



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DO TESTE DO ANTÍGENO ACIDIFICADO
TAMPONADO EM SOROS TRATADOS COM RIVANOL
COMO TESTE CONFIRMATÓRIO NO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA BRUCELOSE BOVINA**

Raphaella Barbosa Meirelles

Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO TESTE DO ANTÍGENO ACIDIFICADO
TAMPONADO EM SOROS TRATADOS COM RIVANOL
COMO TESTE CONFIRMATÓRIO NO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA BRUCELOSE BOVINA**

Raphaella Barbosa Meirelles

Orientador: Prof. Dr. Luis Antonio Mathias

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do
título de Mestre em Medicina
Veterinária (Medicina Veterinária
Preventiva)

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Fevereiro – 2008

Meirelles, Raphaella Barbosa
M514a Avaliação do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose bovina / Raphaella Barbosa Meirelles. -- Jaboticabal, 2008
ix, 86 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.

Orientador: Luís Antonio Mathias

Banca examinadora: Samir Issa Samara, Jane Megid

Bibliografia

1. Brucelose. 2. Concordância. 3. Rivanol. I. 4. Sorologia. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-072.5:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAPHAELLA BARBOSA MEIRELLES – nascida em São José do Rio Preto – SP, em 18 de abril de 1981, é Médica Veterinária formada pelo Centro Universitário de Rio Preto – Unirp, situado na cidade de São José do Rio Preto – SP, em dezembro de 2004. Na graduação, de março de 2003 a fevereiro de 2004, foi bolsista de iniciação científica pela Fapesp. Durante o primeiro ano de formada, de março 2005 a fevereiro de 2006, obteve uma bolsa de treinamento técnico nível III da Fapesp, com as atividades realizadas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal. Iniciou o curso de pós-graduação em março de 2006, na qual contou com o apoio da Fapesp com bolsa de mestrado durante o período de outubro 2006 a agosto 2007. Exerce, desde setembro de 2007, a função de professora nas disciplinas de “Epidemiologia Veterinária”, “Doenças Infecciosas”, “Zoonoses e Saúde Pública” e “Defesa Sanitária Animal” no Centro Universitário de Rio Preto, contratada após aprovação em concurso”.

“Grandes realizações são possíveis

quando se dá atenção aos pequenos começos”

Lao Tsé

Dedico esta vitória à minha maior saudade, minha querida avó materna, Elídia Tabarine Barbosa (in memoriam), por seu amor incondicional e tantos momentos felizes. Vó Lídia, amo muito você!

A Deus, pelo seu amor e por ter ordenado que eu alcançasse um grande objetivo em minha vida, e aos meus pais, por terem permitido que essa ordem fosse cumprida. Obrigada!

*Ao meu eterno professor, amigo, namorado,
noivo e finalmente amado esposo, **Daniel Bartoli
de Sousa**, dedico esta conquista e agradeço
muitíssimo pelo amor imensurável, pelo incentivo
em todas as etapas da minha vida, pela
“paciência” que tem por mim, pela experiência
sempre compartilhada, pelos conselhos dados,
pelos ensinamentos nunca interrompidos, por
seu caráter distinto e por sua autenticidade
profissional, em que me espelho e que continuo
perseguindo incansavelmente. Obrigada por me
proporcionar o dia mais feliz da minha vida,
07/07/2007, a data do nosso casamento !!!*

EU TE AMOOOOOOOOO !!!!

DEDICATÓRIAS

Ao meu pai, **Oswaldo Meirelles de Oliveira Filho**, e à minha mãe, **Edna Barbosa Meirelles**, pelo amor, pela compreensão, e principalmente por terem se privado de muitos prazeres da vida para me proporcionar uma das maiores heranças que se pode deixar a um filho: cultura e educação. Obrigada, do fundo do meu coração!

Ao meu irmão, **Oswaldo Meirelles de Oliveira Neto**, obrigada por sua amizade e cumplicidade em todos esses anos de vida! Valeu, Netão!

Ao meu avô materno, **Pedro Valêncio Barbosa**, pelo constante incentivo em minha carreira profissional. Obrigada, Vô Pedro!

À minha avó paterna, **Maria Vicente Oliveira**, pelas orações frente a cada obstáculo que tive. Obrigada, Vó Maria!

Ao meu avô paterno, **Oswaldo Meirelles de Oliveira** (*in memoriam*), que, apesar de poucos anos de convivência, também deve estar muito feliz por mim, onde quer que esteja.

Aos meus pais mexicanos, **Arturo** e **Estela** Saavedra Valdez; e aos meus irmãos mexicanos, **Cláudia**, **Asharia**, **Mário** e **Yasel**; muito obrigada pelo amor de vocês. Vocês fazem parte do meu sucesso profissional e da minha vida! Los quiero mucho y los extraño demasiado!

A minha sogra, **Leonice Bartoli**, e ao meu cunhado-irmão, **Danilo Bartoli de Sousa**, pelo amor, pelo apoio, pela alegria, mas principalmente pelas pessoas iluminadas que vocês são.

E a toda minha **família** e **amigos** que torceram por mim e acreditarem em mim!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Dr. Luis Antonio Mathias**, mais que um professor, um exemplo de conduta a ser seguido em todos os momentos. Homem de valor, ético, obstinado pela sua profissão, presente decisivamente em todas as etapas para a conclusão desta dissertação, mesmo tendo tantas outras atribuições, sempre esteve pronto para me ajudar, compartilhando seus conhecimentos e dando conselhos, que são de grande importância em minha vida pessoal e profissional.

Aos meus professores da pós-graduação: **Ângela**, por seu carinho e sua confiança; **Adolorata**, por sua espontaneidade e amizade; **Luis Augusto do Amaral**, por sua serenidade e sabedoria; **Samir**, por sua experiência e animação; **Adjair**, por sua descontração e alegria; **Duri**, por sua sensatez e imparcialidade; **Glorinha** por sua simpatia e dedicação profissional. Qualidades de mestres, ensinamentos que jamais serão esquecidos! Obrigada!

Ao técnico **Nivaldo Aparecido Assis**, obrigada pela amizade e pela paciência em ensinar. Mas principalmente pela ajuda com os testes sorológicos.

A todos os **funcionários** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Unesp de Jaboticabal-SP, obrigada pelo agradável convívio.

À minha amiga **Michelle Brich**, obrigada pela amizade, pelo companheirismo, pelo carisma e pela força em todos os momentos, que tanto precisei.

À minha amiga **Poliana de Castro Melo**, obrigada pela parceria sempre presente em todas as disciplinas que cursamos juntas, pela companhia nos congressos e pelos momentos de descontração compartilhados.

À minha amiga **Fernanda de Rezende Pinto**, obrigada pela amizade e pela ajuda profissional nos momentos de sufoco durante a elaboração desta dissertação.

À minha amiga **Fernanda Senter Magajevski**, obrigada pela oportunidade do treinamento técnico, pela confiança e pelo carinho.

À minha amiga **Karina Paes Burger**, obrigada pela amizade e pelas experiências trocadas durante o estágio de docência.

À minha eterna amiga **Neide Suely Palmejani Belotto**, companheira nos anos de faculdade, madrinha de casamento, confidente nos momentos alegres e tristes. Obrigada por ter cruzado pelo meu caminho e fazer parte da minha vida. Amo você e toda a tua família: **Paulão, Bi e Jú!**

Ao professor **Alan Peres Ferraz de Melo**, amigo, padrinho de casamento, chefe, pessoa por quem tenho um imenso carinho e admiração, que, além de mestre, foi meu orientador de iniciação científica da Fapesp durante a graduação, ajudando a desenvolver dentro de mim o amor que tenho pela pesquisa, hoje e sempre.

À **Fapesp** pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo geral	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Obtenção das amostras	13
4.2. Técnicas laboratoriais	13
4.2.1. Teste do antígeno acidificado tamponado	13
4.2.2. Teste do 2-mercaptoetanol	14
4.2.3. Teste de soroaglutinação lenta	14
4.2.4. Reação de fixação de complemento	16
4.2.5. Prova do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol	16
4.2.5.1. Antígeno	16
4.2.5.1.1. Solução diluente	16
4.2.5.1.2. Diluição do antígeno	17
4.2.5.2. Rivanol	17
4.2.5.3. Preparação da solução de rivanol	17
4.2.5.4. Tratamento do soro com solução de rivanol 1%	18
4.2.5.5. Teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol, com antígeno na concentração 8% e 4%	18
4.3. Análise dos dados	19
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES	47
8. REFERÊNCIAS	48
9. APÊNDICE	59

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Interpretação do teste do 2-mercaptoetanol para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas entre três e oito meses de idade.	15
2. Interpretação do teste do 2-mercaptoetanol para fêmeas não vacinadas e machos com idade superior a oito meses.	15
3. Interpretação de Kappa, segundo PEREIRA (2000), adaptado de Landis & Kock (1977).	19

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	21
2. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) em comparação com os títulos obtidos no teste do 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	22
3. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do 2-mercaptoetanol (2-Me) e do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	22
4. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) em comparação com os títulos obtidos no teste de soroaglutinação lenta (SAL) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	23
5. Comparação entre os resultados obtidos por meio dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e antígeno acidificado tamponado (AAT) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	23
6. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) em comparação com os títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	24
7. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	25
8. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com os títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	25
9. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	26

10.	Títulos obtidos no teste do 2-mercaptoetanol (2-Me) e na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	27
11.	Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do 2-mercaptoetanol (2-Me) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	27
12.	Títulos obtidos no teste de soroaglutinação lenta (SAL) e na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	28
13.	Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste de soroaglutinação lenta (SAL) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	29
14.	Títulos obtidos nos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	30
15.	Comparação entre os resultados obtidos por meio dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	30
16.	Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com os títulos obtidos no teste do 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	31
17.	Comparação entre os resultados obtidos por meio dos testes do 2-mercaptoetanol (2-Me) e antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	32
18.	Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com os títulos obtidos na prova de soroaglutinação lenta (SAL) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	33
19.	Comparação entre os resultados obtidos por meio dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	33

20.	Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) comparados com a interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	34
21.	Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da combinação dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-Me), desconsiderando os inconclusivos, para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	34
22.	Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com a combinação dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	35
23.	Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e da combinação dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) 2-mercaptoetanol (2-Me), desconsiderando os inconclusivos, para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	36
24.	Títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) comparados com a combinação dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	37
25.	Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e da combinação dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) 2-mercaptoetanol (2-Me), desconsiderando os inconclusivos, para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	37
26.	Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não-infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), soroaglutinação lenta (SAL) + 2-mercaptoetanol (2-Me) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.	38

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Uso das provas sorológicas para diagnóstico da brucelose bovina conforme prevê o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2006).	44
2. Proposta da inclusão da prova do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) no diagnóstico da brucelose bovina.	46

AVALIAÇÃO DO TESTE DO ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO EM SOROS TRATADOS COM RIVANOL COMO TESTE CONFIRMATÓRIO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA BRUCELOSE BOVINA

RESUMO - O trabalho teve por objetivo avaliar a prova do antígeno acidificado tamponado após tratamento dos soros com rivanol (AAT-RIV), como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose bovina. Foram selecionadas 1.061 amostras de soros bovinos, previamente analisadas pelos testes preconizados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose Tuberculose (PNCEBT): como teste de triagem, a prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), e como testes confirmatórios, a combinação das provas de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+2-Me), e a reação de fixação de complemento (RFC). O AAT-RIV foi realizado com o antígeno nas concentrações de 8% e 4% de volume celular, não tendo sido encontrada diferença nos resultados. Os dados foram analisados pelo indicador kappa e pelo χ^2 de McNemar, adotando-se com ponto-de-corte o título 25 no 2-Me e 4 na RFC. O AAT-RIV apresentou concordância regular (kappa = 0,53) com o AAT e boa com os testes confirmatórios (kappa: 2-Me = 0,67; SAL+2-Me = 0,66; RFC = 0,76). O χ^2 de McNemar apontou diferenças significativas entre os testes. A comparação entre os resultados do AAT-RIV e a condição verdadeira do animal, estabelecida pela combinação dos resultados das provas AAT, SAL+2-Me e RFC, resultou em uma sensibilidade relativa de 76,5%, com intervalo de confiança (95%) de 72,7% a 80,3%, e especificidade relativa de 100%. Conclui-se que o AAT-RIV poderia ser utilizado como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose bovina, sendo os animais com resultado positivo considerados infectados e aqueles com resultado negativo submetidos a um dos dois testes confirmatórios adotados pelo PNCEBT.

Palavras-chave: Brucelose, Concordância, Rivanol, Sorologia

EVALUATION OF ROSE BENGAL PLATE TEST IN SERUM TREATED WITH RIVANOL AS CONFIRMATORY TEST FOR THE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF BOVINE BRUCELLOSIS

SUMMARY – The purpose of the investigation was to evaluate the rose Bengal plate test in bovine serum after treatment with rivanol (RBPT-RIV) as a confirmatory test for brucellosis diagnosis. Serum samples from 1,061 bovine were analyzed by serological diagnostic techniques adopted by the Brazilian Program for Animal Brucellosis and Tuberculosis Control and Eradication: as screening test, the rose Bengal plate test (RBPT), and as confirmatory tests, the 2-mercaptoethanol plus standard tube agglutination test (STAT+2-Me), and the complement fixation test (CFT). RBPT-RIV was performed with 8% and 4% cellular concentration antigen, and there was no difference between the results. Data were analyzed by kappa statistic and McNemar χ^2 (2-Me cut-off = titer 25, and CFT cut-off = titer 4). RBPT-RIV showed a moderate agreement (kappa = 0,53) with RBPT, and substantial agreement with the confirmatory tests (kappa: 2-Me = 0,67; STAT+2-Me = 0,66; CFT = 0,76). The McNemar χ^2 showed significant difference among the tests. Comparing the RBPT-RIV results with the true condition of the animals, established by combining the results of RBPT, STAT+2-Me and CFT, the relative sensitivity was 76.5%, with a 95% confidence interval from 72,7% to 80.3%, and relative specificity of 100%. The results suggested that the RPBT-RIV is suitable to be used as a confirmatory test for brucellosis serological diagnosis; in this case, an animal testing positive should be classified as infected, and an animal testing negative should be tested by CFT or STAT+2-Me.

Key-Words: Agreement, Brucellosis, Rivanol, Serodiagnosis

1. INTRODUÇÃO

A brucelose bovina foi caracterizada no final do século XIX pelo veterinário dinamarquês Bernhardt Laurits Bang, o qual identificou, em 1896, o agente etiológico e conseguiu a reprodução experimental da enfermidade então conhecida como aborto epizootico bovino (SCHREIBER & MATHYS, 1987).

A brucelose é uma antropozoonose de evolução preferencialmente crônica e caráter granulomatoso difuso, caracterizada pela infecção das células do sistema mononuclear fagocitário, provocada por uma bactéria intracelular facultativa pertencente ao gênero *Brucella*, podendo ser dividida em dois grupos antigenicamente distintos: as lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) e as rugosas (*B. ovis* e *B. canis*). A *B. abortus* subdivide-se em sete biotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9) e a estirpe vacinal B19, a *B. melitensis* em três (1, 2 e 3), e a *B. suis* em cinco (1, 2, 3, 4 e 5). As rugosas, embora apresentem variantes, não se subdividem em biotipos (PAULIN & FERREIRA, 2003).

A espécie mais patogênica e invasora no homem é a *B. melitensis*, seguida de *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis*, embora a penúltima seja a mais freqüente causadora de infecções humanas no mundo (ACHA & SZYFRES, 2001). A *B. melitensis* não foi isolada no Brasil, sendo considerada exótica em nosso país (POESTER et al., 2002).

A espécie *Brucella abortus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIAL TAXONOMY, 1988) é o agente da brucelose bovina, e o biovar 1 é o mais difundido, ocorrendo praticamente no mundo todo (ACHA & SZYFRES, 2001). Embora o hospedeiro preferencial seja o bovino, a *B. abortus* pode infectar também outras espécies, como búfalos, camelos, cervídeos, cães, eqüinos, ovinos, suínos e o homem (STACK & MACMILLAN, 1999).

A brucelose bovina ocorre no mundo todo, mas alguns países obtiveram êxito em erradicá-la, como Alemanha, Áustria, Bélgica, Bulgária, países componentes da antiga Tchecoslováquia, Dinamarca, Finlândia, Hungria, Noruega, Holanda, Romênia, Suécia e Suíça. A maioria dos países europeus já está livre da enfermidade, assim como a grande maioria dos estados americanos.

No entanto a enfermidade ainda ocorre na maior parte da América Latina, especialmente em países com grandes rebanhos bovinos, como Argentina, Brasil e México (ACHA & SZYFRES, 2001).

As vacas constituem a categoria mais susceptível à brucelose, principalmente as vacas em gestação. Os touros também são susceptíveis, porém são mais resistentes que as fêmeas. Além da idade e do sexo, existe variação de susceptibilidade individual, pois existem animais que não são infectados mesmo em rebanhos com elevada taxa de prevalência (ACHA & SZYFRES, 2001).

Após a invasão corpórea, a bactéria localiza-se inicialmente em linfonodos regionais, e, após ganhar a circulação sanguínea, coloniza o útero, o úbere, as cápsulas articulares e as membranas sinoviais. Posteriormente, outros tecidos são infectados, como o baço e os linfonodos mamários e ilíacos. O aborto é o principal sinal clínico e ocorre, principalmente, nos últimos três meses de gestação. No entanto outros sintomas ocasionais podem se manifestar, incluindo orquite, epididimite, sinovite, retenção de placenta, metrite, nascimento de bezerros fracos e diminuição da produção de leite (RADOSTITS et al., 2002; DEL CAMPO et al., 1987; EAGLESOME & GARCIA, 1997).

Esta enfermidade é muito importante quando se trata de eficiência reprodutiva. Ela está freqüentemente associada ao aparelho reprodutor, e isso leva à idéia de que a doença seja transmitida por via venérea. No entanto há bastante tempo foram desenvolvidos experimentos demonstrando que a monta natural não desempenha papel importante na cadeia epidemiológica da brucelose bovina, como demonstrou THOMSEN (1943).

Em geral, as fêmeas abortam uma única vez, e a partir daí desenvolvem imunidade e se comportam como portadoras, excretando um grande número de bactérias junto com líquidos fetais, em abortos ou partos subseqüentes, contaminando as pastagens, que constituem o principal meio de transmissão da doença. Considera-se que cada grama dos materiais mencionados pode conter até dez bilhões de bactérias (BLASCO & GAMAZO, 1994).

A brucelose está relacionada com perdas econômicas. Estimativas sobre os custos representados pela brucelose mostram prejuízos de grande monta. Na

América Latina, há estimativas segundo as quais o prejuízo causado pela brucelose bovina situa-se ao redor de U\$ 600 milhões por ano (ACHA & SZYFRES, 2001).

