

LÍLIA M. SILVA PAULIN

**Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas  
para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em  
búfalos (*Bubalus bubalis*)**

T.1712  
FMVZ



São Paulo

2006

LÍLIA M. SILVA PAULIN

DEDALUS - Acervo - FMVZ



11300028875

**Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

**Co-Orientador:**

Prof. Dr. Luis Ernesto Samartino

São Paulo

2006

1015647

N.º CLASSIFICAÇÃO
T. 1712
FMVZ
N.º TOMBO
025759

AYANO 1550555

Nome: PAULIN, Lília M. Silva

Título: **Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: 7, 7, 06

## Banca Examinadora

Prof. Dr. Jon S.F. Muf  
Julgamento: aprovado

Instituição: FMV - USP  
Assinatura: Junior M

Prof. Dr. Luis SAMARTINS  
Julgamento: APROVADA

Instituição: UNESP - JABOTICABAL  
Assinatura: [assinatura]

Prof. Dr. Luis ANTONIO MATHIAS  
Julgamento: APROVADA

Instituição: FCAV - UNESP - JABOTICABAL  
Assinatura: L. A. F. Mathias

Prof. Dr. Liliana Arnuda Staroncello  
Julgamento: aprovado

Instituição: FMV Z - USP  
Assinatura: [assinatura]

Prof. Dr. FERNANDO FERREIRA  
Julgamento: aprovado

Instituição: FMV - USP  
Assinatura: [assinatura]

## DEDICATÓRIAS

---

Aos meus pais Paulo (*in memoriam*) e Orieta, por tudo que conseguiram fazer, com o pouco que dispunham. *Por todos os seus sacrifícios pessoais em benefício de nós cinco. Nós amamos vocês.*

*Todas as lutas, todas as alquimias,  
Todas as lágrimas, todas as orações,  
Todas as frustrações, todas as alegrias,  
Todas as abdições, todas as fantasias.  
E, principalmente,  
Por todas as noites e dias,  
Que passaram,  
Velandando por nós.*

*"O Amor é a Força mais sutil do mundo".*

*(Mestre Mahatma Gandhi)*

---

Aos meus irmãos Joceli, Márcio, Mirian e Paulinho.  
*Especialmente à mãezinha Jô.*

*"Nunca é tarde para você ser aquilo que poderia ter sido".*

*(Sir Winston Churchill)*

*"Love is all you need."*

*(Lennon & McCartney)*

---

Ao meu filho Thales Ariel, *pela bênção Divina de ser sua mãe.*

*Criança do semblante puro e desanuviado e olhos sonhadores de maravilhas! Ainda que o tempo se escoe e eu e tu tenhamos sido separados por metade de uma vida, teu sorriso adorável certamente evocará, para sempre em mim, o dom do Amor de um conto de fadas.*

*"Um coração feliz é o resultado inevitável de um coração ardente de Amor". (Madre Tereza de Calcutá)*

À minha filha Rachael (*in memoriam*)

∞

---

A Luis por su amor, paciencia y ternura.

*\*"Ahora ya no puedo decir,  
Que jamás conocí a ese alguien, a ese  
Alguien que tan solo con pronunciar una palabra,  
Hace síntesis la inmensidad  
Del mundo y que acerca,  
Hasta hacer casi tangible, lo que oculta,  
Profundo, una mirada.*

*Desde acá hasta allá, muchas felicidades, con gran afecto, reconocimiento y infinita gratitud".*

*(M.L.C.)*

\*Poesía con "enjambement", extraída de folletos anexos en los invernáculos del Jardín Botánico en Buenos Aires que yo llamo, afectuosamente, de Parque de los gatos. Un local especial en mi corazón, reducto de artistas, intelectuales, viejos, vagos, decenas plantas y gatos, que encuentran la belleza, la quietud, la simplicidad y la elegancia de la vida; adonde disfrutan de un ratito de paz. BsAs, 14/05/2006.

## AGRADECIMENTOS

---

A *Jesus, Maria* e os *anjos*, por tomarem conta de mim todos os momentos da minha vida. Cristo é meu *Rei*, meu Pastor, minha Luz, meu Porto e meu Amparo. O *kardecismo* é meu barco.

*"To live, it is to fight against little devils, concealed in the recondite of your mind and of your heart".*

*(Henrik Ibsen)*

*"Na profundidade do inverno, finalmente aprendi que existe em mim um invencível verão".*

*(Albert Camus)*

---

Ao Prof. Dr. **Pietro** Sampaio Baruselli, ao Dr. **Nélcio** A.T. de Carvalho (e toda a equipe), pela colaboração na colheita das amostras de campo.

Às camaradas do LDBR<sup>4</sup> **Antera** Ferreira, **Eliana** Scarcelli, **Fabiola** Campos, **Maria** Martins, **Maristela** Cardoso, **Rosa** Piatti, **Simone** Miyashiro (**JB**), **Solange** Teixeira, **Tatiana** Gotti e **Vanessa** Castro. *Por tudo!*

*"Toda vida existe para iluminar o caminho de outras vidas que a gente encontrar"*

*(Milton Nascimento e Fernando Brant)*

Especialmente aos meus queridos "filhinhos" Ana C. Teixeira (**Aninha**), **Igor** S.P. Federsoni, Wanessa de A. Pacheco (**Wanessinha**) e **Carolina** P. Campelo (LDBR)<sup>4</sup>. *Pelo apoio profissional e espiritual. Eu rejuvenesço com vocês!*

*"Trate as pessoas da forma como elas devem ser e ajude-as a se tornarem o que elas são capazes de ser".*

*(Johann Wolfgang von Goethe)*

---

A las chicas **Estela** Piazza e **Marina** Schurst. Especialmente a amiga **Sandra** Conde (IP/CICVA/INTA)<sup>3</sup>. *Por la amistad, disponibilidad, simpatía y valiosa colaboración nos trabajos prácticos de esta tesis.*

*"Eu vejo um novo começo de Era, de gente fina, elegante e sincera, com habilidade pra dizer mais sim do que não"*

*(Lulu Santos)*

---

Aos animais.

