Brucella canis* em cães do Município de Santana de Parnaíba-SP, Brasil**. Inquérito sorológico, fatores de risco e comparação de testes diagnósticos. 2002. 100 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
 18. GARIN-BASTUJI G.; BLASCO, J. M. Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). In: **OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. O.I.E., Paris: **Office International des Epizooties**, 1996. p. 343-349.
 - 19 - ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663 p.
 20. MACKINNON, A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. **Computers in Biology and Medicine**, v. 30, n. 3, p. 127-134, 2000.
 21. WORTHINGTON, R. W.; WEDDELL, W.; PENROSE, M. E. A comparison of three serological tests for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 32, n. 4, p. 58-60, 1984.