Ao longo do século XX, os programas bem-sucedidos de controle e erradicação basearam-se na vacinação de fêmeas de três a oito meses de idade e na detecção dos animais infectados, por meio dos testes sorológicos, enaltecendo-se a importância de métodos de diagnóstico confiáveis e práticos, capazes de reduzir a ocorrência de resultados falso-negativos e falso-positivos (MATHIAS et al., 1995).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), adotado no Brasil em 2001, prevê que o diagnóstico da brucelose bovina e bubalina deve ser feito usando a prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) como teste de triagem. Os animais com resultado positivo nesse teste podem ser classificados como infectados ou então podem ser submetidos a um teste confirmatório, situação para a qual existem duas opções: a combinação das provas de soroaglutinação lenta e do 2-mercaptoetanol (SAL + 2-Me) ou então a reação de fixação de complemento (RFC). Ambas as opções para o teste confirmatório apresentam inconvenientes que dificultam sua realização, limitando o número de laboratórios envolvidos nesse diagnóstico, principalmente quando se leva em consideração o tamanho do rebanho brasileiro e, portanto, o grande número de animais a serem examinados. Diante disso, o trabalho em pauta se propôs a estudar o desempenho da prova do antígeno acidificado tamponado após tratamento dos soros com rivanol (AAT-RIV) como teste confirmatório para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. Deve-se salientar que tal tipo de estudo não é encontrado na literatura e que essa alternativa, na dependência de seu desempenho, poderia proporcionar uma opção rápida, barata e de fácil execução para a finalidade mencionada acima.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A brucelose é, indiscutivelmente, um dos principais problemas sanitários do rebanho bovino brasileiro. Em 2001, foi instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o PNCEBT, com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional (BRASIL, 2001).

O diagnóstico é parte essencial de um programa sanitário. A brucelose é diagnosticada por diferentes métodos que se complementam: o diagnóstico clínico baseia-se nos sinais; o epidemiológico, no histórico do rebanho da propriedade e das propriedades vizinhas; e o laboratorial, em exames complementares diretos e indiretos (PAULIN & FERREIRA, 2003).

Na brucelose animal, assim como em outras infecções, o isolamento do microorganismo é o método diagnóstico mais seguro, mas, em consequência das dificuldades deste procedimento e da sua limitação para o uso em grandes rebanhos, os métodos sorológicos são os mais utilizados (HUBER & NICOLETTI, 1986; NICOLETTI & TANYA, 1993; ABIMERHI et al., 1998; MEGID et al., 2000).

O sucesso de um programa de controle da brucelose depende muito da escolha dos testes que serão utilizados para o diagnóstico. Os critérios adotados para a escolha de tais testes são: custo, praticidade, repetibilidade, sensibilidade e especificidade, além da situação epidemiológica da doença (CHAPPEL, 1989).

A sensibilidade e a especificidade são dois importantes critérios para a escolha de testes de diagnóstico a serem usados em programas sanitários. A sensibilidade é a habilidade de um teste em identificar um animal infectado, e a especificidade é a habilidade para designar seguramente os animais não infectados pelo agente em questão (HUBER & NICOLETTI, 1986). O ideal seria utilizar um teste em que ambas as propriedades, sensibilidade e especificidade, fossem 100%. Na prática, isso raramente é possível, pois elas estão relacionadas de maneira inversa. A tentativa de melhorar a sensibilidade frequentemente resulta na piora de especificidade (PEREIRA, 2000).

Quando o enfoque é o rebanho, a triagem inicial deve ser barata, de fácil realização, rápida, altamente sensível e, até certo ponto, de baixa especificidade (NIELSEN, 2002). Vários testes sorológicos têm sido projetados para atender esses requisitos. A maioria desses testes é baseada na aglutinação de antígenos por anticorpos específicos presentes no sangue de animais infectados (BRICKER, 2002). Os testes de aglutinação mensuram a concentração de imunoglobulinas (Ig) séricas e são sensíveis a diferentes isotipos de anticorpos (MITTAL & TIZARD, 1983).

No início da década de 1960, visando obter um teste rápido e confiável, pesquisadores do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, com base nas observações de ROSE & ROEPKE (1957), de que a redução do pH do antígeno tornava o teste de soroaglutinação em placa mais específico, desenvolveram um teste usando antígeno de *Brucella abortus* corado com rosa de Bengala e tamponado com um pH 3,65. Esse teste, que utilizava componentes descartáveis e podia ser realizado usando soro ou plasma, obtido com fito-hemaglutininas e anticoagulantes, ficou conhecido como “brucellosis card test”. NICOLETTI (1967) avaliou o teste e relatou que todos os animais dos quais o agente etiológico havia sido isolado apresentaram reações positivas, embora reações falso-positivas tivessem sido observadas em animais vacinados com a amostra B19 de *B.abortus*. Além disso, NICOLETTI (1992) observou que o “card test” foi capaz de identificar todos os búfalos infectados de um rebanho, e SHANDU & JOSHI (1993) e FOSGATE et al. (2002) recomendaram o AAT como prova de triagem para o controle da brucelose em bovinos e bubalinos, devido à maior sensibilidade em comparação com outros testes.

A classe de imunoglobulinas envolvidas na reação a esse antígeno com pH ácido foi motivo de controvérsia. CORBEL (1972) concluiu que a aglutinação estava associada apenas a imunoglobulinas da subclasse IgG₁, e que a IgM não participava da reação. BEH (1973), embora confirmando a importância da IgG₁, observou também aglutinação associada com IgG₂ e IgM, o que está de acordo com as observações de LEVIEUX (1974), que também verificou que a IgM participa da reação. Contrariamente às constatações de CORBEL (1972) e de

BEH (1973), ALLAN et al. (1976) observaram que o teste AAT corado com rosa de Bengala detecta IgM de maneira mais eficiente do que detecta IgG₁ e IgG₂.

A prova do AAT consiste em uma soroaglutinação em placa, em que o antígeno, na concentração de 8% de volume celular, é tamponado em pH baixo (3,65) e corado com rosa de Bengala. Essa acidificação do antígeno reduz a atividade da IgM, tornando a prova seletiva para a identificação de IgG1 (ALTON et al., 1988). Entretanto o teste possui grande sensibilidade em animais vacinados com a vacina B19, podendo assim ocorrer reações falso-positivas (HUBER & NICOLETTI, 1986; NICOLETTI & TANYA, 1993; ABIMERHI et al., 1998; MEGID et al., 2000, FOSGATE et al., 2002). Também há relatos de resultados falso-negativos (MATHIAS & PINTO, 1983; SUTHERLAND, 1985; SHANDU & JOSHI, 1993; BERCOVICH, 1998; GUARINO et al., 2001; MOLNÁR et al., 2002), além do fenômeno prozona, relatado por NICOLETTI (1992).

Uma vez que diversos trabalhos confirmaram a confiabilidade desse teste (NICOLETTI, 1967; BRINLEY MORGAN et al., 1969; DAVIES, 1971), muitos programas oficiais de combate à brucelose bovina passaram a adotá-lo; tanto é que a maioria dos países desenvolvidos que conseguiram sucesso no combate à doença utilizaram o teste do AAT como método de triagem.

No Brasil, até pouco tempo, o uso do teste do AAT não era muito difundido, sendo mais comum o uso do teste de soroaglutinação em placa. Entretanto é importante considerar que não era rara a observação de animais infectados que não reagiam na prova de soroaglutinação em placa, ou então apresentam títulos insignificantes (ALTON et al., 1975; MATHIAS, 1996), não esquecendo de destacar os casos de resultados falso-positivos que esta prova apresentava (MATHIAS, 1996). Desse modo, o uso da prova de soroaglutinação em placa isoladamente, ou o uso dessa prova como teste de triagem, deixava que animais infectados continuassem no rebanho, dificultando a evolução de um programa de erradicação da doença.

Sendo assim, em 2001, com a criação PNCEBT, a prova do AAT foi preconizada como teste de triagem do rebanho (BRASIL, 2001; 2004).

Visto que a sensibilidade é crucial na triagem inicial, a ocorrência de algumas amostras falso-positivas deve ser tolerada, para que possa ser detectado todo o animal infectado (BRICKER, 2002). Assim, provas confirmatórias de maior especificidade devem ser realizadas, para evitar o sacrifício de animais não infectados, porém geralmente elas são mais caras e laboriosas (NIELSEN, 2002).

No Brasil, os testes confirmatórios oficiais adotados pelo PNCEBT são: a combinação das provas SAL + 2-Me e a RFC (BRASIL, 2001; 2004). Ambos os testes são trabalhosos e complexos, exigindo pessoal treinado e laboratórios bem equipados (DAJER et al., 1999).

A prova do 2-mercaptoetanol (2-Me) fundamenta-se na ação de certos compostos que contêm o radical tiol, que degrada a configuração em pentâmero da IgM, quebrando as pontes dissulfeto da IgM, reduzindo-a a unidades monoméricas, determinando assim a perda de sua atividade aglutinante, tornando o teste sujeito apenas às aglutinações estabelecidas pela classe IgG, que não sofre alteração na sua atividade, na presença desse reagente, aumentando a especificidade do teste (BERCOVICH, 1998).

Apesar de ser uma prova eficiente para bovinos (NICOLETTI, 1969; MARIÑO et al., 1991) e bubalinos (SHANDU & JOSHI, 1993; BERCOVICH, 1998; FOSGATE et al., 2002), NIELSEN (2002) indicou a possibilidade de ocorrência de falso-negativo na prova do 2-Me, em decorrência da presença de pontes dissulfeto também nas moléculas de IgG, e BERCOVICH (1998) alegou não ser uma prova adequada para a identificação de animais infectados recentemente.

Além do mais, a prova do 2-mercaptoetanol apresenta alguns inconvenientes, entre os quais podem ser mencionados o prolongado tempo de incubação, 48 horas, necessário para a obtenção do resultado; o fato de usar grandes volumes de reagentes, e portanto, a quantidade de reagentes necessária; o fato de ser bastante trabalhoso e, ainda, o fato de o 2-mercaptoetanol ser um agente cancerígeno, quando inalado, devendo ser usado somente em ambientes apropriados e bem ventilados (NIELSEN, 2002). Existem também certos cuidados com a substância 2-mercaptoetanol, que é extremamente sensível à luz e ao calor e se deteriora rapidamente por exposição ao ar, devendo ser conservada em

frasco âmbar hermeticamente fechado e em refrigeração (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1982).

Deve-se destacar que a prova do 2-Me, segundo o PNCEBT, deve ser realizada juntamente com a prova de SAL, o que significa o dobro de desvantagem, pois, da mesma forma que a prova do 2-Me, a prova de SAL requer o mesmo trabalho e grandes volumes de reagentes. Além disso, enquanto na prova do 2-Me os soros são tratados com o 2-Me, nesta prova os soros são tratados com fenol, substância também tóxica.

A RFC é o teste de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o trânsito internacional de animais (DAJER et al., 1999) e tem sido utilizada com sucesso em muitos países nos programas de controle e erradicação (NIELSEN, 2002). Na brucelose bovina, apesar dessa técnica detectar tanto IgG1 como IgM, o isotipo IgG1, principal imunoglobulina resultante da infecção por *B.abortus* em bovinos, é muito mais efetivo como fixador de complemento, e a IgM é parcialmente destruída durante o processo de inativação do complemento, tornando a prova mais específica (ALTON et al., 1988).

Estudos realizados em bovinos infectados, natural ou experimentalmente, indicaram que a RFC apresenta boa correlação com o isolamento do agente etiológico (HAYES & CHAPPEL, 1982; SUTHERLAND et al., 1982; CORNER et al., 1983), fato que embasou sua adoção como teste de referência para a avaliação de outros testes sorológicos (MATHIAS & PINTO, 1983; MATHIAS et al., 1995). Além da alta especificidade, a RFC sofre menor interferência dos anticorpos vacinais do que as provas do AAT e 2-Me (ALTON et al., 1975).

GUARINO et al. (2001), comparando a prova AAT e a RFC, obtiveram 88% de resultados concordantes, e KURODA et al. (2004) observaram 97,3%. Os valores de kappa entre AAT e RFC encontrados por DAJER et al. (1999) em bovinos e PAULIN (2006) em bubalinos foram inferiores aos relatados por MOLNÁR et al. (2002) e PINTO et al. (2005), ambos em bubalinos, sendo respectivamente 0,70, 0,69, 0,84 e 0,82.

Entretanto, no caso da RFC, também existem vários contratempos, apesar de ser um excelente teste confirmatório e preconizado pela OIE. Trata-se de teste

complexo, bastante trabalhoso e que exige pessoal treinado, além de exigir o uso de reagentes lábeis, com necessidade de renovação e, portanto, titulação frquente, o que aumenta o trabalho envolvido em sua realização. Além disso, pode ser influenciada pela presença de imunoglobulinas séricas que se ligam ao antígeno sem fixar complemento, mormente IgG₂ (BERCOVICH, 1998). Dessa forma, poucos laboratórios realizam esse teste, aumentando as chances de soros que percorrem longas distâncias chegarem aos laboratórios em más condições de conservação, o que, no caso desse teste, é especialmente problemático, em razão da ocorrência de atividade anticomplementar em soros mal conservados (DAJER et al., 1999). Outro ponto a ser analisado é que existe uma variação muito grande de técnicas utilizadas, não havendo uma padronização internacional (ALTON et al., 1975; ACHA & SZYFRES, 2001).

Na RFC, o excesso ou a predominância de IgG₂ pode induzir a ocorrência de fenômeno de prozona e reações falso-negativas. Não está muito claro quais são as causas desse fato, mas as sugeridas são: idade avançada do animal, exposição repetidas ao agente, condições ambientais levando a estresse e transferência ativa de IgG₁ para o colostro no período periparto (CHAPPEL, 1989). BRANDON et al. (1971) também se referem ao mecanismo fisiológico de transferência ativa de IgG₁ para o colostro nesse período, fazendo com que a concentração de IgG₁ circulante não seja suficiente para proporcionar a ocorrência de reação. Conforme afirmaram TIMONEY et al. (1988), a IgG₂ bloqueia competitivamente o acesso de IgG₁ ao antígeno, na RFC. Ainda que a IgG₂ não fixe complemento, reage normalmente com o antígeno, gerando prozona. O resultado é uma reação falso-negativa. Nesses casos, o 2-Me tem importante papel na análise final do sorodiagnóstico da amostra em estudo (PAULIN et al., 2002).

Ambos os teste confirmatórios aceitos pelo PNCEBT possuem suas vantagens e desvantagens, e existem muitos trabalhos comparando seus resultados. NICOLETTI (1969) verificou não haver diferença significativa entre os dois testes quanto à capacidade de proporcionar resultado positivo em bovinos comprovadamente infectados. MARIÑO et al. (1991) observaram que a prova do

2-Me apresentou resultados comparáveis aos apresentados pela RFC para diagnosticar a infecção em bovinos naturalmente infectados, e MYLREA & FRASER (1976) constataram correspondência entre os resultados do 2-Me e títulos a partir de 16 na RFC. PAULIN et al. (2002) e KURODA et al. (2004), em bovinos, e PINTO et al. (2005), em bubalinos, verificaram ótima concordância entre esses testes, com valores de kappa igual a 0,88, 0,96 e 0,86, e concordância de resultados igual a 94,6%, 97,8% e 93,3% respectivamente. No entanto CORRÊA DE SÁ (1989) concluiu que a RFC não deve ser substituída pelo 2-Me, apesar dessa última ser de mais fácil execução quando comparadas, pois não observou concordância adequada entre os resultados dos dois testes.

O teste do rivanol é uma prova suplementar já adotada em muitos países na luta contra a brucelose, como: Estados Unidos (HUBER & NICOLETTI, 1986; NICOLETTI & TANYA, 1993; NIELSEN, 2002; RANGAN, 2002), México (NERI et al., 1993; ABIMERHI et al., 1998; DAJER et al., 1999; LUNA-MARTÍNEZ & MEJÍA-TERÁN, 2002), países da América Central (MORENO, 2002), Venezuela (LORD & LORD, 1991), Equador (ZAMBRANO et al., 1991), Chile (ABALOS et al., 1996; TAMAYO et al., 1997), Argentina (NAVARRO et al., 1997), Portugal (SALES HENRIQUES et al., 1992), Espanha (JIMENÉZ DE BAGÜÉS et al., 1992) e países do Oriente Médio (RAFAI, 2002), entre outros.

A técnica do rivanol baseia-se em uma mistura de quantidades iguais de soro com uma solução de 1% de rivanol, o qual tem a propriedade de provocar a precipitação das moléculas de IgM. Essa mistura é centrifugada, e o sobrenadante é submetido à prova de soroaglutinação em placa. Nesse teste, a exemplo do que ocorre na prova do 2-Me, apenas a IgG reage, o que lhe confere maior especificidade (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1982; GARCÍA-CARRILLO, 1970).

O rivanol é uma prova diagnóstica confirmatória utilizada em bovinos, em geral com uma sensibilidade de 83% e uma especificidade de 93% (Reyes, 1996, citado por APARICIO et al., 2000). É simples, prático, rápido e de fácil realização (NIELSEN, 2002), usado como teste confirmatório para as amostras positivas ao teste do AAT, para evitar reações falso-positivas (NERI et al., 1993).

NICOLETTI (1992) relata em um de seus trabalhos realizados com búfalos que o teste do rivanol, quando comparado aos testes de AAT, SAL e RFC, demonstrou-se superior em especificidade.

Em um estudo sobre prevalência de brucelose bovina em três municípios de um estado mexicano, NERI et al. (1993) descrevem o uso da prova do AAT como teste de triagem, já que esse teste é extremamente sensível, e comentam também o uso do rivanol como teste confirmatório, devido a sua alta especificidade.

ABIMERHI et al. (1998) verificaram que o teste do rivanol apresentou sensibilidade relativa de 97,8%, especificidade de 100% e elevada concordância com a RFC ($Kappa = 0,96$), dando resultados comparáveis a outros estudos que indicam que a prova pode ser usada para diferenciar entre títulos de anticorpos por reação vacinal e infecção. Comentam também sobre os valores preditivos para o teste do rivanol (100% para os positivos e 99,7% para os negativos), que são altos e indicam que a prova poderia ser usada como teste confirmatório durante a fase de controle e também durante etapas iniciais da fase de erradicação da brucelose em um programa.

No entanto o programa de controle adotado no Brasil não prevê o uso dessa técnica, e, além do mais, no Brasil não é mais usada a prova de soroaglutinação em placa, o que dificulta o acesso ao antígeno para a realização da prova do rivanol da forma como é conhecida.

Apesar de o programa estar ainda em um estágio inicial de implantação, o tamanho do rebanho bovino brasileiro incentiva o controle da brucelose para o desenvolvimento econômico do país (POESTER et al., 2002). Além do mais, com o PNCEBT, novas estratégias contra esta enfermidade podem auxiliar muito no seu controle e futuramente na sua erradicação em nosso país.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar o desempenho da prova do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose bovina.