Especialmente aos meus gatos (*Felis catís*), que trouxeram e têm trazido bálsamo à minha vida: Chica, Beleza, Bela, Lulu, Mrs. Frodo, Shiva e Chita. E a esses seres magníficos, os búfalos (*Bubalus bubalis*).

*"O menor dos felinos é uma obra prima".*

*(Leonardo da Vinci)*

*"Eis meu búfalo pronto para sair à procura de Amigos ,  
Num mundo enfasiado que já não crê nos Bichos."*

*(Adaptado de Carlos Drummond de Andrade)*

---

*"Depende de você,*

*Trazer para a vida que está entrando (...)  
Uma alegria de verdadeira fé religiosa."*

*(Papa Leão XIII)*

*Depende de você*

## AGRADECIMENTOS

---

*A todos os meus mestres.*

*Especialmente ao meu orientador Prof. Dr. José S. Ferreira Neto<sup>1</sup> (Zezé), ao meu co-orientador Prof. Dr. Luis E. Samartino<sup>3</sup>, a Dra. Margareth E. Genovez<sup>4</sup>, ao Prof. Dr. Luis A. Mathias<sup>5</sup> e ao Prof. Dr. Sílvio A. Vasconcelos<sup>1</sup>.*

*Por seus exemplos de tranqüilidade, simplicidade, determinação, disciplina e equilíbrio.  
Pela colaboração, apoio e amizade.*

---

*Às Instituições as quais tive o privilégio de freqüentar*

**À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SÃO PAULO, onde me graduei em 31 de julho de 1988.**

**Ao INSTITUTO ADOLFO LUTZ<sup>2</sup>, onde cursei Especialização em Laboratório Médico em 1991.**

**Ao INSITUTO BIOLÓGICO, onde ingressei em outubro de 1991 como Médica Veterinária; passei a Assistente Técnica de Pesquisa em outubro de 1992 e, desde fevereiro de 1997, ocupo o cargo de Pesquisadora Científica, atualmente nível V.**

**Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, onde ingressei em março de 1998.**

**Ao Laboratório de Brucelose, Instituto de Patobiologia/CICVyA - INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUÁRIA, com quem trabalho desde outubro de 2002.**

*“O verdadeiro segredo da satisfação reside na doação, único meio de se alcançar à imortalidade. Abdicar do que se obtém é uma lei da Vida (...). As riquezas conquistadas devem ser voltadas ao Todo. Riqueza não inclui apenas bens materiais, mas qualquer outra forma de conquista, incluindo conhecimento (...) e outras formas de arte. O conhecimento que você adquire (...) deve ser difundido. Por essa partilha sua educação se enriquece e você alcança um propósito. Se o seu conhecimento não se difunde, ele se torna inútil.*

*ISSO SIGNIFICA QUE, QUANTO MAIS VOCÊ DOA, MAIS VOCÊ CRESCE.” .*

*(Avatar Sathya Sai Baba)*

---

1: Docente, Titular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP).

2: Laboratório Regional de Ribeirão Preto - INSTITUTO ADOLFO LUTZ, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

3: Pesquisador Científico e docente, Coordenador da Área de Sorologia e Bacteriologia do Instituto de Patobiologia – Centro de Investigações em Ciências Veterinárias e Agronômicas (CICVyA) - Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA) – Castelar, Buenos Aires, Argentina.

4: Pesquisadora Científica VI – Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução (LDBR), Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal (CPDSA), INSTITUTO BIOLÓGICO, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA).

5: Docente, Titular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade do Estado de São Paulo “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

1: Docente, Titular do Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP).

*"Um sentido do dever foi minha única intenção,  
E uma beleza distinta foi minha própria invenção.*

*Orgulho? Uma recusa talvez orgulhosa e,*

*Eu recuso,*

*A necessidade da sua aprovação.*

*Há gente procurando demais,*

*Há faróis de menos.*

*Mesmo assim e por isso,*

*Através da neblina,*

*Prosequiremos iluminando."*

*(Adaptado de Echo & The Bunnymen)*

*"There's nothing you can do that can't be done.*

*Nothing you can sing that can't be sung.*

*Nothing you can say but you can learn how to play the game*

*There's nothing you can make that can't be made.*

*No one you can save that can't be saved.*

*Nothing you can do but you can learn how to be in time*

*There's nothing you can know that isn't known.*

*Nothing you can see that isn't shown.*

*Nowhere you can be that isn't where you're meant to be.*

*It's easy.*

*All you need is love, all you need is love,]*

*All you need is love, love, love is all you need."*

*(Lennon & McCartney)*

*Depende de você*

Ribeirão Preto, 25 de agosto de 1963, 21:00 horas.

O coelho Branco colocou os óculos e perguntou: “- Com a licença de Vossa Majestade, por onde devo começar?”

O Rei respondeu, com um ar grave: - Comece pelo início e continue até o fim. Então, pare”.

*(Texto extraído do inolvidável livro de Lewis Carroll, Alice no país das maravilhas)*

São Paulo, 07 de julho de 2006, 14:00 horas.