3.2. Objetivos específicos

- Comparar os resultados de todos os testes preconizados pelo PNCEBT (AAT, SAL, 2-Me e RFC) entre si e também seus resultados com os obtidos na prova do AAT-RIV;
- Avaliar a sensibilidade relativa da prova do AAT-RIV, quando aplicada a soros com resultado positivo na prova do AAT, na RFC e na combinação das provas SAL+2-Me;
- Avaliar a especificidade relativa da prova do AAT-RIV, quando aplicada a soros com resultado negativo na prova do AAT, na RFC e na combinação das provas SAL+2-Me;
- Comparar o desempenho da prova do AAT-RIV usando antígeno na concentração de 8% de volume celular e usando antígeno na concentração de 4% de volume celular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das amostras

Foram analisados soros sangüíneos de bovinos adultos, de diversas raças, ambos os sexos e de diferentes propriedades, encaminhados ao Laboratório de Diagnóstico de Brucelose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, *Campus* de Jaboticabal – SP, e também soros bovinos colhidos em frigoríficos do Estado de São Paulo, totalizando 1.061 amostras.

4.2. Técnicas laboratoriais

4.2.1. Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT)

Esse método, também conhecido como teste rosa de Bengala e ou “card test”, foi realizado conforme a técnica recomendada no Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2006).

O método consiste em colocar 0,03 mL do soro em contato com 0,03 mL do antígeno, em uma placa de vidro quadriculada, homogeneizar e manter a placa em movimentos rotatórios lentos e constantes até o momento da leitura, que é feita após quatro minutos de reação, observando, com ou auxílio de uma caixa com luz (ou aglutinoscópio), se há ocorrência dos grumos de aglutinação (resultado positivo) ou não (resultado negativo). O antígeno empregado nessa técnica é preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, corado com rosa de Bengala, na concentração de 8,0% de volume celular, pH 3,63.

4.2.2. Teste do 2-mercaptoetanol (2-Me)

Esta técnica foi realizada conforme a metodologia recomendada pelo Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2006).

Foi utilizado antígeno de célula total (antígeno para soroaglutinação lenta), preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, na concentração final de 0,045% de volume celular. Como diluente foi empregada solução salina 0,85%, com uma concentração final de 0,1 M de 2-mercaptoetanol. Os soros foram testados em diluições duplas a partir da diluição 1/25, trabalhando-se com volume final de 2 mL da mistura diluente-soro-antígeno. A leitura foi realizada após incubação por 48 horas a 37°C, observando-se a formação de grumos de aglutinação. O teste do 2-Me foi realizado simultaneamente ao teste de SAL.

4.2.3. Teste de soroaglutinação lenta (SAL)

Também chamada de teste de soroaglutinação em tubos (SAT), esta prova é utilizada em associação com o teste do 2-Me para confirmar resultados positivos na prova de triagem, esta técnica foi realizada conforme a metodologia recomendada pelo Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2006).

A técnica baseia-se no emprego de antígeno de célula total (antígeno para soroaglutinação lenta), preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, na concentração final de 0,045% de volume celular. Foi utilizada como diluente solução salina 0,85%, com uma concentração final de 0,5% de fenol. Os soros foram testados em diluições duplas a partir da diluição 1/25, trabalhando-se com volume final de 2 mL da mistura diluente-soro-antígeno. A leitura foi realizada após incubação por 48 horas a 37°C, observando-se a formação de grumos de aglutinação.

A interpretação dos resultados dessa prova é realizada juntamente com a prova do 2-Me, segundo ao quadros 1 e 2, considerando-se o grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições, devendo a reação ser classificada como: completa (+), incompleta (I) ou negativa (-), de acordo com o PNCEBT (BRASIL, 2004a).

Quadro 1. Interpretação do teste do 2-mercaptoetanol para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas entre três e oito meses de idade (BRASIL, 2004a).

SAL (UI/mL)	2-ME (UI/mL)	Interpretação
≤50	<25	Negativo
≥100	<25	Inconclusivo
≥25	≥25	Positivo

Sal: teste de soroaglutinação lenta

2-ME: teste do 2 mercaptoetanol

UI: Unidade internacional

Quadro 2. Interpretação do teste do 2-mercaptoetanol para fêmeas não vacinadas e machos com idade superior a oito meses (BRASIL, 2004a).

SAL (UI/mL)	2-ME (UI/mL)	Interpretação
≤25	<25	Negativo
≥50	<25	Inconclusivo
≥25	≥25	Positivo

Sal: teste de soroaglutinação lenta

2-ME: teste do 2 mercaptoetanol

UI: Unidade internacional

Devido ao fato de se desconhecer a condição vacinal dos animais avaliados, os resultados dos testes de SAL e 2-Me foram considerados de acordo com o quadro do PNCEBT (BRASIL, 2001) correspondente a animais não vacinados (QUADRO 2).

4.2.4. Reação de fixação de complemento

Foi empregada a microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação, recomendada por ALTON et al. (1988). Foi utilizado antígeno produzido com *Brucella abortus* amostra 1119/3, para a prova de soroaglutinação lenta em tubos. Como complemento foi utilizado soro de cobaia, titulado conforme a técnica descrita por ALTON et al. (1988). Foi empregado sistema hemolítico formado por hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina (anticorpo de coelho contra hemácea de ovino) titulada conforme a recomendação de ALTON et al. (1988).

4.2.5. Prova do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol

4.2.5.1. Antígeno

Foi utilizado antígeno comercial produzido com *Brucella abortus* amostra 1119/3, pelo Instituto Biológico de São Paulo, preparado de acordo com a técnica recomendada pelo Ministério da Agricultura, corado com rosa de Bengala (BRASIL, 2004b). O teste foi realizado com o antígeno na concentração, ou seja, 8,0% de volume celular, e também na concentração de 4%, uma vez que o soro, ao ser tratado pelo rivanol, é diluído na proporção de uma parte de soro por uma parte de rivanol.

4.2.5.1.1. Solução diluente

O tampão para a diluição do antígeno foi preparado com 100 mL de solução salina 0,85% com fenol 0,5%, 9 mL de ácido láctico ($H_6C_3O_3$) e 2 g de hidróxido de sódio. Na balança analítica, pesaram-se 2g de hidróxido de sódio. Em um béquer,

dissolveu-se o hidróxido de sódio em 50 mL de solução salina fenolada, e o ácido láctico foi adicionado em seguida. Realizou-se a homogeneização. Em um balão volumétrico, colocou-se a solução, e o volume foi completado até 100 mL com solução salina fenolada. O pH foi checado, 3,65, com uma margem de erro inferior a 5%. O produto foi armazenado em vidraria tampada e sob refrigeração.

4.2.5.1.2. Diluição do antígeno

Para a obtenção do antígeno na concentração de 4% de volume celular, o antígeno padrão foi diluído, em partes iguais, em solução diluente pH 3,65.

4.2.5.2. Rivanol

O rivanol recebe vários nomes químicos, entre eles: 6,9-diamino-2-ethoxyacridine lactate. Sua apresentação é em pó de coloração amarelado-fosforescente, com validade de 5 anos após a data de sua fabricação, podendo ser armazenado em temperatura ambiente.

4.2.5.3. Preparação da solução de rivanol

Foi realizada de acordo com a descrição do CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (1982).

Para a preparação de 100mL de solução foram utilizados: 1 g de rivanol e 100 mL de água destilada. O rivanol foi pesado em balança analítica. Em um béquer, colocou-se 1g do produto com 50 mL de água destilada. Promoveu-se a homogeneização da solução durante 1 hora no agitador de barra magnética. Em um balão volumétrico de 100 mL, colocou-se a solução homogeneizada e completou-se o volume com água destilada. O produto diluído foi armazenado em

recipiente de vidro âmbar com tampa, envolto em papel alumínio e protegido contra luminosidade e sob refrigeração.

4.2.5.4. Tratamento do soro com solução de rivanol 1%

As amostras de soro, os antígenos e a solução de rivanol estiveram à temperatura ambiente pelo menos por uma hora antes da realização da prova. Em um tubo de centrifuga, colocavam-se 200 µL da amostra de soro juntamente com 200 µL da solução de rivanol 1%. Agitava-se o tubo para promover a homogeneização e deixava-se em descanso à temperatura ambiente por 10 minutos a 1 hora. A centrifugação da mistura era realizada a 1.000 G durante 5 a 10 minutos.

4.2.5.5. Teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol, com antígeno na concentração 8% e 4%

Colocavam-se 30 µL do sobrenadante (soro tratado com rivanol e centrifugado) em contato com 30 µL do antígeno na concentração celular de 8%, em uma placa de vidro quadriculada. Realizava-se a homogeneização e mantinha-se a placa em movimentos rotatórios lentos e constantes até o momento da leitura, após quatro minutos de reação, observando, em uma caixa com luz (aglutinoscópio), a ocorrência de grumos de aglutinação (resultado positivo) ou não (resultado negativo). O mesmo procedimento foi realizado com o antígeno diluído na concentração de 4% de volume celular.

4.3. Análise dos dados

Para a comparação entre os resultados das diversas provas, foi usado o teste de X^2 de McNemar (JEKEL et al., 1999) e foi calculado o coeficiente Kappa, o qual foi interpretado de acordo com os critérios adotados por PEREIRA (2000), apresentados no quadro 3.

Na obtenção da sensibilidade e da especificidade relativas do teste do antígeno acidificado tamponado após tratamento do soro com rivanol, utilizou-se a combinação dos resultados da prova padrão do antígeno acidificado tamponado, da reação de fixação de complemento e da combinação da prova do 2-mercaptoetanol com a prova de soroaglutinação lenta para determinar a condição verdadeira dos animais cujas amostras foram testadas. Conforme as recomendações de MARTIN et al. (1987), os animais com resultado positivo nos três testes que serviram de parâmetro foram considerados infectados, aqueles com resultado negativo nos três testes foram considerados não infectados e aqueles com resultados divergentes entre os três testes padrões foram desconsiderados. O intervalo de confiança da sensibilidade foi calculado de acordo com a metodologia mencionada por THORNER & REMAIN (1961).

Quadro 3. Interpretação de Kappa, segundo PEREIRA (2000), adaptado de Landis & Kock (1977).

Kappa	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

5. RESULTADOS

As tabelas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 demonstram os resultados obtidos nos diferentes testes, independentemente da interpretação de positividade adotada para cada prova, sendo considerada a presença ou ausência de aglutinação nos testes AAT e AAT-RIV, e a titulação nos testes 2-Me, SAL e RFC. Nas tabelas 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 e 25 foram registradas as comparações entre os resultados obtidos após a classificação em positivo e negativo, permitindo calcular a concordância entre os testes por meio do coeficiente kappa, além de verificar se houve independência entre os resultados, pelo teste de qui-quadrado de McNemar.

O objetivo principal foi avaliar a prova do AAT-RIV, como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose bovina. Após o tratamento com rivanol, os soros foram novamente submetidos ao teste do AATT, avaliando-se o teste com o antígeno na concentração de 8% de volume celular e na concentração de 4% de volume celular. Os resultados seriam comparados entre si e também com aqueles obtidos na prova no AAT, na RFC e na combinação das provas SAL+2-Me, determinando-se a sensibilidade e a especificidade relativas do teste que está sendo avaliado. No entanto observou-se que não houve diferença nos resultados quando utilizado antígeno na concentração de 8% ou 4% de volume celular; sendo assim, a técnica do AAT-RIV foi avaliada de uma única forma, em comparação com os resultados das outras técnicas (AAT, SAL+2-Me e RFC).

Dos 1.061 soros sanguíneos analisados, 644 (60,7%) apresentaram resultado positivo no AAT e 417 (39,3%) apresentaram resultado negativo, ao passo que 375 (35,3%) apresentaram resultado positivo no AAT-RIV e 686 (64,7%) apresentaram resultado negativo. Das 644 amostras positivas no AAT, 375 (58,2%) também apresentaram resultado positivo no AAT-RIV, e 269 (41,8%) apresentaram resultado negativo. Já as 417 amostras negativas no AAT foram todas negativas também no AAT-RIV (Tabela 1). Nessa situação, observou-se uma concordância regular, pois se obteve um valor de kappa igual a 0,53. Pelo

teste de qui-quadrado de McNemar ($\chi^2 = 267$), a diferença entre os dois testes mostrou-se significativa ($p < 0,01$).

Tabela 1. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT-RIV	AAT		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	375	0	375
Negativo	269	417	686
TOTAL	644	417	1.061

$K = 0,53$ $\chi^2 = 267,0$

Quando comparados os resultados do AAT com os do 2-Me, observa-se que, dos 644 soros positivos no AAT, 527 (81,8%) apresentaram título a partir de 25 no 2-ME, e 117 (18,2%) apresentaram no máximo aglutinação incompleta na diluição 1:25. Dos 417 soros negativos no AAT, 16 (3,8%) apresentaram título a partir de 25, atingindo o máximo de 50, no 2-Me (Tabelas 2 e 3). A comparação entre os dois testes, considerando o 2-Me positivo a partir do título 25, mostra uma concordância boa, já que o resultado do kappa foi 0,74 (Tabela 3). A diferença entre os resultados dos testes foi significativa, segundo o teste de McNemar, com χ^2 igual a 75,2 ($p < 0,01$).

Tabela 2. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) em comparação com os títulos obtidos no teste do 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT	2-Me											TOTAL
	-	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200	400 I	≥ 400	
N	390	11	14	1	1	0	0	0	0	0	0	417
P	97	20	89	26	57	26	60	7	47	9	206	644
TOTAL	487	31	103	27	58	26	60	7	47	9	206	1.061

- = ausência de reação
I = aglutinação incompleta

Tabela 3. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do 2-mercaptoetanol (2-Me) e do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

2-Me	AAT		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo (≥ 25)	527	16	543
Negativo	117	401	518
TOTAL	644	417	1.061

K = 0,74 $\chi^2 = 75,2$

Dos 644 soros positivos no AAT, 36 (5,6%) não apresentaram título no teste de SAL, e os demais apresentaram títulos variando de 25 incompleto até igual ou superior a 400. Das 417 amostras com resultado negativo no AAT, 252 (60,4%) não apresentaram título na soroaglutinação lenta, e 165 (39,6%) apresentaram título de até 200 (Tabela 4). Adotando-se como ponto-de-corte a diluição 1:100 no teste de SAL, observou-se uma concordância regular entre esse

teste e o AAT (Tabela 5), com kappa igual a 0,55. A diferença entre as duas provas foi significativa, pois o teste de qui-quadrado de McNemar revelou um valor de 233,3 ($p < 0,01$).

Tabela 4. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) em comparação com os títulos obtidos no teste de soroaglutinação lenta (SAL) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT	SAL											TOTAL
	-	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200	400 I	≥ 400	
N	252	35	75	24	23	4	2	1	1	0	0	417
P	36	4	52	31	95	29	76	22	63	8	228	644
TOTAL	288	39	127	55	118	33	78	23	64	8	228	1.061

- = ausência de reação
I = aglutinação incompleta

Tabela 5. Comparação entre os resultados obtidos por meio dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e antígeno acidificado tamponado (AAT) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

SAL	AAT		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo (≥ 100)	397	4	401
Negativo	247	413	660
TOTAL	644	417	1.061

K = 0,55 $\chi^2 = 233,3$

Das 644 amostras com resultado positivo no AAT, 101 (15,7%) não apresentaram título na RFC, 49 (7,6%) reagiram na diluição 1:2, e as demais (76,7%) apresentaram reação a partir da diluição 1:4, amostras essas classificadas como positivas nesse teste. Pôde-se observar também que, das 417 amostras com resultado negativo no AAT, 2 (0,5%) apresentaram resultado positivo na RFC, com título 4, 30 (7,2%) apresentaram título 2, e as outras 385 (92,3%) não expressaram título nenhum nessa prova (Tabela 6). A comparação entre os testes AAT e RFC (Tabela 7) resultou em uma concordância boa, com um indicador kappa igual a 0,73. A diferença entre os resultados dos dois testes foi significativa pelo teste de McNemar, com χ^2 igual a 142,2 ($p > 0,01$).

Tabela 6. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) em comparação com os títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT	RFC								TOTAL
	-	2	4	8	16	32	64	≥128	
Negativo	385	30	2	0	0	0	0	0	417
Positivo	101	49	52	66	62	47	62	205	644
TOTAL	486	79	54	66	62	47	62	205	1.061

- = ausência de reação

Tabela 7. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT	RFC		TOTAL
	Positivo($\geq 1/4$)	Negativo	
Positivo	494	150	644
Negativo	2	415	417
TOTAL	496	565	1.061

$K = 0,73$ $\chi^2 = 142,2$

Observando-se a tabela 8, nota-se que, dos 375 soros positivos no AAT-RIV, 3 (0,8%) não apresentaram título na RFC, ao passo que os outros 372 (99,2%) apresentaram título a partir de 4 na RFC. Dos 686 soros negativos no AAT-RIV, 483 (70,4%) não apresentaram título na RFC, 79 (11,5%) apresentaram título 2, e os demais (18,1%) apresentaram títulos variando de 4 a 64.

Quando as provas de RFC e AAT-RIV foram comparadas (Tabela 9), encontrou-se um valor de kappa igual a 0,76, caracterizando uma concordância boa entre os dois testes. Em relação ao método de McNemar, o resultado foi 113,4, expressando uma diferença significativa entre esses resultados ($p < 0,01$).

Tabela 8. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com os títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT- RIV	RFC								TOTAL
	-	2	4	8	16	32	64	≥ 128	
Negativo	483	79	52	50	13	6	3	0	686
Positivo	3	0	2	16	49	41	59	205	375
TOTAL	486	79	54	66	62	47	62	205	1.061

- = ausência de reação

Tabela 9. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT- RIV	RFC ($\geq 1/4$)		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	372	3	375
Negativo	124	562	686
TOTAL	496	565	1.061

K = 0,76 $\chi^2 = 113,4$

Quando comparados os testes 2-Me e RFC, observou-se que 439 amostras (41,4%) não apresentaram reação em nenhuma das duas provas. Nota-se também que, de 486 amostras sem reação na RFC, 34 (7,0%) apresentaram aglutinação no 2-Me, da diluição 1:25 até igual ou superior a 1:400, e das 79 amostras com título 2 na RFC, 27 (34,2%) apresentaram título no 2-Me variando de 25 a 50. Da mesma forma, das 487 amostras que não apresentaram título no 2-Me, 9 (1,8%) apresentaram título na RFC, títulos esses que variam de 4 a igual ou superior a 128, e das 31 amostras com aglutinação incompleta na diluição 1:25, 5 (16,1%) apresentaram título 4 ou 8 na RFC (Tabela 10).

Das 1.061 amostras testadas, 482 (45,4%) apresentaram resultado positivo nos dois testes e 504 (47,5%) apresentaram resultado negativo em ambos, quando se adotou como ponto de corte o título 4 na prova de RFC e o título de 25 no 2-Me. No entanto 14 (2,8%) dos 496 soros positivos na RFC apresentaram resultado negativo no 2-Me, e 61 (11,2%) dos 543 soros positivos no 2-Me apresentaram resultado negativo na RFC. Isso resulta em 92,9% de resultados concordantes e kappa 0,86, caracterizando concordância ótima entre os dois testes (Tabela 11). A diferença entre esses resultados foi significativa pelo teste de McNemar, com χ^2 igual a 28,2 ($p < 0,01$).