*“Resta, acima de tudo, essa capacidade de ternura,  
Essa inércia cada vez maior diante do infinito,  
Essa lenta decomposição dia a dia registrada, procurando...*

*esta esse coração queimando como um círio numa catedral em ruínas.*

*Resta esse sentimento da infância subitamente desentranhado de pequenos absurdos cotidianos.*

*Resta essa distração, essa disponibilidade, essa coragem de comprometer-se sem necessidade.*

*E essa impressionante e desnecessária paciência,*

*E essa faculdade incoercível de sonhar, de transfigurar a realidade,*

*E essa visão ampla dos acontecimentos, essa depressão diante da rotina.*

*Resta essa pequena luz indecifrável a que os poetas tomam por esperança.*

*Resta, esse constante esforço para caminhar dentro do Labirinto,*

*E esse eterno levantar-se depois de cada queda.*

*Resta essa coragem indizível diante do grande medo,*

*E ao mesmo tempo esse terrível medo infantil de ter pequenas coragens.*

*Resta esse desejo inútil de refletir-se em olhares sem curiosidade e sem memória.*

*Resta*

*Essa fidelidade ao seu homem e ao seu tormento.*

*Resta esse eterno morrer na cruz de seus braços,*

*E esse eterno ressuscitar para tornar a ser crucificada.*

*Resta esse fascínio pelo momento a vir, quando, emocionado,*

*Ele virá me abrir a porta como um velho amante,*

*Sem suspeitar,*

*Que é o meu mais novo namorado”.*

*(Adaptado do poema “O haver” de Marcus V. de Moraes)*

*“Você verá que é mesmo assim, que a história não tem fim. Continua sempre o que você responde sim à sua imaginação.*

*A arte de sorrir Cada vez que o mundo diz não”.*

*(Guilherme Arantes)*



## RESUMO

PAULIN, L. M. S. **Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*)**. [Study of serological techniques for diagnosis of *Brucella abortus* infection in buffaloes (*Bubalus bubalis*)]. 2006. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Tendo em vista a importância da bubalinocultura como fonte de proteína para o Brasil e também do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose para a evolução das cadeias produtoras de bovinos e bubalinos e, devido à escassez de estudos sobre o sorodiagnóstico da brucelose na espécie bubalina, procedimento no qual se apóia o processo de certificação de rebanhos livres e monitorados, o presente estudo objetivou comparar o desempenho de diferentes testes para o sorodiagnóstico da brucelose nessa espécie. Soros de 696 fêmeas bubalinas adultas foram submetidos aos testes qualitativos BPA, AATE, AAT e quantitativos: SRP, SLT, ELISAI, ELISAC, PF e ME e FC. Foi empregada, *gold standard*, a combinação de dois testes, FC e ME, considerando dois critérios: a) animais positivos para os reagentes na FC (título $\geq$ 20UI) e no ME (critério para fêmea vacinada) e como negativos os animais não reagentes na FC (título $<$ 20UI) e no ME; b) animais positivos os reagentes na FC (título $\geq$ 20UI) e no ME (critério para fêmea não vacinada) e negativos os não reagentes na FC (título $<$ 20UI) e no ME. Esta consideração foi necessária em função dos animais não apresentarem histórico de vacinação confiável o que interfere na determinação do ponto de corte a ser utilizado no teste ME de animais vacinados e não vacinados. Desta forma, numa primeira análise todos os animais foram avaliados no ME como vacinados e em outra como não vacinados. Com base nesses resultados, foi construída a curva ROC para todos os testes quantitativos (SRP, SLT, ELISAC, ELISAI e PF). Com os resultados dessa análise estabeleceu-se pontos de corte que otimizam os valores de sensibilidade e especificidade relativas para cada teste. Esses valores foram utilizados para o cálculo do índice de concordância Kappa para cada teste, incluindo os qualitativos. Concluiu-se que: a) os resultados dos estudos com os testes de ELISAC e PF em bovinos podem ser inferidos para bubalinos com razoável segurança; b) devem ser estabelecidos pontos de corte específicos para búfalos para o SLT, o SRP e o ELISAI; c) as melhores combinações de sensibilidade e especificidade relativas foram alcançadas pelo ELISAC, o PF, o BPA e o AAT; d) os melhores resultados de Kappa foram verificados para o ELISAC (kappa), PF, BPA, AATE e AAT; e) o BPA, AAT e AATE são os melhores testes para o sorodiagnóstico de triagem em bubalinos e o ELISAC e o PF são os mais promissores testes confirmatórios nessa espécie, já que ganhos adicionais de especificidade podem ser alcançados pelo aumento do ponto de corte.

Palavras-chave: Brucelose. Sorodiagnóstico. Búfalos

## ABSTRACT

PAULIN, L. M. S. Study of serological techniques for diagnosis of *Brucella abortus* infection in buffaloes (*Bubalus bubalis*). [Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*)]. 2006. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Considering the importance of the buffalo as a protein source in Brazil and the National Program of Brucellosis and Tuberculosis Control and Eradication for the evolution of the bovine and bubaline sector, and also due to the few number of studies on serological diagnosis of brucellosis in this specie, procedure that supports the process of certification of brucellosis free herds, the present study aimed to compare different serological tests for brucellosis diagnosis on buffaloes. Serum samples from 696 adult bubaline females had been analyzed to BPA, AATE, AAT (qualitatives), SRP, SLT, ELISAI, ELISAC, PF and ME and FC (quantitatives). The combination of two tests, FC and ME was used as reference, considering two criteria: a) positive animals: reactors for the FC (titer  $\geq 20\text{UI}$ ) and ME (vaccinated females), negative animals: no reactors for the FC (titer  $< 20\text{UI}$ ) and ME (vaccinated females); b) positive animals: reactors for the FC (titer  $\geq 20\text{UI}$ ) and ME (not vaccinated females), negative animals: no reactors for the FC (titer  $< 20\text{UI}$ ) and ME (not vaccinated females). It was necessary because was not possible to guarantee the true vaccination status of the animals. The first step was performing the ROC analysis for all the quantitative tests (SRP, SLT, ELISAC, ELISAI and PF), and so the relative sensitivity and specificity and the Kappa were calculated for each test. Conclusions: a) the cut offs of ELISAC and PF tests proposed for bovines can be used for bubalines with reasonable security; b) specific cut offs for buffaloes to be used in SLT, SRP and ELISAI must be established; c) the best relative sensitivity and specificity had been reached by the ELISAC, PF, BPA and AAT; d) the best results of the Kappa had been reached by ELISAC (kappa), PF, BPA, AATE and AAT; e) BPA, AAT and AATE are the best screening diagnosis test for bubalines and ELISAC and PF are the most promising confirmatory tests for this species.

Key words: Brucellosis. Serological diagnosis. Buffaloes

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Curva ROC para o teste SRP, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	43
Figura 2	Curva ROC para o teste SLT, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	44
Figura 3	Curva ROC para o teste ELISAC, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	45
Figura 4	Curva ROC para o teste da ELISAI, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste da FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	47
Figura 5	Curva ROC para o teste PF, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	48
Figura 6	Curva ROC para o teste da SRP, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste da FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	52
Figura 7	Curva ROC para o teste SLT, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	53
Figura 8	Curva ROC para o teste da ELISAC, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste da FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	53
Figura 9	Curva ROC para o teste ELISAI, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	55
Figura 10	Curva ROC para o teste PF, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de sensibilidade e especificidade relativas, segundo o título de anticorpos para o teste SRP gerados pela análise ROC, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 --	44
Tabela 2	Valores de sensibilidade e especificidade segundo o título de anticorpos para o teste SLT gerados pela análise ROC, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	44
Tabela 3	Valores de sensibilidade e especificidade segundo porcentagem de positividade (PP) para o teste ELISAC gerados pela análise ROC, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 ---	46
Tabela 4	Valores de sensibilidade e especificidade segundo porcentagem de positividade (PP) para o teste ELISAI gerados pela análise ROC, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 ---	47
Tabela 5	Valores de sensibilidade e especificidade segundo unidades de minipolarização (mP) para o teste PF gerados pela análise ROC, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 --	45
Tabela 6	Interpretação do teste Kappa segundo Landis e Koch (1977). São Paulo, 2006 -----	50
Tabela 7	Resultados do teste de ELISAC frente à combinação dos testes de FC e ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	50
Tabela 8	Resultados do teste de ELISAI frente à combinação dos testes de FC e ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	50
Tabela 9	Resultados do teste PF frente à combinação dos testes de FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006-----	50
Tabela 10	Resultados do teste de SLT frente à combinação dos testes de FC e ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	51
Tabela 11	Resultados do teste de SRP frente à combinação dos testes FC e ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	51
Tabela 12	Resultados do teste de AAT frente à combinação dos testes de FC e ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	51
Tabela 13	Resultados do teste de AATE frente à combinação dos testes de FC e ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	51
Tabela 14	Resultados do teste de BPA frente à combinação dos testes de FC e ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006 -----	51
Tabela 15	Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo o título de anticorpos para o teste da SRP gerados pela análise ROC, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	52
Tabela 16	Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo o título de anticorpos para o teste SLT gerados pela análise ROC, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	53

## LISTA DE TABELAS. CONTINUAÇÃO

Tabela 17	Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo porcentagem de positividade (PP) para o teste ELISAC gerados pela análise ROC, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006-----	54
Tabela 18	Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo porcentagem de positividade (PP) para o teste da ELISAI gerados pela análise ROC, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	55
Tabela 19	Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo unidades de minipolarização (mP) para o teste da PF gerados pela análise ROC, considerando como <i>gold standard</i> a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	57
Tabela 20	Resultados do teste de ELISAC frente à combinação dos testes FC e ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	58
Tabela 21	Resultados do teste de ELISAI frente à combinação dos testes FC e ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	58
Tabela 22	Resultados do teste de PF frente à combinação dos testes FC e ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	58
Tabela 23	Resultados do teste de SLT frente à combinação dos testes FC e ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	58
Tabela 24	Resultados do teste de SRP frente à combinação dos testes FC e ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	58
Tabela 25	Resultados do teste de AAT frente à combinação dos testes FC e ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	59
Tabela 26	Resultados do teste de AATE frente à combinação dos testes FC e ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	59
Tabela 27	Resultados do teste de BPA frente à combinação dos testes FC e ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006 -----	59
Tabela 28	Pontos de corte dos testes sorológicos quantitativos para diagnóstico da brucelose bubalina, segundo os dois critérios de composição dos <i>gold standards</i> . São Paulo, 2006-----	59
Tabela 29	Valores de sensibilidades (Sr) e especificidades (Er) relativas dos testes sorológicos quantitativos para diagnóstico da brucelose bubalina, segundo os dois critérios de composição dos <i>gold standards</i> e segundo os pontos de corte originais dos testes. São Paulo, 2006-----	60
Tabela 30	Valores de sensibilidades (Sr) e especificidades (Er) relativas dos testes sorológicos qualitativos para diagnóstico da brucelose bubalina, segundo os dois critérios de composição dos <i>gold standards</i> . São Paulo, 2006 -----	60
Tabela 31	Valores de Kappa dos testes sorológicos quantitativos para diagnóstico da brucelose bubalina, segundo os dois critérios de composição dos <i>gold standards</i> . São Paulo, 2006-----	61
Tabela 32	Resultados dos testes sorológicos para diagnóstico da brucelose em fêmeas bubalinas adultas, vacinadas com B19 na idade recomendada. São Paulo, 2006 ---	80

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Exemplos sensibilidades e especificidades relativas elevadas, expressas em porcentagem, dos testes utilizados no sorodiagnóstico da brucelose bovina. São Paulo, 2006 -----	35
----------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS\*