Tabela 10. Títulos obtidos no teste do 2-mercaptoetanol (2-Me) e na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

2-Me	RFC								TOTAL
	-	2	4	8	16	32	64	≥128	
-	439	39	3	3	0	0	2	1	487
25 I	13	13	4	1	0	0	0	0	31
25	23	22	32	21	2	2	0	1	103
50 I	6	2	8	8	1	1	1	0	27
50	2	3	5	20	20	4	2	2	58
100 I	0	0	1	7	12	1	3	2	26
100	0	0	1	6	18	21	9	5	60
200 I	1	0	0	0	1	3	2	0	7
200	0	0	0	0	3	13	25	6	47
400 I	0	0	0	0	0	0	3	6	9
≥ 400	2	0	0	0	5	2	15	182	206
TOTAL	486	79	54	66	62	47	62	205	1.061

- = ausência de reação
I = aglutinação incompleta

Tabela 11. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do 2-mercaptoetanol (2-Me) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

2-Me	RFC		TOTAL
	Positivo (≥ 1/4)	Negativo	
Positivo (≥ 25)	482	61	543
Negativo	14	504	518
TOTAL	496	565	1.061

K = 0,86 $\chi^2 = 28,2$

Comparando-se os resultados obtidos nas provas de SAL e RFC, verificou-se que, quando adotado como ponto de corte o título 4 na prova de RFC e o título 100 na SAL, 21 (3,7%) dos 565 soros negativos na RFC foram positivos na SAL, com títulos variando de 100 a ≥ 400 , e dos 660 soros negativos na SAL, 116 (17,6%) apresentaram resultado positivo na RFC (Tabelas 12 e 13). Nessa situação, observou-se uma concordância boa, pois o valor de kappa foi igual a 0,74. Pelo método do χ^2 de McNemar, a diferença entre os testes mostrou-se significativa, pois χ^2 foi igual a 64,5 ($p < 0,01$).

Tabela 12. Títulos obtidos no teste de soroprecipitação lenta (SAL) e na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

SAL	RFC								TOTAL
	-	2	4	8	16	32	64	≥ 128	
-	277	10	1	0	0	0	0	0	288
25 I	36	3	0	0	0	0	0	0	39
25	74	30	11	10	0	0	1	1	127
50 I	32	9	9	5	0	0	0	0	55
50	42	20	22	20	8	3	2	1	118
100 I	9	2	5	7	6	2	1	1	33
100	9	5	6	19	28	6	4	1	78
200 I	2	0	0	2	5	7	3	4	23
200	2	0	0	3	9	23	20	7	64
400 I	0	0	0	0	1	1	6	0	8
≥ 400	3	0	0	0	5	5	25	190	228
TOTAL	486	79	54	66	62	47	62	205	1.061

- = ausência de reação

I = aglutinação incompleta

Tabela 13. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste de soroaglutinação lenta (SAL) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

SAL	RFC		TOTAL
	Positivo (≥ 4)	Negativo	
Positivo (≥ 100)	380	21	401
Negativo	116	544	660
TOTAL	496	565	1.061
K = 0,74 $\chi^2 = 64,5$			

Na tabela 14, nota-se que, quando comparadas as provas SAL e 2-Me, 607 (57,2%) das 1.061 amostras apresentaram exatamente o mesmo título em ambas as provas, e as outras 454 (42,8%) amostras tiveram o título reduzido pela ação do 2-Me. Adotando-se como ponto de corte o título 100 na SAL e o título 25 no teste 2-Me (Tabela 15), constata-se uma concordância boa, já que o resultado de kappa foi igual a 0,69. A diferença entre esses resultados foi significativa pelo teste de McNamer, com χ^2 igual a 121,2 ($p < 0,01$).

Tabela 14. Títulos obtidos nos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

2-Me	SAL											
	-	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200	400 I	≥ 400	TOTAL
-	288	36	87	22	37	8	6	1	2	0	0	487
25 I	0	3	10	10	4	2	1	1	0	0	0	31
25	0	0	30	20	42	6	5	0	0	0	0	103
50 I	0	0	0	3	16	6	2	0	0	0	0	27
50	0	0	0	0	19	8	30	0	1	0	0	58
100 I	0	0	0	0	0	3	15	3	4	0	1	26
100	0	0	0	0	0	0	19	15	24	1	1	60
200 I	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	2	7
200	0	0	0	0	0	0	0	0	32	5	10	47
400 I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	9
≥ 400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	206	206
TOTAL	288	39	127	55	118	33	78	23	64	8	228	1.061

- = ausência de reação
I = aglutinação incompleta

Tabela 15. Comparação entre os resultados obtidos por meio dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

2-Me	SAL		TOTAL
	Positivo (≥ 100)	Negativo	
Positivo (≥ 25)	390	153	543
Negativo	11	507	518
TOTAL	401	660	1.061

K = 0,69 $\chi^2 = 121,2$

Quando comparados os resultados do AAT-RIV com os do 2-Me, verificou-se que, dos 543 soros com resultado positivo no 2-Me, 371 (68,3%) apresentaram também resultado positivo no AAT-RIV e 172 (31,7%) apresentaram resultado negativo. Das 518 amostras negativas no 2-Me, 4 (0,8%) apresentaram resultado positivo no AAT-RIV e 514 (99,2%) apresentaram resultado negativo. Das 686 amostras negativas no AAT-RIV, 172 (25,1%) apresentaram resultado positivo no 2-Me, com títulos que variaram de 25 a 200 (Tabela 16 e 17). Adotando-se como ponto de corte o título 25 no 2-Me, constata-se a ocorrência de 371 amostras com resultado positivo em ambos os testes e 514 amostras com resultado negativo em ambos, o que significa uma proporção de 83,4% de resultados concordantes, resultando em kappa igual a 0,67, ou seja, concordância boa entre os dois testes (Tabela 17), e em relação ao χ^2 de McNemar, igual a 158,5, a diferença foi significativa ($p < 0,01$).

Tabela 16. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com os títulos obtidos no teste do 2- mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT- RIV	2-Me											TOTAL
	-	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200	400 I	≥ 400	
N	483	31	101	26	34	5	5	0	1	0	0	686
P	4	0	2	1	24	21	55	7	46	9	206	375
TOTAL	487	31	103	27	58	26	60	7	47	9	206	1.061

- = ausência de reação

I = aglutinação incompleta

Tabela 17. Comparação entre os resultados obtidos por meio dos testes do 2-mercaptoetanol (2-Me) e antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

2-Me	AAT-RIV		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo (≥ 25)	371	172	543
Negativo	4	514	518
TOTAL	375	686	1.061
K = 0,67 $\chi^2 = 158,5$			

Observando a tabela 18, pode ser verificado que, das 375 amostras positivas no AAT-RIV, 2 (0,5%) apresentaram título 25 na SAL, 7 (1,9%) apresentaram título 50, 12 (3,2%) apresentaram título 100 I e 354 (94,4%) apresentaram título igual ou superior a 100. Entre as 686 amostras negativas no AAT-RIV, 288 (42,0%) não apresentaram título na SAL e as demais apresentaram títulos que chegaram até 200. A concordância entre esses dois testes, adotando-se a diluição 1:100 como ponto-de-corte da SAL, foi considerada ótima, já que o resultado de kappa foi igual a 0,87. A diferença foi significativa ($p < 0,01$), pois o valor do χ^2 de McNemar igual a 9,2 (Tabela 19).

Tabela 18. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com os títulos obtidos na prova de soroaglutinação lenta (SAL) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT- RIV	SAL											TOTAL
	-	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200	400 I	≥ 400	
N	288	39	125	55	111	21	37	4	6	0	0	686
P	0	0	2	0	7	12	41	19	58	8	228	375
TOTAL	288	39	127	55	118	33	78	23	64	8	228	1.061

- = ausência de reação

Tabela 19. Comparação entre os resultados obtidos por meio dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

SAL	AAT-RIV		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo (≥ 100)	354	47	401
Negativo	21	639	660
TOTAL	375	686	1.061

K = 0,86 $\chi^2 = 9,2$

A tabela 20 ilustra os resultados obtidos pela prova do AAT (negativos ou positivos) e pela combinação das provas SAL+2-Me, conforme prevê a legislação brasileira (negativos, inconclusivos e positivos). Das 644 amostras positivas no AAT, 79 (12,3%) foram negativas na combinação SAL+2-Me, 37 (5,7%) foram inconclusivas e 528 (82,0%) tiveram o resultado positivo confirmado. Quanto às 417 amostras negativas no AAT, 376 (90,2%) também foram negativas na

combinação SAL+2-Me, 24 (5,8%) foram inconclusivas, mas 17 (4,1%) apresentaram resultado positivo. Desconsiderando as 61 amostras com resultado inconclusivo na combinação SAL+2-Me (Tabela 21), observa-se uma concordância boa, pois o valor de kappa foi igual a 0,80. Pelo teste de χ^2 de McNemar, o resultado foi igual a 38,8, demonstrando uma diferença significativa entre os testes ($p < 0,01$).

Tabela 20. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) comparados com a interpretação da combinação dos resultados dos testes de soraglutinação lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT	SAL+2-Me			TOTAL
	Negativo	Inconclusivo	Positivo	
Negativo	376	24	17	417
Positivo	79	37	528	644
TOTAL	455	61	545	1.061

Tabela 21. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da combinação dos testes de soraglutinação lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-Me), desconsiderando os inconclusivos, para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT	SAL+2-Me		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	528	79	607
Negativo	17	376	393
TOTAL	545	455	1.000

$K = 0,80$ $\chi^2 = 38,8$

Na tabela 22, podem ser observados os valores obtidos pela prova do AAT-RIV e pela combinação das provas SAL+2-Me. Das 545 amostras com resultado positivo na combinação, 371 (68,1%) também apresentaram resultado positivo no AAT-RIV e 174 (31,9%) apresentaram resultado negativo. Das 61 amostras que apresentaram resultado inconclusivo na combinação SAL+2-Me, 58 (95,1%) apresentaram resultado negativo no AAT-RIV e 3 (4,9%) apresentaram resultado positivo. Das 455 amostras com resultado negativo na combinação, apenas 1 (0,2%) apresentou resultado positivo no AAT-RIV, e 454 (99,8%) apresentaram resultado negativo.

A tabela 23 apresenta a comparação dos resultados obtidos pelo testes do AAT-RIV e SAL+2-Me, excluindo os resultados inconclusivos. Observa-se que 371 amostras apresentaram resultado positivo em ambas as provas e 454 apresentaram resultado negativo nas duas provas, o que significa uma proporção de 82,5% de resultados concordantes, resultando em kappa igual a 0,66, ou seja, concordância boa. A diferença entre esses resultados foi significativa pelo teste de McNemar, com χ^2 igual a 169,1 ($p < 0,01$).

Tabela 22. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com a combinação dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT-RIV	SAL+2-Me			TOTAL
	Negativo	Inconclusivo	Positivo	
Negativo	454	58	174	686
Positivo	1	3	371	375
TOTAL	455	61	545	1.061

Tabela 23. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e da combinação dos testes de soroaglutinação lenta (SAL) 2-mercaptoetanol (2-Me), desconsiderando os inconclusivos, para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT-RIV	SAL+2-Me		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	371	1	372
Negativo	174	454	628
TOTAL	545	455	1.000

$K = 0,66$ $\chi^2 = 169,1$

Quando comparados os resultados da RFC com os da combinação dos testes SAL+2-Me (Tabelas 24 e 25), observa-se que, dos 455 soros com resultado negativo na combinação, 448 (98,5%) apresentaram resultado negativo na RFC e 7 (1,5%) apresentaram título a partir de 4, devendo-se destacar a ocorrência de um soro com título 64 nesta prova e resultado negativo na combinação SAL+2-Me. Das 61 amostras com resultado inconclusivo na combinação, 55 (90,2%) apresentaram resultado negativo na RFC e 6 (9,8%) apresentaram resultado positivo, sendo um deles com título 64 e um com título igual ou superior a 128. Excluindo as amostras com resultado inconclusivo, verifica-se que, das 490 amostras positivas na RFC, 483 (98,6%) foram também positivas na combinação SAL+2-Me e 7 (1,4%) foram negativas. Das 510 amostras negativas na RFC, 448 (87,8%) foram negativas também na combinação e 62 (12,2%) foram positivas. A proporção de resultados concordantes entre esses dois recursos de diagnóstico confirmatório foi de 93,1%, resultando em kappa igual a 0,86, ou seja, concordância ótima. . A diferença entre os resultados das provas foi significativa, com um valor de χ^2 igual a 42,3 ($p < 0,01$).

Tabela 24. Títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) comparados com a combinação dos testes de soroprecipitação lenta (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-Me) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

RFC	SAL+2-Me			TOTAL
	Negativo	Inconclusivo	Positivo	
-	406	45	35	486
2	42	10	27	79
4	5	2	47	54
8	1	2	63	66
16	0	0	62	62
32	0	0	47	47
64	1	1	61	63
≥128	0	1	203	204
TOTAL	455	61	545	1.061

- = ausência de reação

Tabela 25. Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e da combinação dos testes de soroprecipitação lenta (SAL) 2-mercaptoetanol (2-Me), desconsiderando os inconclusivos, para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

RFC	SAL + 2-Me		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	483	7	490
Negativo	62	448	510
TOTAL	545	455	1.000

$K = 0,86$ $\chi^2 = 42,3$

Na tabela 26, encontra-se a comparação entre os resultados obtidos pelo AAT-RIV e a condição verdadeira do animal, estabelecida pela combinação dos resultados das provas AAT, SAL+2-Me e RFC. Observa-se que, entre os 857 soros, o AAT-RIV apresentou 744 (86,8%) resultados coerentes com a condição verdadeira. Dos 481 animais classificados como infectados, 368 apresentaram resultado positivo no AAT-RIV, o que significa uma sensibilidade relativa de 76,5%, com intervalo de confiança variando de 72,7% a 80,3%, com 95% de probabilidade. Todos os animais classificados como livres da infecção apresentaram resultado negativo no AAT-RIV, o que indica uma especificidade relativa de 100%. Uma vez que todos os animais com resultados positivos no AAT-RIV foram classificados como infectados, o valor preditivo positivo do teste foi de 100%, ao passo que o valor preditivo negativo foi de 76,9%, ou seja, das 489 amostras com resultado negativo no AAT-RIV, 376 foram classificadas como não infectadas.

Tabela 26. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não-infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), soroaglutinação lenta (SAL) + 2-mercaptoetanol (2-Me) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos.

AAT-RIV	AAT / SAL + 2-Me / RFC		TOTAL
	Infectado	Não-infectado	
Positivo	368	0	368
Negativo	113	376	489
TOTAL	481	376	857

Sensibilidade relativa = $(368 / 481) \times 100 = 76,5\%$

Especificidade relativa = $(376 / 376) \times 100 \% = 100,0\%$

Intervalo de confiança (95%) = {72,7% — 80,3%}

6. DISCUSSÃO

Os testes sorológicos constituem a base do diagnóstico em um programa sanitário para controle ou erradicação da brucelose animal, por proporcionarem uma alternativa que viabiliza o teste de um grande número de amostras. No entanto deve ser considerado que o diagnóstico sorológico está sujeito a erros, tanto pela ocorrência de resultados falso-positivos quanto pela ocorrência de resultados falso-negativos. O recurso adotado pelo PNCEBT, para o diagnóstico da brucelose em bovinos e bubalinos, foi a utilização de testes sorológicos em série, usando o teste do AAT na triagem, sendo a confirmação dos resultados positivos realizada pela combinação dos testes SAL+2-Me ou então pela RFC (BRASIL, 2001; 2004). Esse procedimento tem o propósito de melhorar a especificidade do diagnóstico, de modo a minimizar a ocorrência de resultados falso-positivos, o que acarretaria o sacrifício desnecessário de um grande número de animais.

A comparação, no presente estudo, entre os testes adotados pelo PNCEBT mostrou uma concordância boa entre o teste de triagem e os testes confirmatórios. Essa comparação apontou um coeficiente kappa de 0,73, 0,74 e 0,80, quando o AAT foi comparado, respectivamente, com a RFC, o 2-Me e a combinação SAL+2-Me (tabelas 7, 3 e 21). Esta, como se pode observar, apresentou a melhor concordância com o teste de triagem. Concordâncias mais elevadas que esta entre o AAT e o 2-Me foram observadas em bovinos por MEGID et al. (2000), kappa = 0,84, e por KURODA et al. (2004), kappa = 0,94, e em bubalinos, por PINTO et al. (2005), kappa = 0,92.

Os valores de kappa entre AAT e RFC encontrados por DAJER et al. (1999) em bovinos e PAULIN (2006) em bubalinos foram inferiores aos relatados no presente trabalho (kappa = 0,73), sendo respectivamente 0,70 e 0,69; já os valores citados por MOLNÁR et al. (2002) e PINTO et al. (2005), ambos em bubalinos, foram superiores, respectivamente 0,84 e 0,82. GUARINO et al. (2001), comparando o teste rosa de Bengala, similar ao AAT, com a RFC, obtiveram 88% de resultados concordantes, e KURODA et al. (2004) observaram

97,3%, ao passo que no presente trabalho essa proporção foi de 85,7%. Entretanto devem-se destacar algumas ocorrências de resultado positivo no teste confirmatório em soros com resultado negativo no teste de triagem (tabelas 2, 6 e 20), o que mostra a possibilidade de resultado falso-negativo no procedimento adotado pelo PNCEBT. Resultados negativos no AAT e positivos em provas confirmatórias também já foram relatados em outros trabalhos (MATHIAS & PINTO, 1983; SUTHERLAND, 1985; BERCOVICH, 1998; GUARINO et al., 2001), mas essa não é a situação desejada, pois um teste de triagem deve primar pela elevada sensibilidade, pois a ocorrência de resultados falso-negativos pode dificultar a erradicação da enfermidade. Para contornar esse problema, o PNCEBT prevê a repetição periódica dos testes até o completo saneamento do rebanho (BRASIL, 2004a). A ocorrência de resultados falso-negativos também foi relatada por NICOLETTI (1967), embora o mesmo autor, em outra investigação (NICOLETTI, 1992), tenha constatado que o AAT, foi capaz de identificar todos os búfalos infectados de um rebanho, e SHANDU & JOSHI (1993) e FOSGATE et al. (2002) recomendem o AAT como teste de triagem para o controle da brucelose em bovinos e bubalinos, devido à maior sensibilidade em comparação com a de outros testes.