$\alpha$ -D-Rhap4Nfo	- Monossacarídeo 4,6-dideoxi-4-formamido- $\alpha$ -D-manose
$\mu$ L	----- Microlitros
ME	----- Teste do 2-mercaptoetanol
AAT	----- Teste do antígeno acidificado tamponado
BPA	----- Teste do antígeno brucélico ácido tamponado para prova rápida em placa
CEPANZO	----- Centro Panamericano de Zoonoses.
CICVyA	----- Centro de Investigações em Ciências Veterinárias e Agronômicas
CO	----- Cadeia O
ELISAC	----- Teste imunoenzimático ELISA competitivo
ELISAI	----- Teste imunoenzimático ELISA indireto
EUA	----- Estados Unidos da América
FC	----- Teste de fixação do complemento
<i>Gold standard</i>	-- Resultado obtido frente aos dois testes considerados como referência. Padrão sorológico
INTA	----- Instituto de Tecnologia Argentina
LA	----- Lipídeo A
LPS	----- Estrutura lipopolissacáride da parede das bactérias Gram-negativas
M	----- Molar
ML	----- Mililitros
MM	----- Milimolar
mM	----- Micrômetros
MP	----- Unidades de millipolarização
OMS	----- Organização Mundial de Saúde
PP	----- Percentagem de positividade
RBT	----- Teste do rosa bengala
ROC	----- <i>Receiver operating characteristic</i> – receptor de característica operacional
SENASA	----- Serviço Nacional de Sanidade Animal da Argentina
SLT	----- Teste da soroaglutinação lenta em tubos
SRP	----- Teste da soroaglutinação rápida em placa

---

\*Disposta por ordem alfabética crescente

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO -----	16
2	OBJETIVO -----	36
3	MATERIAL E MÉTODOS -----	37
3.1	Delineamento experimental -----	37
3.2	Animais e amostras -----	37
3.3	Laboratórios -----	38
3.4	Antígenos -----	38
3.5	Protocolos dos testes -----	39
4	TRATAMENTO DOS DADOS -----	42
5	RESULTADOS -----	43
6	DISCUSSÃO -----	62
7	CONCLUSÕES -----	70
	REFERÊNCIAS -----	71
	APÊNDICE -----	80



## 1. INTRODUÇÃO

O búfalo indiano, ou doméstico, pertence ao gênero *Bubalus*, espécie *bubalis*, a qual é dividida em dois grupos principais: o *Bubalus bubalis* sp., com 50 pares de cromossomos, conhecido como búfalo de rio, e o *Bubalus bubalis* variedade kerebau, denominado búfalo do pântano ou Carabao, com 48 pares de cromossomos. Existem 19 raças de búfalos, a Carabao representa uma delas e é utilizada para trabalho de campo e produção de carne. As 18 restantes, todas pertencentes à espécie *Bubalus bubalis*, são representadas pelos búfalos de rio, e possuem dupla aptidão (produção de carne e leite). Dezesesseis (Murrah, Jafarabadi, Surti, Nagpuri, Mili-Ravi, Kundi, Meshana, Pandharpuri, Manda, Jerangi, Kalahandi, Sambalpur, Bhadawari, Tharai, Toda e South Kanara) têm origem no continente indo-paquistanes, porém totalizando somente 20% da população bubalina dessa região. A maioria (80%) é constituída por búfalos sem raça definida, ou “Desi”. A raça Mediterrânea originou-se da Surti e recebeu esse nome por ter sido levada para o sul da Europa e selecionada para produção leiteira há mais de 2.000 anos. Hoje, a raça é considerada patrimônio italiano. Resultados de escavações arqueológicas realizadas na Índia evidenciaram fósseis de búfalos datados de 60.000 anos antes de Cristo (A.C.). Estima-se que o búfalo tenha sido domesticado em torno do ano 3.000 A.C. no Vale de Indus, na Índia, na região de Ur, no Iraque, e na China. Do continente asiático foi levado para a África e depois para a Europa, Oceania e, recentemente, para a América (BUBBALIFE, 2005).

Búfalos são animais dóceis, rústicos, precoces, longevos e produzem tanto leite quanto carne, além de serem utilizados no trabalho de campo. Atualmente, são criados em várias regiões do mundo, com destaque para Índia, Itália e Brasil (BARUSELLI, 1993; MARQUES; CARDOSO, 1997). Estão presentes em todos os países americanos, à exceção do Chile e

Canadá. Estima-se que a população bubalina em nosso continente seja de cerca de 3.800.000, dos quais 3.500.000 encontram-se no Brasil, 150.000 na Venezuela, 50.000 na Argentina, 30.000 na Colômbia e o restante distribuído pelos outros países América (BUBBALIFE, 2005). No Brasil, os búfalos foram importados da Austrália, do Egito, da Índia, da Itália e do sudoeste asiático e introduzidos pela ilha de Marajó, em 1895, onde encontraram condições ótimas para sua adaptação (MARQUES; CARDOSO, 1997).

Os búfalos são pouco seletivos em relação às forrageiras e transformam alimentos que não são normalmente consumidos por outros animais do mesmo porte em proteínas nobres (MARQUES; CARDOSO, 1997). Além disso, podem ser criados em regiões topográficas impróprias para bovinos, como várzeas inundáveis do rio Amazonas, baixadas litorâneas como o Vale do Ribeira – São Paulo, Pantanal Mato-grossense e banhados da região Sul (BARUSELLI, 1993; MARQUES; CARDOSO, 1997). Essas características peculiares têm despertado o interesse dos pecuaristas, fazendo com que, na última década, a bubalinocultura crescesse a uma taxa de 12,7% ao ano, ganhando cada vez mais importância econômica, tanto na produção de carne quanto de leite, colocando o Brasil como detentor do quinto maior rebanho comercial do mundo (MARQUES; CARDOSO, 1997). O rebanho bubalino brasileiro concentra-se principalmente na região Norte do país (65% do efetivo total), distribuído entre as raças Carabao, Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo (JORGE, 2000).

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos refere que a carne de búfalos contém 40% menos colesterol, 55% menos calorias, 11% mais proteínas e 10% mais minerais que a carne bovina, e o leite apresenta menor teor de colesterol, maior teor de gordura e mais proteínas, significando maior rendimento na produção de queijo e manteiga, sendo seu principal produto a mussarela (TONHATI, 1997; JORGE, 2000).

Embora no passado tenha-se atribuído ao búfalo uma maior resistência às várias doenças que acometem os bovinos, hoje, com o avanço dos estudos na espécie bubalina,

verifica-se que essa afirmação era desprovida de base científica. Por serem animais de produção, as doenças zoonóticas que também apresentam impacto negativo na produção têm especial importância para a espécie. Em búfalos, dentre essas doenças destacam-se a leptospirose e a brucelose, pois além de zoonóticas causam os mesmos problemas reprodutivos verificados em bovinos (FAINE et al., 1999), resultando em diminuição da produção de carne e leite. Pelo fato da brucelose ser um dos clássicos exemplos de antropozoonose com ampla comprovação de seu impacto na produção, tornou-se alvo de programas em massa desencadeados por vários países desde o início do século XX e hoje significa uma barreira para o comércio internacional de animais e seus produtos (OIE, 2005).

A brucelose é uma antropozoonose infecto-contagiosa de evolução geralmente crônica e caráter granulomatoso difuso, caracterizada pela infecção das células do sistema mononuclear fagocitário, provocada por uma bactéria intracelular facultativa pertencente ao gênero *Brucella*. Nos animais compromete, sobretudo, os sistemas reprodutivo e osteo-articular, ocasionando com frequência abortamento no terço final da gestação. No homem, os sintomas mais frequentes são aqueles comumente observados nos quadros de infecções generalizadas (CARTER & CHENGAPPA, 1991; METCALF et al., 1994).

Em 1859, Marston caracterizou a doença como entidade nosológica autônoma quando contraiu brucelose na ilha de Malta, situada ao sul da Sicília, Itália. Descreveu, pela primeira vez, uma “febre gástrica renitente” como principal sintoma da doença. Considera-se, no entanto, que a brucelose tenha sido descoberta pelo australiano David Bruce, em 1887. Bruce isolou a bactéria do baço de um soldado que morrera em consequência da doença que grassava na base naval inglesa da Ilha de Malta, denominada então de “febre de Malta”. Baseando-se nas características coloniais e microscópicas, denominou a bactéria *Micrococcus melitensis*. “*Micrococcus*”, porque observou um agente pequeno e curto, e “*melitensis*”, em homenagem à ilha. Melita é o nome em latim para Malta que, em grego, língua corrente local,

significa “do mel” (adaptado de PACHECO; MELLO, 1956). Em 1897, Bang e Stribolt, na Dinamarca, isolaram e identificaram, pela primeira vez, a brucela em vacas que abortaram, denominando-a *Bacillus abortus bovis*. O sinal foi reproduzido em novilhas gestantes infectadas experimentalmente. Nesse mesmo ano, Wright & Smith desenvolveram o teste de Wright ou teste da soroaglutinação lenta em tubos (SLT) para o sorodiagnóstico da septicemia causada pelo *M. melitensis*. Em 1905, Zammit concluiu que o leite oriundo das cabras de Malta era meio de transmissão para humanos, fato que levou à proibição do consumo do produto no Reino Unido, em 1906. Após um ano dessa resolução, constatou-se forte redução nas mortes de soldados britânicos. Em 1918, Alice Evans identificou, pela primeira vez, a brucelose em humanos nos EUA e concluiu que as bactérias isoladas de caprinos, bovinos e humanos eram similares. Em 1920, Meyer e Shaw criaram o gênero *Brucella* (PACHECO; MELLO, 1956).

Em 1994, ROSS et al. (Reino Unido) e EWALT et al. (EUA) isolaram, a partir de mamíferos marinhos, um grupo de brucelas distinto das espécies conhecidas, então referido como *B. maris*, que possui vasta gama de hospedeiros e, devido à ocorrência de um acidente de laboratório, é considerada zoonose (BREW et al., 1999). Cloeckert et al. (2001) verificaram diferenças moleculares entre os isolados e propuseram classificá-los em duas espécies: a *B. pinnipediae*, correspondente a isolados de pinípedos (focídeos e otariídeos) e a *B. cetaceae* (isolados de cetáceos).

No Brasil, a brucelose bovina é conhecida desde 1914, quando Danton Seixas diagnosticou clinicamente a doença no Rio Grande do Sul. Porém o primeiro estudo com base em resultados de pesquisas epidemiológicas e exames microscópicos do isolado de fetos abortados foi feito por Tinécio Icibaci em 1922, que descreveu um foco de brucelose bovina em São Carlos - SP (BRASIL, 1988).

Atribui-se a Zaki, no ano de 1948, o primeiro isolamento da *B. abortus* em leite de

búfala (GENTILE, 1957). No Brasil, a ocorrência da brucelose em búfalos foi relatada por Santa Rosa et al. (1969), que reportaram 27 de 66 búfalos retores ao teste da soroaglutinação rápida em placa - SRP (40,9%); porém foram Ogassawara et al. (1969) quem, primeiramente, isolaram a *B. abortus* de higroma articular observado em búfala (Mathias et al., 1998).

As perdas econômicas provocadas pela brucelose em bovinos já estão bem caracterizadas e são decorrentes de abortamentos, pioras dos índices reprodutivas, perda de prestígio para as propriedades-foco, menor valor dos animais e produtos provenientes de áreas acometidas e perda de mercados potenciais (FAO, 2005). Atribui-se à doença uma diminuição da produção de carne entre 10 e 15%, queda de 10 a 24% na produção leiteira, dilatação do intervalo entre partos de 11,5 para 20 meses, queda de 15% nos nascimentos e sobrevivência dos produtos e aumento na taxa de reposição dos animais em cerca de 30% (GARCIA CARRILLO, 1990; OMS, 1986). Acredita-se que prejuízos semelhantes sejam causados à bubalinocultura.