SHANDU & JOSHI (1993) apontaram o 2-Me como um excelente teste confirmatório para o diagnóstico da brucelose. Por outro lado, NIELSEN (2002) afirmou que essa prova pode proporcionar resultados falso-negativos em decorrência da presença de pontes dissulfeto também nas moléculas de IgG. O PNCEBT optou pela execução do teste do 2-Me juntamente com a prova de SAL porque, como aquele teste não detecta IgM, não é adequado para a identificação de infecções recentes, podendo proporcionar resultado negativo em soros com títulos elevados de IgM, os quais podem ser detectados pelo teste de SAL; nesse caso, o resultado é classificado como inconclusivo.

Comparando os resultados dos testes confirmatórios entre si, observou-se concordância ótima quando a RFC foi comparada com a combinação SAL+2-Me (tabela 25) ou com o teste do 2-Me isoladamente (tabela 11); em ambas as situações, o kappa foi igual a 0,86. Na comparação entre RFC e 2-Me a proporção

de resultados concordantes foi de 92,9%, e entre RFC e SAL+2-ME foi de 93,1%, resultados próximos aos encontrados por PAULIN et al. (2002), em bovinos ($\kappa = 0,88$; proporção de resultados concordantes = 94,6%), e por PINTO et al. (2005), em bubalinos ($\kappa = 0,86$; proporção de resultados concordantes = 93,3%), e inferiores aos obtidos por KURODA et al. (2004), em bovinos ($\kappa = 0,96$; proporção de resultados concordantes = 97,8%).

Como seria esperado, os testes confirmatórios apresentaram melhor concordância entre si do que com o teste de triagem, uma vez que muitos soros com resultado positivo na triagem apresentam resultado negativo no teste confirmatório, como consequência da maior especificidade deste. No entanto não se pode desconsiderar a ocorrência de alguns resultados divergentes entre os testes confirmatórios, com soros apresentando resultado negativo em um teste e título elevado no outro (tabelas 10 e 24), indicando a possibilidade de obtenção de resultado falso-negativo nos testes confirmatórios. Esses resultados discordam da constatação feita por MYLREA & FRASER (1976), que observaram correspondência entre os resultados do 2-Me e da RFC a partir da diluição 1/16 neste último teste. NICOLETTI (1969) e MARIÑO et al. (1991) não observaram diferença significativa entre RFC e 2-Me para detectar vacas infectadas, mas CORRÊA DE SÁ (1989) relatou que a RFC não deve ser substituída pelo 2-Me, com teste confirmatório no diagnóstico da brucelose bovina, por não ter sido observada concordância adequada entre os resultados dos dois testes. A ocorrência de resultado negativo na RFC em soro com título alto no 2-Me, observada no presente estudo, poderia estar associada à presença de IgG2, a qual aglutina, mas não fixa complemento (PAULIN et al., 2002). Os resultados do presente trabalho, assim como os obtidos por outros autores, reforçam a idéia de que o diagnóstico sorológico da brucelose é mais confiável quando obtido pela combinação dos resultados de vários testes.

O teste que está sendo avaliado neste trabalho (AAT-RIV) apresentou concordância regular com o teste de triagem ($\kappa = 0,53$) e concordância boa com os testes confirmatórios (tabelas 1, 17, 23 e 9). Na comparação com a combinação SAL+2-Me o κ foi 0,66 (tabela 23), na comparação com o 2-Me

isoladamente o kappa foi 0,67 (tabela 17), e na comparação com a RFC o coeficiente kappa foi 0,76 (tabela 9), ou seja, o AAT-RIV apresentou melhor concordância com a RFC.

A menor concordância com o teste de triagem está relacionada com a elevada especificidade do AAT-RIV (tabela 1). Na comparação com os testes confirmatórios observou-se que, geralmente, títulos elevados na RFC ou no 2-Me estão associados com resultado positivo no AAT-RIV (tabelas 8 e 16). Constatou-se que apenas 3 dos 375 soros com resultado positivo no AAT-RIV apresentaram resultado negativo na RFC (tabela 8), mas deve-se destacar que esses 3 soros apresentaram resultado positivo, e com títulos altos (200I, ≥ 400 , ≥ 400), no teste do 2-Me, sugerindo que se trata de soro de animal infectado e que há possibilidade de o resultado da RFC ser falso-negativo. Da mesma forma, observou-se que apenas 4 soros entre 375 positivos no AAT-RIV apresentaram resultado negativo no 2-Me, mas esses soros apresentaram resultado positivo na RFC (1 com título 8, 2 com título 64 e 1 com título ≥ 128), sugerindo que se trata de resultado falso-negativo no 2-Me, e não resultado falso-positivo no AAT-RIV.

A maneira ideal de determinar a sensibilidade de um teste de diagnóstico sorológico da brucelose seria pela análise de amostras de animais dos quais tivesse sido isolado o agente etiológico. Entretanto esse material é de difícil obtenção, e a alternativa mais prática consiste na determinação da sensibilidade relativa, na qual se usam, para estabelecer a condição de infectado, procedimentos biologicamente similares ao do teste que está sendo avaliado. Não se deve, porém, ignorar que essa metodologia apresenta inconvenientes, pois resultado falso-negativo em um dos testes usados como parâmetro acarreta descarte de amostra de animal infectado, restando apenas as amostras com resultado positivo em todos os testes padrões, o que pode acarretar distorções na determinação da sensibilidade do teste que está sendo avaliado. Da mesma forma, para a determinação da especificidade, o ideal seria o uso de amostras provenientes de rebanhos livres da infecção, localizados em áreas onde a brucelose esteja erradicada. Na impossibilidade de obtenção desse material, a opção é determinar a especificidade relativa, usando soros com resultado negativo

nos testes que serviram de padrão, o que também pode acarretar distorções. Os resultados do presente trabalho apontaram uma sensibilidade relativa do AAT-RIV de 76,5% (72,7% a 80,3%, com 95% de confiança) e uma especificidade relativa de 100%. A alta especificidade e a sensibilidade comparativamente mais baixa podem ser explicadas pelo fato de a ação do rivanol tornar o teste mais específico pela precipitação de imunoglobulinas da classe IgM, além de que o baixo pH do antígeno também torna o teste de aglutinação mais específico, conforme observaram ROSE & ROEPKE (1957). Uma vez que não há na literatura outro estudo avaliando o AAT após tratamento do soro com rivanol (AAT-RIV), não há como comparar a sensibilidade e a especificidade observadas no presente trabalho. Comparando os resultados com aqueles obtidos com o teste do rivanol, que é o teste pela prova de soroaglutinação rápida em placa após o tratamento com esse produto, pode-se deduzir que o AAT-RIV apresentou menor sensibilidade e maior especificidade, já que Reyes (1996), citado por APARICIO et al. (2000), verificou sensibilidade de 83% e especificidade de 93% para o teste do rivanol. Já NICOLETTI & TANYA (1993) observaram, para o teste do rivanol, sensibilidade variando de 84,9% a 98,6% e especificidade variando de 28,5% a 61,8%.

Sabe-se que a concentração do antígeno pode influenciar a sensibilidade e a especificidade de um teste sorológico. No AAT utiliza-se antígeno na concentração de 8% de volume celular. Considerando que no AAT-RIV o soro é tratado com igual volume da solução de rivanol, o soro é testado na metade de sua concentração original. Por isso, o teste foi também realizado com o antígeno na metade de concentração padrão. No entanto os resultados foram exatamente os mesmos tanto com o antígeno na concentração de 8% quanto na concentração de 4% de volume celular.

Os resultados observados no presente trabalho mostraram que o AAT-RIV é um teste altamente específico e que pode fornecer alguma contribuição ao diagnóstico sorológico da brucelose bovina. Essa contribuição consistiria na aplicação desse teste como prova confirmatória, em soros positivos no teste de triagem, porém antes de serem submetidos aos testes confirmatórios já adotados

pelo PNCEBT. Pelo esquema atualmente adotado pelo Programa, os soros com resultado positivo no teste de triagem podem ser submetidos ao diagnóstico confirmatório pela combinação SAL+2-Me ou pela RFC, como ilustra a figura 1.

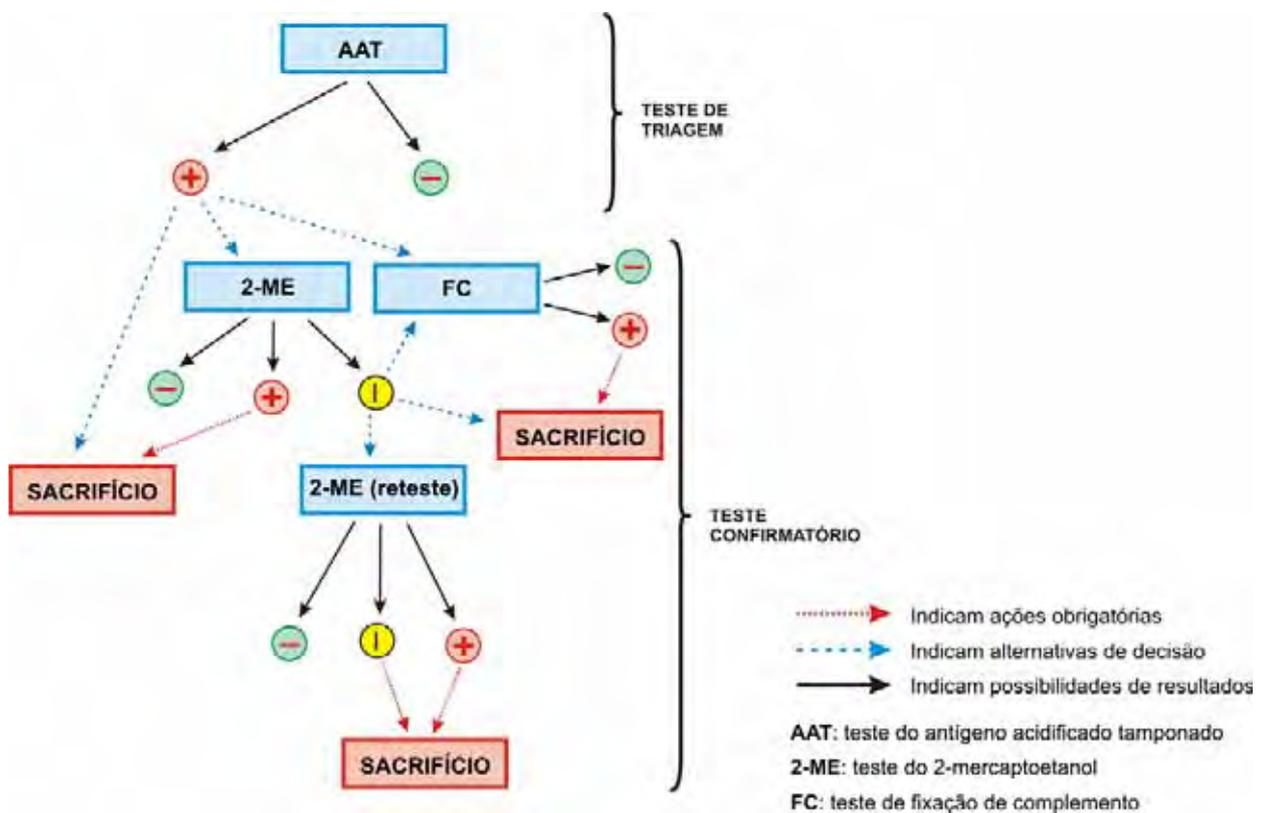


Figura 1. Uso das provas sorológicas para diagnóstico da brucelose bovina conforme prevê o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2006).

Entretanto esses testes são laboriosos, complexos e demorados, o que retarda a obtenção do resultado final e limita o número de laboratórios que podem realizar o diagnóstico confirmatório. A inserção do AAT-RIV no esquema de diagnóstico constituiria uma opção rápida e de baixo custo para a confirmação dos resultados positivos no teste de triagem, que poderia até ser realizada pelo veterinário habilitado, sem maiores necessidades de recursos laboratoriais, exigindo, em relação à infra-estrutura de que já dispõe o veterinário habilitado, apenas o acréscimo de uma centrífuga. O AAT-RIV poderia ser realizado nas amostras positivas no AAT, e os resultados positivos no AAT-RIV poderiam ser considerados indicadores de infecção, uma vez que o resultado positivo nesse teste é acompanhado de resultado positivo em pelo menos um dos testes confirmatórios adotados pelo PNCEBT. Dessa forma, não haveria necessidade de submeter essas amostras à RFC ou à combinação SAL+2-Me, em decorrência da elevada especificidade do teste. Já amostras positivas no AAT e negativas no AAT-RIV seriam então submetidas a um dos dois testes confirmatórios, para a conclusão do diagnóstico, conforme ilustra a figura 2. Com isso, haveria barateamento do diagnóstico, maior rapidez na obtenção do resultado e, portanto, na adoção da medida sanitária para a redução da taxa de prevalência da infecção, que é o objetivo do Programa.

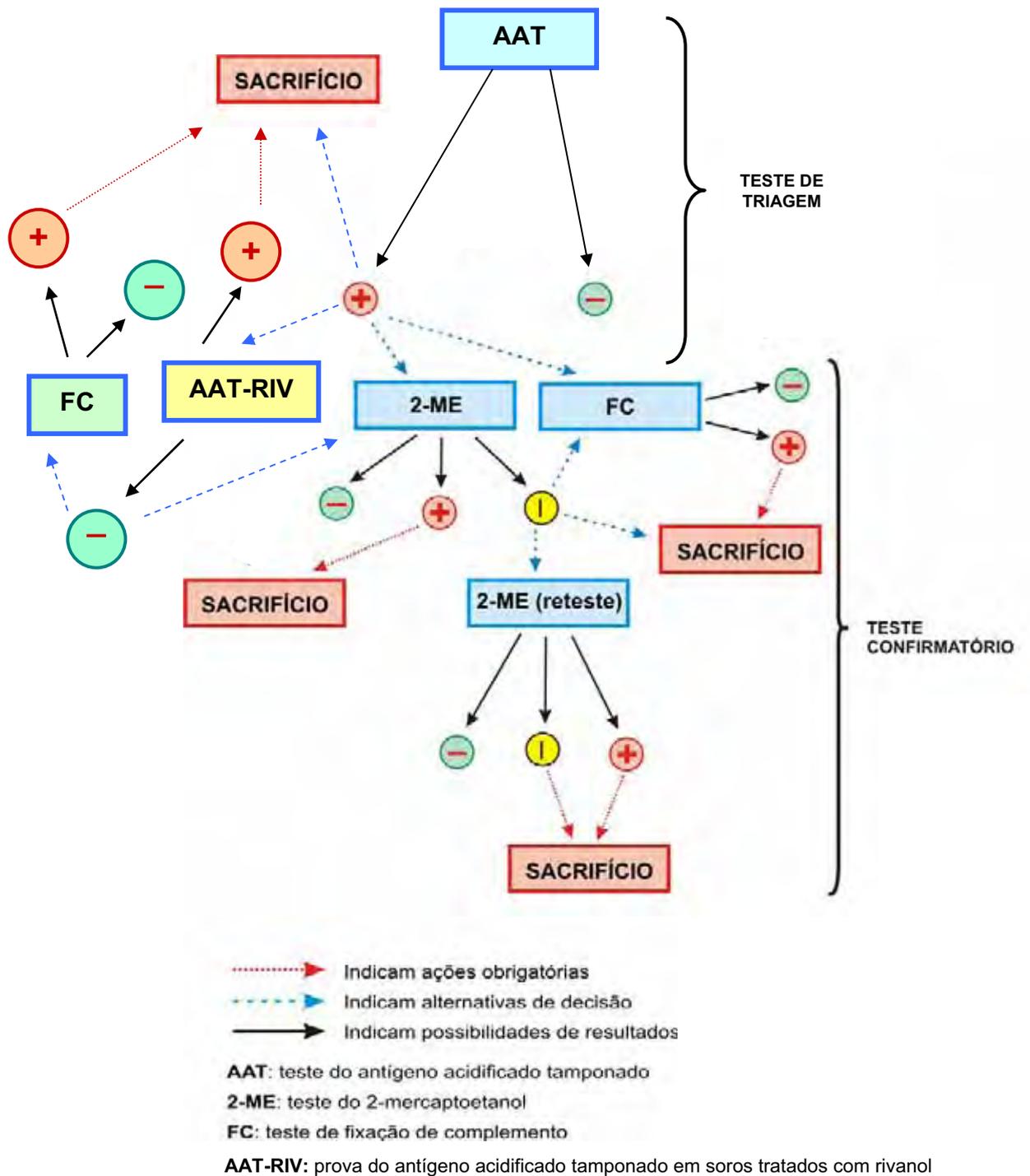


Figura 2. Proposta da inclusão da prova do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) no diagnóstico da brucelose bovina.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

1. em relação à concordância entre os resultados dos testes preconizados pelo PNCEBT e o AAT-RIV, o teste avaliado apresentou concordância regular com o teste de triagem e concordância boa com os testes confirmatórios;
2. a comparação entre os testes adotados pela programa apontou concordância boa entre o teste de triagem e os testes confirmatórios e concordância ótima quando os teste confirmatórios foram comparados entre si;
3. a sensibilidade relativa da prova do AAT-RIV, em comparação a combinação dos testes AAT, SAL+2-Me e RFC, que revelaram a condição verdadeira do animal, foi de 76,5%, com um intervalo de confiança (95%) de 72,7% a 80,3%;
4. a especificidade relativa da prova do AAT-RIV, em comparação com a combinação dos testes AAT, SAL+2-Me e RFC, que revelaram a condição verdadeira do animal, foi de 100%;
5. não houve diferença de resultados quando comparado o desempenho da prova AAT-RIV usando antígeno na concentração de 8% de volume celular e usando antígeno na concentração de 4% de volume celular;
6. o AAT-RIV poderia ser utilizado como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose bovina, sendo os animais com resultado positivo considerados infectados e aqueles com resultado negativo submetidos a um dos dois testes confirmatórios adotados pelo PNCEBT, o que se justifica pela facilidade de execução, pelo baixo custo, pela praticidade e pela elevada especificidade desse teste.

8- REFERÊNCIAS

(De acordo com as normas da ABNT-NR 6023)

ABALOS, P.; IBARRA, L.; PINOCHET, L.; NAVIA, F.; BOISIER, X. Residual anti-*Brucella* strain 19 antibodies detected in adult cattle by two indirect-ELISA tests. **Veterinary Record**, v.138, p.140, 1996.

ABIMERHI, D.; GUTIÉRREZ, A.F.; VILLALOBOS, E.J. Uso de las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y aglutinación con rivanol para el diagnóstico de brucelosis bovina en Yucatán, México. **Veterinária México**, v.29, n.2, p.167-71, 1998.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. v.1. Bacteriosis y micosis. 3 ed. Washington: OPS, 2001. 398 p.

ALLAN, G.S.; CHAPPEL, R.J.; WILLIAMSON, P., MCNAUGHT, D.J.; A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. **Journal of Hygiene**, v.76, n.2, p.287-98, 1976.

ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; MCPHERSON, G.G. The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation test, serum agglutination and rose Bengal test. **Australian Veterinary Journal**, v.51, n.2, p.57-63, 1975.

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. 190p.

APARICIO, E.D.; ANDRADE, L.H.; DÍAZ, V.O.; MARTÍNEZ, J.M.B.; GÜEMES, F.S. Evaluación de la prueba de rivanol para el diagnóstico de brucelosis en caprinos. **Veterinária México**. v.31, n. 1, p.53-8, 2000.

BEH, K.J. Distribution of *Brucella* antibody among immunoglobulin classes and low molecular weight antibody fraction in serum and whey of cattle. **Research in Veterinary Science**, v.14, p.381-4, 1973.

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.

BLASCO, J.M.; GAMAZO, C. Brucelosis animal. **Investigación y Ciencia**, 1994. Disponível em: <http://www.coli.usal.es/web/articulos/art07/at07.htm>. Acesso em: 15 de setembro de 2007.

BRANDON, M.R.; WATSON, D.C; LASCELLES, A.K. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v.49, p.613-23, 1971.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. **Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001**. Institui o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Republicada no Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, 16 jan. 2001. Seção 1, p. 11-17.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa SDA nº 6, de 08 de janeiro de 2004**. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de janeiro de 2004a. Seção 1, p. 6-10.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 15, de 19 de fevereiro de 2004.** Aprova o regulamento técnico para produção e controle de qualidade da vacina contra a brucelose e antígenos para diagnóstico da brucelose. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, DF, 24 de março de 2004b. Seção 1, p. 25-26.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal, 2006. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico.** Brasília: MAPA / DAS / DSA, 2006, 188p.

BRICKER, B.J. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.433-4, 2002.

BRINLEY MORGAN, W.J.; MACKINNON, D.J.; LAWSON, J.R.; CULLEN, G.A. The rose Bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. **Veterinary Record**, v.85, p. 636-41, 1969.

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS, OPS/OMS. **Pruebas Suplementarias para el diagnostico de la brucelosis.** Ramos Mejía, Buenos Aires, Nota Técnica n.25, 1982.

CHAPPEL, R.J. Diagnosis of bovine brucellosis: Principles, practice and problems. **Surveillance**, v.16, n.2, p.3-5, 1989.

CORBEL, M.J. Identification of the immunoglobulin class active in the rose Bengal plate test for bovine brucellosis. **Journal os Hygiene**, v.70, n.4, p. 779-95, 1972.

CORNER, L.A.; ALTON, G.G.; MCNICHOL, L.N.; STREETENS, T.; TRUEMEN, K.F. An evaluation of an anamnestic test for brucellosis in cattle of the northern pastoral areas. **Australian Veterinary Journal**, v.60, n.1, p.1-3, 1983.

CORRÊA DE SÁ, M.I.V.C. Avaliação da prova de imunodifusão radial com o antígeno hapteno nativo (HN) no diagnóstico sorológico da brucelose em animais infectados e vacinados. Estudo comparativo com outras provas sorológicas. **Repositório de Trabalhos do L.N.I.V.**, v.21, p.11-44, 1989.

DAJER, A.; LUNA-MARTÍNEZ, E.; ZAPATA, D.; VILLEGAS, S.; GUTIÉRREZ, E.; PEÑA, G.; GURRÍA, F.; NIELSEN, K.; GALL, D. Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis en México. **Preventive Veterinary Medicine**, v.40, n.1, p.67-73, 1999.

DAVIES, G. The rose Bengal test. **Veterinary Record**, v.88, p.447-9, 1971.

DEL CAMPO, M.R.; TAMAYO, R.; DEL CAMPO, C.H. Embryo transfer from brucellosis-positive donors: a field trial. **Theriogenology**, v.27, n.1, p.221, 1987.

EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. **Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizzoties**, v. 16, n. 1, p. 215-225, 1997.

FOSGATE, G.T.; ADESIYUN, A.A.; HIRD, D.W.; JOHNSON, W.O.; HIETALA, S.K.; SCHURIG, G.G.; RYAN, J. Comparison of serologic test for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.11, p.1598 – 1605, 2002.

GARCÍA-CARRILLO, C. Metodos para el diagnostico de la brucellosis. **Gaceta Veterinária**, v. 32, p.661-7, 1970.

GUARINO, A.; FUSCO, G.; DI MATTEO, A.; URBANI, G.; CONDOLEO, R.; SERPE, L.; TITTARELLI, M.; DI VENTURA, M.; GALLO, P. Indirect ELISA for the diagnosis of brucellosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Italy. **Veterinary Record**, v.149, p.88-90, 2001.

HAYES, J.; CHAPPEL, R.J. A comparison of the results of the brucellosis radioimmunoassay and other serological test in experimentally infected cattle. **Journal of Hygiene**, v.88, n.1, p.21-28, 1982.

HUBER, J.D.; NICOLETTI, P. Comparison of the results of card, rivanol, complement-fixation, and milk ring tests with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.7, p.1529-31, 1986.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIAL TAXONOMY. Subcommittee on Taxonomy of *Brucella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.450-2, 1988.

JEKEL, J.F.; ELMORE, J.G.; KATZ, D.L. **Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva**. Porto Alegre: Artmed, 1999. 328 p.

JIMENÉZ DE BAGÜÉS, M.P.; MARÍN, C.M.; BLASCO, J.M.; MORRIÓN, I.; GAMAZO, C. An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival *B. melitensis* strain Rev 1 vaccination. **Veterinary Microbiology**, v.30, p.233-41, 1992.

KURODA, R.B.S.; PAULIN, L.M.S.; NOZAKI, C.N.; SILVA JUNIOR, F.F.; GERONUTTI, MEGID, J. Prevalência da brucelose bovina na microrregião da serra de Botucatu – Estudo comparativo dos resultados das técnicas de

soroaglutinação lenta em tubos, 2-mercaptoetanol e fixação de complemento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.2, p.137-42, 2004.

LEVIEUX, D. Immunoglobulines bovines et brucellose. I – Purification des immunoglobulines et preparation de leurs atisérums spécifiques. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v.5, n.3, p.329-42, 1974.

LORD, V.R.; LORD, R.D. *Brucella suis* infections in collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in Venezuela. **Journal of Wildlife Diseases**, v.27, n.3, p.477-81, 1991.

LUNA-MARTÍNEZ, J.E.; MEJÍA-TERÁN, C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.19-30, 2002.

MARIÑO, J.; GALLEGO, M.M.I.; DELEÓN, L.S.; ALMANSA, M.J. Comparación de técnicas serológicas en la evaluación de bovinos infectados naturalmente por *Brucella abortus*. In: FRANK, J.F. ed. **Networking in brucellosis research**. Report of the United Nations University, Brucellosis Research Network. Tokyo: United Nations University Press, 1991, p.120-30.

MARTIN, S.W.; MEEK, A.H.; WILLEBERG, P. **Veterinary Epidemiology**. Ames: Iowa State University Press, 1987. 343 p.

MATHIAS, L.A.; PINTO, A.A. Serological diagnosis of brucellosis in water buffaloes (*Bubalu bubalis*): comparison among complement fixation, serum agglutination and rose Bengal test. **International Journal of Zoonosis**, v.10, p.122-6, 1983.

MATHIAS, L.A.; MACMILLAN, A.P.; GREISER-WILKE, I.; MOENNING, E.V. Comparação entre a reação de fixação de complemento, teste imunoenzimático indireto e teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da

brucelose em bovinos procedentes de rebanhos com histórico da enfermidade. **Ars Veterinária**, v.11, n.1, p.47-55, 1995.

MATHIAS, L.A. Diagnóstico laboratorial da brucelose. In: ENCONTRO DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO VETERINARIO DO CONE SUL, I, 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 1996, p.139-40.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MARCOS JÚNIOR, G.; CROCCI, A.J. Evaluation of rapid agglutination, tube agglutination, buffered plate antigen and 2-mercaptoethanol tests in the diagnosis of bovine brucellosis, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.4, p.395-99, 2000.

MITTAL, K.R.; TIZARD, I.R. Agglutination test and their modifications in the diagnosis of bovine brucellosis. **Compendium of Immunology and Microbiology of Infectious Diseases**, v.6, p.1-8, 1983.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E.S.C.; DIAS, H.L.T. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.2, p.41-4, 2002.

MORENO, E. Brucellosis in Central America. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.31-8, 2002.

MYLREA, P.J.; FRASER, G.C. The use of supplementary tests in the serological diagnosis of bovine brucellosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, p. 261-6, 1976.

NAVARRO, F.; GREGORET, R.; BIDONDE, J.; SANMARTINO, L. Determination of the serological prevalence of bovine brucellosis in the county of Tandil,

Argentina. **Revista de Medicina Veterinária**, Buenos Aires, v.78, n.5, p.311-14, 1997.

NERI, A.F.; ALDAY, J.R.; CASANOVA, L.G. Prevalencia de brucelosis em tres municipios del sur de Tamaulipas. **Técnicas Pecuárias de México**, v.31, n.2, p.97101, 1993.

NICOLETTI, P. Utilization of the card test in brucellosis eradication. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.151, n.12, p. 1778-83, 1967.

NICOLETTI, P. Further evaluations of serologic test procedure used to diagnose brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.30, n.10, p.1811- 16, 1969.

NICOLETTI, P. An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Tropical Animal Health Production**, v.24, n.1, p.40-4, 1992.

NICOLETTI, P.; TANYA, V. Comparison of enzyme-labeled immunosorbent assay and particle concentration fluorescence immunoassay with standard serologic methods and bacteriologic culture for detection of *Brucella* sp-infected cows in herds with brucellosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, n.12, p.1975-77, 1993

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by sorology. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.447-59, 2002.

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. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.4, p.41-7, 2002.

PAULIN, L.M.; FERREIRA, J.S. **Combate à Brucelose Bovina: Situação Brasileira**. Funep, Jaboticabal, 2003.154p.

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 da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2006.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia. Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 596 p.

PINTO, M.R.A.; FAGLIARI, J.J.; MATHIAS, L.A.; MEGID, J.; SALGADO, V.R. Avaliação da prova do antígeno acidificado tamponado, em comparação com as provas de fixação de complemento e 2-mercaptoetanol, para diagnóstico sorológico da brucelose em um rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) infectado por *Brucella abortus*. **Ars Veterinaria**, v.21, supl., p. 147-154, 2005.

POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P., Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.55-62, 2002.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: Tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1737 p.

RAFAI, M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.81-110, 2002.

RANGAN, V.E. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United State. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.11-18, 2002.

ROSE, J.E.; ROPKE, M.H. An acidified antigen for detection of nonspecific reactions in the plate-agglutination test for bovine brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 18, p. 550-555, 1957.

SALES HENRIQUES, H.L.R.; HUESTON, W.D.; HOBLET, K.H.; SHULAW, W.P. Field trials evaluating the safety and serologic reactions of reduced-dose *Brucella melitensis* Rev 1 vaccination in adult sheep. **Preventive Veterinary Medicine**, v.13, p.205-15, 1992

SCHREIBER, W.; MATHYS, F.K. **Brucellosis**. In: _____. Historia de las enfermedades infecciosas. Basilea: La Roche & Cia, p.155-7, 1987.

SHANDU, K.S.; JOSHI, D.V. Comparative study in cattle and buffaloes for evaluation of various diagnostic tests for brucellosis. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v.36, n.4, p.458-65, 1993.

STACK, J.A., MACMILLAN, A.P. Identification and biotyping of *Brucella* spp. BruNet Publications, 1999. Disponível em: [http:// progress.box.co.il/brunet/](http://progress.box.co.il/brunet/). Acesso em 15 de setembro de 2007.

SUTHERLAND, S.S; LE GRAS, D.V.; ROBERTSON, A.G.; JOHNSTON, J.M.; EVANS, R.J. Serological response of cattle after vaccination and challenge with *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v.7, n.2, p.165-75, 1982.

SUTHERLAND, S.S. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of cattle infected with *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v. 10, p. 23-32, 1985.

TAMAYO, R.C; GÓMEZ, P.P.; GALLEGUILLOS, H.V. Vigilancia de brucelosis bovina en una planta faenadora. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v.12, n.1, p. 35-40, 1997.

THOMSEN, A. Does the bull spread infectious abortion in cattle? Experimental studies from 1936 to 1942. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 53, n.3, p. 199-211, 1943.

THORNER, R.M.; REMEIN, Q.R. **Principles and Procedures in the Evaluation of Screening for Disease**. Washington D.C.: United States Government Printing Office, 1961. 24 p. (Public Health Monograph, 67).

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. Hangan and Bruener`s microbiology and infectious diseases of domestic animals. **Comstock Publishing Associates**. Division of Cornell University Press, 1988.

ZAMBRANO, A.J.; CHIRIGUAYO, B.A.; VILLALVA, F.M.; LOOR, K.A. Efficacy of reduced dose in vaccination of adult cattle in herds infected with brucellosis, In **Networking in brucellosis research. Report of the United Nations University Brucellosis Research Network** [edited by Frank, J. F.] Tokyo 150, Japan: United Nation University Press, p.97-105, 1991.