A brucelose no homem é de distribuição mundial. Com o advento da pasteurização do leite, houve redução da brucelose como problema de saúde pública. Porém, em países menos desenvolvidos, muitos casos de brucelose ainda ocorrem pela ingestão de produtos lácteos contaminados (MANUAL MERCK, 2004). Estudo de 1994, conduzido nos EUA, sugeriu que casos humanos de brucelose na Califórnia foram causados pela ingestão de leite e derivados oriundos do México (USDA, 2005). Hoje, a brucelose humana possui forte caráter ocupacional, afetando profissionais que desenvolvem atividades com maior risco de exposição, como tratadores, médicos veterinários, magarefes e laboratoristas (USDA, 2005). A espécie mais patogênica e invasora para humanos é a *B. melitensis*, seguida da *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis*. Essas, além da *B. pinnipediae* da *B. cetaceae*, foram relacionadas à infecção humana (CORBEL, 1997). Porém a maior frequência de casos em humanos é por infecção pela *B. abortus*, pois é a espécie mais difundida nos plantéis animais. Nesse caso, a

doença manifesta-se geralmente na forma subclínica, e os sinais mais comuns são semelhantes aos observados nos quadros de infecções generalizadas, dificultando o diagnóstico clínico. Os sintomas característicos em geral são mais brandos do que os causados por *B. melitensis* ou *B. suis* (OMS, 1986). No Brasil, há poucos relatos de isolamento da brucela no homem, porém os dados disponíveis sugerem altos índices de exposição (HOMEM *et al.*, 2000).

As brucelas apresentam duas morfologias de colônias – lisas ou rugosas, decorrentes da constituição química da sua parede celular. Por isso, são divididas em dois grupos antigenicamente distintos: as lisas ou clássicas, que são a *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. maris* e as rugosas, a *B. ovis* e a *B. canis*. A *B. abortus* subdivide-se em oito biovars (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). O grupo das rugosas não se subdivide (CORBEL, 1997; QUINN *et al.*, 1994).

Existe uma preferência das brucelas por determinados hospedeiros. A *B. abortus* acomete preferencialmente bovídeos, a *B. suis* suídeos, a *B. melitensis* caprinos, a *B. canis* canídeos, a *B. ovis* ovinos e a *B. neotomae*, isolada apenas do roedor *Neotoma lepida*, oriundo do deserto de Utah, nos EUA. O principal agente para bovinos é a *B. abortus* biotipo 1, presente no mundo todo, sendo o mais prevalente também na América Latina. No Brasil, até 1985, foram confirmados os biotipos 1, 2 e 3 da *B. abortus*, o biotipo 1 da *B. suis*, a *B. ovis* e a *B. canis* (GARCÍA-CARILLO, 1990). Os búfalos são acometidos pelos mesmos biotipos que os bovinos (BISHOP *et al.*, 1994; OMS, 1986;).

As brucelas possuem, em sua membrana externa, um lipopolissacarídeo (LPS) constituído de três partes: um glicofosfolipídio denominado lipídio A (LA), endotoxina responsável pela patologia da doença; um oligossacarídeo central e, em sua porção terminal, a cadeia O (CO), homopolímero formado por cerca de 100 resíduos do monossacarídeo  $\alpha$ -D-Rhap4Nfo (CORBEL, 1987). A CO é sítio imunodominante da bactéria, responsável pelo desencadeamento da maior parte da resposta humoral tanto da infecção natural quanto

daquela desenvolvida após vacinação pela B19 (SCHURIG, 1997). Quatro epítomos estão ligados à CO: C/Y, C, A e M; porém a maioria dos anticorpos é produzida contra C/Y e contra NH, hapteno antigenicamente ligado ao LPS (MORENO et al., 1998). Esses epítomos são responsáveis pelas reações cruzadas com outras bactérias Gram-negativas, como a *E. coli* sorogrupo O:157, a *Yersinia enterocolitica* sorogrupo O:9 e a *Salmonella* sorogrupo O:30 (CORBEL, 1985).

A CO também se relaciona com a aderência da bactéria às células do hospedeiro, além de lhe conferir resistência aos fagócitos e proteção contra as reações frente a anticorpos e ao sistema complemento. Devido a essas particularidades, acredita-se que a CO seja importante fator de interação parasita-hospedeiro e que sua ausência resulte em perda de virulência (QUINN et al., 1994).

As brucelas penetram no organismo mamífero pelas mucosas do trato digestório, genital ou nasal, conjuntiva ocular ou por soluções de continuidade da pele. Em bovídeos, a principal porta de entrada é a mucosa orofaríngea. Do aparelho digestório superior, são carregadas até os linfonodos e fagocitadas, principalmente por macrófagos, onde podem permanecer quiescentes por meses. Sobrevivendo, poderá ocorrer bacteremia, com as brucelas dentro dos macrófagos ou livres no plasma, alojando-se em tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário tais como baço fígado e linfonodos (ACHA; SZYFRES, 1986; BATHKE, 1988) e naqueles onde há maior disponibilidade de elementos que estimulem sua multiplicação. No caso dos bovídeos, destaca-se o eritritol, possivelmente hormônios esteróides e outras substâncias (QUINN et al., 1994).