APÊNDICE

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
01	N	N	N	-	25 I	N	-	N
02	N	N	N	-	-	N	-	N
03	N	N	N	-	25	N	-	N
04	N	N	N	-	-	N	-	N
05	N	N	N	-	25	N	-	N
06	N	N	N	-	-	N	-	N
07	N	N	N	-	-	N	-	N
08	N	N	N	-	-	N	-	N
09	N	N	N	-	-	N	-	N
10	N	N	N	-	-	N	-	N
11	N	N	N	-	-	N	-	N
12	N	N	N	25 I	50 I	N	-	N
13	N	N	N	-	-	N	-	N
14	N	N	N	-	-	N	-	N
15	N	N	N	-	-	N	-	N
16	N	N	N	-		N	-	N
17	N	N	N	25 I	25 I	N	-	N
18	N	N	N	-	-	N	-	N
19	N	N	N	-	25	N	-	N
20	N	N	N	-	25 I	N	-	N
21	N	N	N	-	-	N	-	N
22	N	N	N	25 I	25 I	N	-	N
23	N	N	N	-	-	N	-	N
24	N	N	N	-	-	N	-	N
25	N	N	N	25 I	-	N	-	N
26	N	N	N	-	-	N	-	N
27	N	N	N	-	-	N	-	N
28	N	N	N	-	25 I	N	-	N
29	N	N	N	-	-	N	-	N
30	N	N	N	-	-	N	-	N
31	N	N	N	-	-	N	-	N
32	N	N	N	-	-	N	-	N
33	N	N	N	-	-	N	-	N
34	N	N	N	-	-	N	-	N
35	N	N	N	-	-	N	-	N
36	N	N	N	-	-	N	-	N
37	N	N	N	-	-	N	-	N
38	N	N	N	-	25	N	-	N
39	N	N	N	-	-	N	-	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
40	N	N	N	-	-	N	-	N
41	N	N	N	-	-	N	-	N
42	N	N	N	-	-	N	1/2	N
43	N	N	N	-	-	N	-	N
44	N	N	N	-	-	N	-	N
45	N	N	N	-	25	N	-	N
46	N	N	N	-	25 I	N	-	N
47	N	N	N	25 I	25	N	-	N
48	N	N	N	-	-	N	-	N
49	N	N	N	-	-	N	-	N
50	N	N	N	-	-	N	-	N
51	N	N	N	-	25 I	N	-	N
52	N	N	N	-	-	N	-	N
53	N	N	N	-	25 I	N	1/2	N
54	N	N	N	-	-	N	-	N
55	N	N	N	-	-	N	-	N
56	N	N	N	-	-	N	-	N
57	N	N	N	-	-	N	-	N
58	N	N	N	-	-	N	-	N
59	N	N	N	-	-	N	-	N
60	N	N	N	-	-	N	-	N
61	N	N	N	-	-	N	-	N
62	N	N	N	-	-	N	-	N
63	N	N	N	-	-	N	-	N
64	N	N	N	-	-	N	-	N
65	N	N	N	-	-	N	-	N
66	N	N	N	-	-	N	-	N
67	N	N	N	-	-	N	-	N
68	N	N	N	-	-	N	-	N
69	N	N	N	-	-	N	-	N
70	N	N	N	-	-	N	-	N
71	N	N	N	-	-	N	-	N
72	N	N	N	-	-	N	-	N
73	N	N	N	-	-	N	-	N
74	N	N	N	-	-	N	-	N
75	N	N	N	-	-	N	-	N
76	N	N	N	-	-	N	-	N
77	N	N	N	-	-	N	-	N
78	N	N	N	-	-	N	-	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
79	N	N	N	-	-	N	-	N
80	N	N	N	-	-	N	-	N
81	N	N	N	-	-	N	-	N
82	N	N	N	-	-	N	-	N
83	N	N	N	-	50 I	N	-	N
84	N	N	N	-	-	N	-	N
85	N	N	N	-	-	N	-	N
86	N	N	N	-	-	N	-	N
87	N	N	N	-	-	N	-	N
88	N	N	N	-	-	N	-	N
89	N	N	N	-	-	N	-	N
90	N	N	N	-	-	N	-	N
91	N	N	N	-	-	N	-	N
92	N	N	N	-	-	N	-	N
93	N	N	N	-	-	N	-	N
94	N	N	N	-	-	N	-	N
95	N	N	N	-	-	N	-	N
96	N	N	N	-	-	N	-	N
97	N	N	N	-	-	N	-	N
98	N	N	N	-	-	N	-	N
99	N	N	N	-	-	N	-	N
100	N	N	N	-	-	N	-	N
101	N	N	N	-	-	N	-	N
102	N	N	N	-	-	N	-	N
103	N	N	N	-	-	N	-	N
104	N	N	N	-	-	N	-	N
105	N	N	N	-	-	N	-	N
106	N	N	N	-	-	N	-	N
107	N	N	N	-	-	N	-	N
108	N	N	N	-	-	N	-	N
109	N	N	N	-	25	N	-	N
110	N	N	N	-	-	N	-	N
111	N	N	N	-	-	N	-	N
112	N	N	N	-	-	N	-	N
113	N	N	N	-	-	N	-	N
114	N	N	N	-	-	N	-	N
115	N	N	N	-	-	N	-	N
116	N	N	N	-	-	N	-	N
117	N	N	N	-	-	N	-	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
118	N	N	N	-	-	N	-	N
119	N	N	N	-	-	N	-	N
120	N	N	N	-	-	N	-	N
121	N	N	N	-	-	N	-	N
122	N	N	N	-	-	N	-	N
123	N	N	N	-	-	N	-	N
124	N	N	N	-	-	N	-	N
125	N	N	N	-	-	N	-	N
126	N	N	N	-	-	N	-	N
127	N	N	N	-	-	N	-	N
128	N	N	N	-	-	N	-	N
129	N	N	N	-	-	N	-	N
130	N	N	N	-	-	N	-	N
131	N	N	N	-	-	N	-	N
132	N	N	N	-	-	N	-	N
133	N	N	N	-	-	N	-	N
134	N	N	N	-	-	N	-	N
135	N	N	N	-	-	N	-	N
136	N	N	N	-	-	N	-	N
137	N	N	N	-	-	N	-	N
138	N	N	N	-	-	N	-	N
139	N	N	N	-	-	N	-	N
140	N	N	N	-	-	N	-	N
141	N	N	N	-	-	N	-	N
142	N	N	N	-	-	N	-	N
143	N	N	N	25 I	50 I	N	1/2	N
144	N	N	N	25 I	25	N	1/2	N
145	N	N	N	-	-	N	-	N
146	N	N	N	-	25	N	-	N
147	N	N	N	-	-	N	-	N
148	N	N	N	-	25	N	-	N
149	N	N	N	-	-	N	-	N
150	N	N	N	-	25	N	-	N
151	N	N	N	-	25	N	-	N
152	N	N	N	-	25	N	-	N
153	N	N	N	-	25	N	-	N
154	N	N	N	-	25	N	1/2	N
155	N	N	N	-	-	N	1/2	N
156	N	N	N	-	25	N	-	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
157	N	N	N	-	25	N	-	N
158	N	N	N	-	25	N	-	N
159	N	N	N	-	25	N	-	N
160	N	N	N	-	-	N	-	N
161	N	N	N	-	-	N	-	N
162	N	N	N	25 I	50 I	N	1/2	N
163	N	N	N	-	25 I	N	-	N
164	N	N	N	-	25	N	-	N
165	N	N	N	-	-	N	-	N
166	N	N	N	-	25	N	1/2	N
167	N	N	N	-	50 I	N	-	N
168	N	N	N	-	-	N	-	N
169	N	N	N	-	25 I	N	1/2	N
170	N	N	N	-	25	N	-	N
171	N	N	N	-	-	N	-	N
172	N	N	N	-	50 I	N	-	N
173	N	N	N	-	-	N	-	N
174	N	N	N	-	-	N	-	N
175	N	N	N	-	25 I	N	-	N
176	N	N	N	-	-	N	-	N
177	N	N	N	-	25	N	1/2	N
178	N	N	N	-	50 I	N	-	N
179	N	N	N	-	-	N	-	N
180	N	N	N	-	50 I	N	-	N
181	N	N	N	-	25	N	-	N
182	N	N	N	-	25	N	-	N
183	N	N	N	-	25 I	N	-	N
184	N	N	N	-	50 I	N	-	N
185	N	N	N	-	25 I	N	-	N
186	N	N	N	-	25 I	N	-	N
187	N	N	N	-	25 I	N	1/2	N
188	N	N	N	-	50 I	N	-	N
189	N	N	N	-	25	N	-	N
190	N	N	N	-	50 I	N	-	N
191	N	N	N	-	50 I	N	-	N
192	N	N	N	-	-	N	-	N
193	N	N	N	-	25 I	N	-	N
194	N	N	N	-	25 I	N	-	N
195	N	N	N	-	25	N	-	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
196	N	N	N	-	25 I	N	-	N
197	N	N	N	-	25 I	N	-	N
198	N	N	N	-	25 I	N	-	N
199	N	N	N	-	25 I	N	-	N
200	N	N	N	-	25 I	N	-	N
201	N	N	N	-	25	N	-	N
202	N	N	N	-	25	N	-	N
203	N	N	N	-	25 I	N	-	N
204	N	N	N	-	25 I	N	-	N
205	N	N	N	-	50 I	N	-	N
206	N	N	N	-	25	N	-	N
207	N	N	N	-	25 I	N	-	N
208	N	N	N	-	25	N	-	N
209	N	N	N	-	25	N	-	N
210	N	N	N	-	-	N	-	N
211	N	N	N	-	-	N	-	N
212	N	N	N	-	25	N	-	N
213	N	N	N	-	25	N	-	N
214	N	N	N	-	-	N	-	N
215	N	N	N	-	-	N	-	N
216	N	N	N	-	25	N	-	N
217	N	N	N	-	-	N	-	N
218	N	N	N	-	-	N	-	N
219	N	N	N	-	-	N	-	N
220	N	N	N	-	-	N	-	N
221	N	N	N	-	-	N	-	N
222	N	N	N	-	25	N	-	N
223	N	N	N	-	25	N	-	N
224	N	N	N	-	-	N	-	N
225	N	N	N	-	-	N	-	N
226	N	N	N	-	-	N	-	N
227	N	N	N	-	-	N	-	N
228	N	N	N	-	-	N	-	N
229	N	N	N	-	-	N	-	N
230	N	N	N	-	25 I	N	-	N
231	N	N	N	-	-	N	-	N
232	N	N	N	-	25	N	-	N
233	N	N	N	-	-	N	-	N
234	N	N	N	-	25	N	-	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
235	N	N	N	-	-	N	-	N
236	N	N	N	-	-	N	-	N
237	N	N	N	-	-	N	-	N
238	N	N	N	-	-	N	-	N
239	N	N	N	-	-	N	-	N
240	N	N	N	-	-	N	-	N
241	N	N	N	-	-	N	-	N
242	N	N	N	-	-	N	-	N
243	N	N	N	-	-	N	-	N
244	N	N	N	-	-	N	-	N
245	N	N	N	-	-	N	-	N
246	N	N	N	-	-	N	-	N
247	N	N	N	-	-	N	-	N
248	N	N	N	-	-	N	-	N
249	N	N	N	-	-	N	-	N
250	N	N	N	-	25 I	N	-	N
251	N	N	N	-	-	N	-	N
252	N	N	N	-	25	N	-	N
253	N	N	N	-	-	N	-	N
254	N	N	N	-	-	N	-	N
255	N	N	N	-	-	N	-	N
256	N	N	N	-	-	N	-	N
257	N	N	N	-	-	N	-	N
258	N	N	N	-	-	N	-	N
259	N	N	N	-	25	N	-	N
260	N	N	N	-	-	N	-	N
261	N	N	N	-	25	N	-	N
262	N	N	N	-	25	N	-	N
263	N	N	N	-	25	N	-	N
264	N	N	N	-	-	N	-	N
265	N	N	N	-	25	N	-	N
266	N	N	N	-	25	N	-	N
267	N	N	N	-	-	N	-	N
268	N	N	N	-	25	N	-	N
269	N	N	N	-	-	N	-	N
270	N	N	N	-	25	N	1/2	N
271	N	N	N	-	-	N	-	N
272	N	N	N	-	-	N	-	N
273	N	N	N	-	25 I	N	-	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
274	N	N	N	-	-	N	-	N
275	N	N	N	-	-	N	-	N
276	N	N	N	-	-	N	-	N
277	N	N	N	-	-	N	-	N
278	N	N	N	-	-	N	-	N
279	N	N	N	-	-	N	-	N
280	N	N	N	-	25	N	-	N
281	N	N	N	-	-	N	-	N
282	N	N	N	-	-	N	-	N
283	N	N	N	-	25	N	-	N
284	N	N	N	-	-	N	-	N
285	N	N	N	-	-	N	-	N
286	N	N	N	-	-	N	-	N
287	N	N	N	-	-	N	-	N
288	N	N	N	-	-	N	-	N
289	N	N	N	-	25 I	N	-	N
290	N	N	N	-	25	N		
291	N	N	N	-	-	N	-	N
292	N	N	N	-	-	N	-	N
293	N	N	N	-	-	N	-	N
294	N	N	N	-	-	N	-	N
295	N	N	N	-	-	N	-	N
296	N	N	N	-	-	N	-	N
297	N	N	N	-	-	N	-	N
298	N	N	N	-	25	N	-	N
299	N	N	N	-	-	N	-	N
300	N	N	N	-	-	N	-	N
301	N	N	N	-	25	N	-	N
302	N	N	N	-	-	N	-	N
303	N	N	N	-	-	N	-	N
304	N	N	N	-	25	N	1/2	N
305	N	N	N	-	25	N	1/2	N
306	N	N	N	25 I	25	N	1/2	N
307	N	N	N	-	25	N	-	N
308	N	N	N	-	25	N	1/2	N
309	N	N	N	-	25	N	1/2	N
310	N	N	N	-	50I	N	-	N
311	N	N	N	-	50 I	N	-	N
312	N	N	N	-	50 I	N	-	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
313	N	N	N	-	50 I	N	-	N
314	N	N	N	-	50 I	N	-	N
315	N	N	N	-	-	N	-	N
316	N	N	N	-	25	N	-	N
317	N	N	N	-	-	N	-	N
318	N	N	N	-	-	N	-	N
319	N	N	N	-	-	N	-	N
320	N	N	N	-	-	N	-	N
321	N	N	N	-	-	N	-	N
322	N	N	N	25 I	25 I	N	-	N
323	N	N	N	-	-	N	-	N
324	N	N	N	-	-	N	-	N
325	N	N	N	-	-	N	-	N
326	N	N	N	-	25	N	-	N
327	N	N	N	-	50 I	N	-	N
328	N	N	N	-	-	N	-	N
329	N	N	N	-	-	N	-	N
330	N	N	N	-	25 I	N	-	N
331	N	N	N	-	-	N	-	N
332	N	N	N	-	-	N	-	N
333	N	N	N	-	-	N	-	N
334	N	N	N	-	25 I	N	-	N
335	N	N	N	-	-	N	-	N
336	N	N	N	-	25	N	-	N
337	N	N	N	-	25	N	-	N
338	N	N	N	-	-	N	-	N
339	N	N	N	-	25	N	-	N
340	N	N	N	-	-	N	-	N
341	N	N	N	-	25 I	N	-	N
342	N	N	N	-	-	N	-	N
343	N	N	N	-	25	N	-	N
344	N	N	N	-	-	N	-	N
345	N	N	N	-	-	N	-	N
346	N	N	N	-	-	N	-	N
347	N	N	N	-	-	N	-	N
348	N	N	N	-	-	N	-	N
349	N	N	N	-	-	N	-	N
350	N	N	N	-	-	N	-	N
351	N	N	N	-	-	N	-	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
352	N	N	N	-	25	N	1/2	N
353	N	N	N	-	-	N	-	N
354	N	N	N	-	25	N	-	N
355	N	N	N	-	-	N	-	N
356	N	N	N	-	-	N	-	N
357	N	N	N	-	25 I	N	-	N
358	N	N	N	-	-	N	-	N
359	N	N	N	-	-	N	-	N
360	N	N	N	-	25 I	N	-	N
361	N	N	N	-	-	N	-	N
362	N	N	N	-	-	N	-	N
363	N	N	N	-	-	N	-	N
364	N	N	N	-	-	N	-	N
365	N	N	N	-	-	N	-	N
366	N	N	N	-	-	N	-	N
367	N	N	N	-	-	N	-	N
368	N	N	N	-	50	N	-	N
369	N	N	N	-	25	N	-	N
370	N	N	N	-	-	N	-	N
371	N	N	N	-	-	N	-	N
372	N	N	N	-	-	N	-	N
373	N	N	N	-	-	N	-	N
374	N	N	N	-	25	N	-	N
375	N	N	N	-	-	N	-	N
376	N	N	N	-	-	N	-	N
377	+	N	N	25 I	25	N	1/2	N
378	+	N	N	25 I	25	N	-	N
379	+	N	N	25 I	50 I	N	-	N
380	+	N	N	-	-	N	1/2	N
381	+	N	N	-	-	N	1/2	N
382	+	N	N	-	-	N	-	N
383	+	N	N	-	-	N	1/2	N
384	+	N	N	25 I	25	N	-	N
385	+	N	N	-	-	N	-	N
386	+	N	N	-	-	N	-	N
387	+	N	N	-	-	N	-	N
388	+	N	N	-	-	N	-	N
389	+	N	N	-	-	N	-	N
390	+	N	N	-	-	N	-	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
391	+	N	N	-	-	N	-	N
392	+	N	N	-	-	N	-	N
393	+	N	N	-	-	N	-	N
394	+	N	N	-	-	N	-	N
395	+	N	N	-	25	N	1/2	N
396	+	N	N	-	-	N	1/2	N
397	+	N	N	-	-	N	1/2	N
398	+	N	N	-	50 I	N	-	N
399	+	N	N	-	25	N	-	N
400	+	N	N	-	50 I	N	-	N
401	+	N	N	25 I	50 I	N	1/2	N
402	+	N	N	-	25	N	1/2	N
403	+	N	N	-	-	N	1/2	N
404	+	N	N	-	25 I	N	-	N
405	+	N	N	-	-	N	-	N
406	+	N	N	-	25	N	1/2	N
407	+	N	N	-	50 I	N	1/2	N
408	+	N	N	-	25	N	1/2	N
409	+	N	N	-	-	N	1/2	N
410	+	N	N	-	25	N	1/2	N
411	+	N	N	-	25	N	-	N
412	+	N	N	-	-	N	-	N
413	+	N	N	-	-	N	-	N
414	+	N	N	-	-	N	-	N
415	+	N	N	-	-	N	-	N
416	+	N	N	-	25 I	N	-	N
417	+	N	N	-	-	N	-	N
418	+	N	N	-	-	N	-	N
419	+	N	N	-	25 I	N	-	N
420	+	N	N	-	25	N	-	N
421	+	N	N	-	25	N	1/2	N
422	+	N	N	-	-	N	-	-
423	+	N	N	25 I	50 I	N	-	N
424	+	N	N	-	-	N	-	N
425	+	N	N	-	25	N	1/2	N
426	+	N	N	25 I	50 I	N	-	N
427	+	N	N	25 I	50 I	N	1/2	N
428	+	N	N	25 I	25	N	1/2	N
429	+	N	N	25 I	50 I	N	1/2	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
430	+	N	N	-	25	N	-	N
431	+	N	N	-	25	N	-	N
432	+	N	N	-	-	N	-	N
433	+	N	N	-	-	N	-	N
434	+	N	N	-	-	N	-	N
435	+	N	N	-	-	N	-	N
436	+	N	N	-	25	N	-	N
437	+	N	N	-	25 I	N	-	N
438	+	N	N	-	-	N	-	N
439	+	N	N	25 I	25	N	1/2	N
440	+	N	N	-	25	N	-	N
441	+	N	N	-	-	N	1/2	N
442	+	N	N	-	-	N	-	N
443	+	N	N	-	25	N	1/2	N
444	+	N	N	-	25	N	1/2	N
445	+	N	N	-	50 I	N	-	N
446	+	N	N	-	50 I	N	-	N
447	+	N	N	-	-	N	-	N
448	+	N	N	-	25	N	-	N
449	+	N	N	50	50	+	-	N
450	+	N	N	25	50	+	-	N
451	+	N	N	25	25	+	-	N
452	+	N	N	25	25	+	-	N
453	+	N	N	50	100	+	1/2	N
454	+	N	N	50 I	50	+	-	N
455	+	N	N	50	50	+	1/2	N
456	+	N	N	50 I	50	+	-	N
457	+	N	N	50 I	50	+	1/2	N
458	+	N	N	50 I	50	+	-	N
459	+	N	N	50	100	+	-	N
460	+	N	N	50 I	50	+	-	N
461	+	N	N	50 I	50	+	1/2	N
462	+	N	N	25	25	+	1/2	N
463	+	N	N	50 I	100	+	-	N
464	+	N	N	25	25	+	-	N
465	+	N	N	25	50	+	-	N
466	+	N	N	25	25	+	-	N
467	+	N	N	25	50 I	+	-	N
468	+	N	N	25	100 I	+	1/2	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
469	+	N	N	25	≥100	+	-	N
470	+	N	N	25	50	+	1/2	N
471	+	N	N	25	50	+	1/2	N
472	+	N	N	25	50	+	-	N
473	+	N	N	25	50	+	-	N
474	+	N	N	25	50	+	1/2	N
475	+	N	N	25	50	+	-	N
476	+	N	N	25	100	+	-	N
477	+	N	N	25	50 I	+	1/2	N
478	+	N	N	25	25	+	-	N
479	+	N	N	25	100 I	+	1/2	N
480	+	N	N	25	50	+	-	N
481	+	N	N	25	100	+	1/2	N
482	+	N	N	50 I	100 I	+	-	N
483	+	N	N	25	25	+	-	N
484	+	N	N	25	50	+	-	N
485	+	N	N	25	50	+	1/2	N
486	+	N	N	25	50	+	1/2	N
487	+	N	N	25	50 I	+	-	N
488	+	N	N	25	50 I	+	1/2	N
489	+	N	N	25	25	+	1/2	N
490	+	N	N	25	50 I	+	-	N
491	+	N	N	25	50 I	+	-	N
492	+	N	N	25	50 I	+	1/2	N
493	+	N	N	-	50	Inc	-	N
494	+	N	N	-	50	Inc	-	N
495	+	N	N	-	50	Inc	1/2	N
496	+	N	N	25 I	50	Inc	1/2	N
497	+	N	N	-	100 I	Inc	-	N
498	+	N	N	-	50	Inc	1/2	N
499	+	N	N	-	50	Inc	1/2	N
500	+	N	N	-	50	Inc	-	N
501	+	N	N	-	50	Inc	-	N
502	+	N	N	-	50	Inc	-	N
503	+	N	N	-	50	Inc	-	N
504	+	N	N	-	50	Inc	-	N
505	+	N	N	-	100	Inc	-	N
506	+	N	N	-	50	Inc	1/2	N
507	+	N	N	25 I	50	Inc	1/2	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
508	+	N	N	-	100	Inc	1/2	N
509	+	N	N	-	100	Inc	-	N
510	+	N	N	-	50	Inc	-	N
511	+	N	N	-	50	Inc	-	N
512	+	N	N	-	100	Inc	-	N
513	+	N	N	-	100	Inc	-	N
514	+	N	N	-	200 I	Inc	-	N
515	+	N	N	-	50	Inc	-	N
516	+	N	N	-	50	Inc	-	N
517	+	N	N	-	100 I	Inc	-	N
518	+	N	N	25 I	100 I	Inc	-	N
519	+	N	N	25 I	100 I	Inc	-	N
520	+	N	N	-	50	Inc	1/2	N
521	+	N	N	-	200	Inc	-	N
522	+	N	N	-	100	Inc	-	N
523	+	N	N	-	50	Inc	-	N
524	+	+	+	-	50	Inc	≥1/128	+
525	+	+	+	-	100 I	Inc	1/8	+
526	+	+	+	-	100 I	Inc	1/64	+
527	+	N	N	25 I	50	Inc	1/4	+
528	+	N	N	-	50	Inc	1/8	+
529	+	N	N	25 I	50	Inc	1/4	+
530	N	N	N	25 I	100	Inc	1/2	N
531	N	N	N	-	100 I	Inc	-	N
532	N	N	N	-	50	Inc	-	N
533	N	N	N	-	50	Inc	-	N
534	N	N	N	-	100 I	Inc	-	N
535	N	N	N	-	50	Inc	-	N
536	N	N	N	-	50	Inc	-	N
537	N	N	N	-	50	Inc	-	N
538	N	N	N	-	50	Inc	-	N
539	N	N	N	-	100 I	Inc	-	N
540	N	N	N	-	50	Inc	-	N
541	N	N	N	-	50	Inc	-	N
542	N	N	N	-	50	Inc	1/2	N
543	N	N	N	-	50	Inc	-	N
544	N	N	N	-	50	Inc	-	N
545	N	N	N	-	200	Inc	-	N
546	N	N	N	-	50	Inc	-	N

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
547	N	N	N	-	50 I	Inc	-	N
548	N	N	N	-	100 I	Inc	-	N
549	N	N	N	-	50	Inc	-	N
550	N	N	N	-	50	Inc	-	N
551	N	N	N	-	50	Inc	-	N
552	N	N	N	-	50	Inc	-	N
553	N	N	N	-	50	Inc	-	N
554	+	+	+	200 I	400	+	-	N
555	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	-	N
556	+	+	+	≥ 100	≥ 100	+	-	N
557	+	N	N	25 I	25	N	1/4	+
558	+	N	N	-	-	N	1/4	+
559	+	N	N	-	25	N	1/8	+
560	+	N	N	25 I	50 I	N	1/4	+
561	+	N	N	-	25	N	1/4	+
562	+	N	N	-	25	N	1/4	+
563	N	N	N	50 I	50 I	+	1/4	+
564	N	N	N	25	25	+	1/4	+
565	N	N	N	50	50	+	1/2	N
566	N	N	N	25	100	+	1/2	N
567	N	N	N	25	50 I	+	-	N
568	N	N	N	25	50 I	+	-	N
569	N	N	N	25 I	200 I	+	-	N
570	N	N	N	25	25	+	1/2-	N
571	N	N	N	25	50	+	-	N
572	N	N	N	25	25	+	1/2	N
573	N	N	N	25	25	+	1/2	N
574	N	N	N	25	50	+	1/2	N
575	N	N	N	25	50	+	1/2	N
576	N	N	N	25	25	+	1/2	N
577	N	N	N	25	25	+	1/2	N
578	N	N	N	25	50	+	1/2	N
579	N	N	N	25	50 I	+	-	N
580	+	N	N	50	100	+	1/4	+
581	+	N	N	50 I	50	+	1/8	+
582	+	N	N	25	50 I	+	1/8	+
583	+	N	N	50	50	+	1/16	+
584	+	N	N	25	25	+	1/8	+
585	+	N	N	50	50	+	1/16	+

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME				
586	+	N	N	100 I	100	+	1/8	+
587	+	N	N	50	50	+	1/8	+
588	+	N	N	50 I	50	+	1/16	+
589	+	N	N	50 I	100	+	1/4	+
590	+	N	N	25	50	+	1/4	+
591	+	N	N	25	50	+	1/4	+
592	+	N	N	25	25	+	1/4	+
593	+	N	N	100	200 I	+	1/64	+
594	+	N	N	100 I	200	+	1/64	+
595	+	N	N	50	100	+	1/8	+
596	+	N	N	50	50	+	1/8	+
597	+	N	N	50	100	+	1/8	+
598	+	N	N	25	25	+	1/4	+
599	+	N	N	25	25	+	1/8	+
600	+	N	N	25	50 I	+	1/8	+
601	+	N	N	50	100	+	1/8	+
602	+	N	N	50	100	+	1/16	+
603	+	N	N	50	50	+	1/16	+
604	+	N	N	25	50	+	1/4	+
605	+	N	N	25	50 I	+	1/8	+
606	+	N	N	25	100 I	+	1/16	+
607	+	N	N	25	100 I	+	1/8	+
608	+	N	N	50	100	+	1/32	+
609	+	N	N	200	200	+	1/32	+
610	+	N	N	50 I	50	+	1/8	+
611	+	N	N	100	200	+	1/16	+
612	+	N	N	50 I	100 I	+	1/8	+
613	+	N	N	50	100	+	1/64	+
614	+	N	N	25	50	+	1/4	+
615	+	N	N	50 I	100 I	+	1/8	+
616	+	N	N	50	200	+	1/8	+
617	+	N	N	50	100	+	1/8	+
618	+	N	N	50 I	50	+	1/4	+
619	+	N	N	25	25	+	1/8	+
620	+	N	N	50 I	100 I	+	1/4	+
621	+	N	N	25	50	+	1/4	+
622	+	N	N	25	25	+	1/8	+
623	+	N	N	25	50	+	1/4	+
624	+	N	N	50 I	50 I	+	1/4	+

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
625	+	N	N	25	100 I	+	1/4	+
626	+	N	N	25	25	+	1/4	+
627	+	N	N	25	25	+	1/4	+
628	+	N	N	25	50	+	1/4	+
629	+	N	N	25	50	+	1/8	+
630	+	N	N	25	50	+	1/4	+
631	+	N	N	25	50	+	1/8	+
632	+	N	N	25	100 I	+	¼	+
633	+	N	N	25	50	+	¼	+
634	+	+	N	25	25	+	1/8	+
635	+	+	N	50	100	+	1/8	+
636	+	+	N	50 I	50	+	1/4	+
637	+	+	N	50	100	+	1/16	+
638	+	+	N	25	50 I	+	1/4	+
639	+	+	N	25	50 I	+	1/4	+
640	+	+	N	25	50 I	+	1/4	+
641	+	+	N	50 I	50	+	1/8	+
642	+	N	N	50 I	50	+	1/8	+
643	+	N	N	50	50	+	1/16	+
644	+	N	N	25	50	+	1/8	+
645	+	N	N	100	100	+	1/8	+
646	+	N	N	100 I	100	+	1/16	+
647	+	N	N	25	50 I	+	¼	+
648	+	N	N	25	50	+	1/8	+
649	+	N	N	25	50	+	1/4	+
650	+	N	N	100 I	100	+	1/8	+
651	+	N	N	100 I	100	+	1/8	+
652	+	N	N	50	100 I	+	1/4	+
653	+	N	N	25 I	25	+	1/8	+
654	+	N	N	50 I	50	+	1/8	+
655	+	N	N	50	100	+	1/16	+
656	+	N	N	25	50 I	+	1/4	+
657	+	N	N	25	50	+	1/8	+
658	+	N	N	25	25	+	1/4	+
659	+	N	N	25	50	+	1/32	+
660	+	N	N	50	50	+	1/8	+
661	+	N	N	50	50	+	1/4	+
662	+	N	N	25	50	+	1/8 ir	+
663	+	N	N	100	100	+	1/4	+

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
664	+	N	N	100	200 I	+	1/32	+
665	+	N	N	25	25	+	1/8	+
666	+	N	N	25	25	+	1/8	+
667	+	N	N	25	50	+	1/4	+
668	+	N	N	50 I	50 I	+	1/8	+
669	+	N	N	25	25	+	1/8	+
670	+	N	N	50	50	+	1/8	+
671	+	N	N	25	50 I	+	1/8	+
672	+	N	N	50 I	50	+	1/4	+
673	+	N	N	50	100	+	1/16	+
674	+	N	N	50	100	+	1/8	+
675	+	N	N	50 I	100 I	+	1/4	+
676	+	N	N	50	100	+	1/8	+
677	+	N	N	50	50	+	1/8	+
678	+	N	N	25	50	+	1/4	+
679	+	N	N	25	50	+	1/4	+
680	+	N	N	25	50	+	1/4	+
681	+	N	N	50	100	+	1/8	+
682	+	N	N	25	50	+	1/8	+
683	+	N	N	25	50	+	1/4	+
684	+	N	N	25	25	+	1/4	+
685	+	N	N	25	25	+	1/4	+
686	+	N	N	25	50	+	1/8	+
687	+	N	N	50	50	+	1/4	+
688	+	N	N	25	50 I	+	1/4	+
689	+	N	N	25	100	+	1/4	+
690	+	N	N	50	50	+	1/32	+
691	+	N	N	25	50	+	1/16	+
692	+	N	N	50 I	100 I	+	1/32	+
693	+	+	+	100 I	100	+	1/16	+
694	+	+	+	100	200 I	+	1/16	+
695	+	+	+	100 I	100	+	1/16	+
696	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/256	+
697	+	+	+	50	50	+	1/16	+
698	+	+	+	50	100	+	1/16	+
699	+	+	+	100 I	100	+	1/8	+
700	+	+	+	50	100 I	+	1/16	+
701	+	+	+	100	200	+	1/8	+
702	+	+	+	100 I	100	+	1/16	+

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
703	+	+	+	200	200	+	1/64	+
704	+	+	+	200	≥ 400	+	1/64	+
705	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
706	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
707	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
708	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
709	+	+	+	200	200	+	1/64	+
710	+	+	+	200	400 I	+	1/64	+
711	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
712	+	+	+	100 I	200	+	1/64	+
713	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
714	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
715	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
716	+	+	+	100	100	+	1/64	+
717	+	+	+	100	100	+	1/64	+
718	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
719	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
720	+	+	+	100	200	+	1/32	+
721	+	+	+	50	100	+	1/32	+
722	+	+	+	200	200	+	≥1/256	+
723	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
724	+	+	+	100	100	+	1/32	+
725	+	+	+	100	200	+	≥1/256	+
726	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
727	+	+	+	200	200	+	1/32	+
728	+	+	+	400 I	≥ 400	+	1/128	+
729	+	+	+	400 I	≥ 400	+	1/64	+
730	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
731	+	+	+	50	100 I	+	≥1/256	+
732	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
733	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
734	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
735	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
736	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
737	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
738	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
739	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
740	+	+	+	200	≥ 400	+	1/64	+
741	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
742	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
743	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
744	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
745	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/256	+
746	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
747	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/256	+
748	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/256	+
749	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
750	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
751	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/256	+
752	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/256	+
753	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
754	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
755	+	+	+	200 I	400 I	+	1/64	+
756	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
757	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
758	+	+	+	200 I	200	+	1/32	+
759	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
760	+	+	+	50	50	+	1/16	+
761	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
762	+	+	+	100	200	+	1/32	+
763	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
764	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
765	+	+	+	200 I	≥ 400	+	1/64	+
766	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
767	+	+	+	100 I	100	+	1/16	+
768	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
769	+	+	+	200	200	+	1/64	+
770	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
771	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
772	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
773	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
774	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
775	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
776	+	+	+	50	100	+	≥1/128	+
777	+	+	+	100	100	+	1/16	+
778	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
779	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
780	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
781	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
782	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
783	+	+	+	100	100	+	1/16	+
784	+	+	+	200	400 I	+	1/64	+
785	+	+	+	100	200	+	1/32	+
786	+	+	+	400	400	+	≥1/128	+
787	+	+	+	200	200	+	1/64	+
788	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
789	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
790	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
791	+	+	+	200	400 I	+	1/16	+
792	+	+	+	200	200	+	1/64	+
793	+	+	+	400	400	+	1/128	+
794	+	+	+	200	200	+	1/32	+
795	+	+	+	100	200	+	1/8	+
796	+	+	+	200	200	+	1/64	+
797	+	+	+	100	200	+	1/16	+
798	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
799	+	+	+	200	200	+	1/32	+
800	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
801	+	+	+	200	≥ 400	+	1/32	+
802	+	+	+	100	200	+	1/32	+
803	+	+	+	200	200	+	1/64	+
804	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
805	+	+	+	100	200	+	1/64	+
806	+	+	+	200	200	+	1/64	+
807	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
808	+	+	+	200	200	+	1/32	+
809	+	+	+	100	200 I	+	1/64	+
810	+	+	+	100	200	+	1/128	+
811	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
812	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
813	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
814	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
815	+	+	+	100	200	+	1/32	+
816	+	+	+	100	200	+	1/32	+
817	+	+	+	200	≥ 400	+	1/32	+
818	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/16	+
819	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
820	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
821	+	+	+	100	200	+	1/16	+
822	+	+	+	200	≥ 400	+	1/64	+
823	+	+	+	100 I	100	+	1/16	+
824	+	+	+	200	200	+	1/32	+
825	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
826	+	+	+	100	200	+	1/16	+
827	+	+	+	400 I	≥ 400	+	1/64	+
828	+	+	+	50	100 I	+	1/8	+
829	+	+	+	100	100	+	1/16	+
830	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
831	+	+	+	200	≥ 400	+	1/64	+
832	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/16	+
833	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
834	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
835	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/32	+
836	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥1/128	+
837	+	+	+	100 I	200 I	+	≥ 1/128	+
838	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
839	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
840	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
841	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
842	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
843	+	+	+	50	100	+	1/16	+
844	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
845	+	+	+	200	200	+	1/128	+
846	+	+	+	50	100 I	+	1/8	+
847	+	+	+	100	200	+	1/16	+
848	+	+	+	100	100	+	1/16	+
849	+	+	+	200	200	+	1/32	+
850	+	+	+	100	200	+	1/32	+
851	+	+	+	200	200	+	1/64	+
852	+	+	+	50	50	+	1/8	+
853	+	+	+	50	100	+	1/4	+
854	+	+	+	100	≥ 400	+	1/32	+
855	+	+	+	100 I	100 I	+	1/16	+
856	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/16	+
857	+	+	+	100	200 I	+	1/16	+
858	+	+	+	200 I	200 I	+	1/32	+

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
859	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
860	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
861	+	+	+	100	200 I	+	1/32	+
862	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
863	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
864	+	+	+	400 I	400 I	+	1/64	+
865	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
866	+	+	+	400 I	≥ 400	+	1/128	+
867	+	+	+	200	≥ 400	+	1/128	+
868	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
869	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
870	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
871	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
872	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
873	+	+	+	100 I	200	+	1/64	+
874	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
875	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
876	+	+	+	400 I	≥ 400	+	≥ 1/128	+
877	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
878	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
879	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
880	+	+	+	400 I	≥ 400	+	≥ 1/128	+
881	+	+	+	100	200 I	+	≥ 1/128	+
882	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
883	+	+	+	100	200 I	+	≥ 1/128	+
884	+	+	+	200	400 I	+	1/64	+
885	+	+	+	100 I	400	+	≥ 1/128	+
886	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
887	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
888	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
889	+	+	+	100	200	+	1/32	+
890	+	+	+	50	100	+	1/16	+
891	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
892	+	+	+	50	100	+	1/32	+
893	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
894	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
895	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
896	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
897	+	+	+	25	25	+	1/128	+

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
898	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ /128	+
899	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
900	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
901	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ /128	+
902	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
903	+	+	+	100 I	100 I	+	1/8	+
904	+	+	+	200	200	+	1/64	+
905	+	+	+	50	100 I	+	1/16	+
906	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
907	+	+	+	100	200 I	+	1/32	+
908	+	+	+	100 I	200 I	+	1/8	+
909	+	+	+	100 I	200 I	+	1/16	+
910	+	+	+	50	100	+	1/8	+
911	+	+	+	200 I	200 I	+	1/16	+
912	+	+	+	200 I	200 I	+	1/32	+
913	+	+	+	100	100	+	1/64	+
914	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
915	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
916	+	+	+	200	200	+	1/64	+
917	+	+	+	50 I	50	+	1/64	+
918	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
919	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
920	+	+	+	100	200	+	1/16	+
921	+	+	+	400	800 I	+	1/16	+
922	+	+	+	-	25	+	1/64	+
923	+	+	+	25	50	+	1/32	+
924	+	+	+	50	50	+	1/64	+
925	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
926	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
927	+	+	+	100	100	+	1/8	+
928	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
929	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
930	+	+	+	200	200	+	1/64	+
931	+	+	+	50	100	+	1/16	+
932	+	+	+	100	200	+	1/32	+
933	+	+	+	400 I	≥ 400	+	≥ 1/128	+
934	+	+	+	100	400 I	+	1/64	+
935	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
936	+	+	+	400 I	≥ 400	+	1/128	+

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
937	+	+	+	100	100	+	1/32	+
938	+	+	+	200	200	+	1/128	+
939	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
940	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
941	+	+	+	100	200 I	+	1/128	+
942	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
943	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
944	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
945	+	+	+	100	100	+	1/16	+
946	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
947	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
948	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
949	+	+	+	100	200 I	+	1/64	+
950	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
951	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
952	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
953	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
954	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
955	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
956	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
957	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
958	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
959	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
960	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
961	+	+	+	100	200	+	1/32	+
962	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
963	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
964	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
965	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
966	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
967	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
968	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
969	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
970	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
971	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
972	+	+	+	200	400	+	1/64	+
973	+	+	+	100	100	+	1/32	+
974	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
975	+	+	+	200	200	+	1/64	+

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
976	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
977	+	+	+	200	200	+	1/32	+
978	+	+	+	200	200	+	1/32	+
979	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
980	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
981	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
982	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
983	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
984	+	+	+	200	≥ 400	+	1/64	+
985	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
986	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
987	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
988	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
989	+	+	+	100	200	+	1/32	+
990	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
991	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
992	+	+	+	100 I	100 I	+	1/32	+
993	+	+	+	200	200	+	≥ 1/128	+
994	+	+	+	100	200 I	+	1/32	+
995	+	+	+	100	200 I	+	1/32	+
996	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
997	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
998	+	+	+	200	200	+	1/64	+
999	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1000	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1001	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1002	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1003	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1004	+	+	+	200	200	+	1/64	+
1005	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
1006	+	+	+	100	100	+	1/16	+
1007	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1008	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1009	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1010	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1011	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
1012	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
1013	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
1014	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+

N°	AAT	AAT-RIV (8% vol.cel.)	AAT-RIV (4% vol.cel.)	2-ME			RFC	Interpr.
				ME	SAL	RES		
1015	+	+	+	200	200	+	≥ 1/128	+
1016	+	+	+	50	100 I	+	1/16	+
1017	+	+	+	100	200	+	1/32	+
1018	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1019	+	+	+	100 I	200	+	1/16	+
1020	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1021	+	+	+	50	100	+	1/16	+
1022	+	+	+	200	200	+	1/16	+
1023	+	+	+	200	400 I	+	1/32	+
1024	+	+	+	100	200	+	1/64	+
1025	+	+	+	200	200	+	1/32	+
1026	+	+	+	100 I	100	+	1/8	+
1027	+	+	+	100	100	+	1/16	+
1028	+	+	+	50	100	+	1/16	+
1029	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
1030	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
1031	+	+	+	100	100	+	1/8	+
1032	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/16	+
1033	+	+	+	50	100	+	1/8	+
1034	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
1035	+	+	+	100	200 I	+	1/8	+
1036	+	+	+	200	≥ 400	+	1/64	+
1037	+	+	+	100	200 I	+	1/16	+
1038	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/128	+
1039	+	+	+	100	100	+	1/16	+
1040	+	+	+	100 I	100	+	1/4 ir	+
1041	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1042	+	+	+	100	100	+	1/16	+
1043	+	+	+	200	200	+	1/16	+
1044	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1045	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/32	+
1046	+	+	+	50	100	+	1/8	+
1047	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1048	+	+	+	100 I	100	+	1/16	+
1049	+	+	+	100 I	100	+	1/16	+
1050	+	+	+	100 I	100	+	1/16	+
1051	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	1/64	+
1052	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+
1053	+	+	+	≥ 400	≥ 400	+	≥ 1/128	+