O eritritol está presente nos tecidos osteoarticulares, mamários, órgãos reprodutores masculino e feminino (sobretudo útero gravídico), atingindo grandes concentrações na placenta, nos líquidos fetais e nos placentomas (KEPPIE et al., 1964). Entretanto, as brucelas não metabolizam diretamente o eritritol, mas sim a eritrose, açúcar simples, resultante do

desdobramento da eritrulose, metabólito do eritritol. A quebra da eritrulose em eritrose é feita pela enzima D-eritrulose-1-fosfato de-hidrogenase (D-Ery) produzida por todas as brucelas, exceto pela estirpe B19. A oferta de eritritol cresce na razão direta da evolução da gestação, atingindo máxima concentração em torno dos cinco meses (SAMARTINO et al., 1996). Essa inferência sugere que outros fatores devam ser incluídos como as principais causas do abortamento por brucelose, como os estrógenos e a progesterona, visto que a maioria dessa ocorrência é no terço final da gestação, quando o tecido córion-alantoideano apresenta-se bem desenvolvido e há máxima concentração dessas substâncias no soro materno (BEDFORD, et al., 1972) e, portanto máxima disponibilidade de produtos de sua degradação das quais a brucela pode metabolizar, além da eritrose.

Nesse momento, uma grande quantidade de endotoxinas é liberada após a destruição das bactérias, levando a um processo caracterizado por reação inflamatória dos placentomas. A inflamação culmina em necrose, lise das vilosidades e subsequente descolamento do cotilédone e da carúncula. Nos cursos agudos, esse processo desencadeia o abortamento. Porém quanto menos intensa a necrose, maior será a deposição de fibrina entre as vilosidades e mais tardio o abortamento, podendo a gestação vir a termo, gerando produtos que sobrevivem poucos dias. O excesso de deposição de fibrina leva à retenção de placenta. As lesões também diminuem a circulação materno-fetal, comprometendo a respiração e a alimentação do produto, levando-o à morte, que também pode ser causada pelas próprias bactérias, caso estejam em concentração elevada no âmnion. Em ambos os casos, podem surgir fetos macerados e/ou mumificados, sinais mais freqüentes em búfalos do que em bovinos (ACHA; SZYFRES 1986). O quadro pode evoluir para metrite ou endometrite crônicas, gerando subfertilidade, infertilidade ou esterilidade, em geral apresentando secreção vaginal (ACHA; SZYFRES 1986; BATHKE, 1988). Cerca de duas semanas após a expulsão do produto, quando o útero entra em repouso e a bactéria migra para outros órgãos ativos,



como a glândula mamária e os linfonodos supramamários, pode ocorrer mastite crônica sem lesões aparentes ou mudanças características do leite (BATHKE, 1988).

A bactéria é eliminada em grandes quantidades pelo animal infectado pelos produtos do abortamento ou parto e pela secreção vaginal, durante todo o puerpério, contaminando o ambiente e propiciando a infecção dos contactantes. A eliminação do agente pelo leite é intermitente e persiste por meses (ACHA; SZYFRES, 1986).

A capacidade de sobrevivência da brucela em condições naturais é grande se comparada à de outras bactérias patogênicas não esporuladas, sobretudo em ambiente úmido, ao abrigo da luz solar direta, pH neutro e em ambiente contendo matéria orgânica. Em geral a remoção dos animais e produtos infectados, a eliminação da matéria orgânica, a desinfecção do local do abortamento, a secagem de ambientes úmidos e o vazio sanitário de no mínimo dois meses são suficientes para evitar a transmissão (USDA, 2005). Os desinfetantes mais recomendados são os produtos à base de cloro (2,5%), a soda cáustica a 2-3% e a cal hidratada a 20%, com tempo mínimo de contato de uma hora. Álcool 70° tem ação imediata; inativação pelo calor é eficaz quando bem realizada (OMS, 1986). Recomenda-se o corte da pastagem para facilitar a ação bactericida da luz solar direta, que em 4 horas e 30 minutos destrói a brucela (WRAY, 1975).

Quando a brucela é introduzida em uma população suscetível, num primeiro momento a maioria das fêmeas aborta. Na prenhez subsequente, há reinvasão do útero, mas a proporção de abortamentos decresce em 20 a 25%. Raramente o sinal ocorre na terceira prenhez. Passada a fase aguda, sobrevem a crônica, quando apenas os animais suscetíveis introduzidos no rebanho ou novilhas de primeira cria abortam (BISHOP et al., 1994; ACHA; SZYFRES, 1986).

Entre os ruminantes, a maioria das infecções ocorre pela ingestão de pastagens, alimentos e águas contaminadas, mas também pelo contato direto com o animal ou sêmen

contaminado (ACHA; SZYFRES, 1986). Porém a transmissão vertical também ocorre (OMS, 1986), podendo desencadear a condição de “portador latente”, que é um fenômeno relatado numa frequência entre 1% e 9% das novilhas nascidas de vacas infectadas (BISHOP et al., 1994). Essas novilhas apresentam-se sorologicamente negativas ou com títulos instáveis (NIELSEN; DUNCAN, 1990), soroconvertendo-se na metade da primeira prenhez. Nesse caso, a vacinação é ineficaz (BISHOP et al., 1994). Não há comprovação desse fenômeno em búfalos.

Embora os mecanismos de transmissão da brucelose bovina e bubalina sejam basicamente os mesmos, algumas particularidades do comportamento dessa última espécie devem ser consideradas antes de se estabelecer um programa de controle. A forma de criação é quase exclusivamente extensiva, com a utilização de grandes áreas, proporcionando acesso contínuo desses animais a diversos tipos de ecossistemas. Além disso, são animais muito fortes e possuem hábitos migratórios e gregários. Movimentam-se principalmente à noite por pastos, rios e aguadas e, se desagregados, ou à procura de alimento ou água, podem destruir cercas e entrar em contato com outros grupos de animais, ampliando a possibilidade de difusão da doença. O hábito de o búfalo banhar-se, visando a termorregulação corpórea, bem como o pastoreio em aguadas e açudes, tornam a espécie mais exposta a determinados microorganismos, entre os quais as brucelas, pois nesses ambientes a sobrevivência da bactéria é ampliada (MARQUES; CARDOSO, 1997; WRAY, 1975).

A brucelose provoca grandes prejuízos econômicos na bubalinocultura devido a problemas reprodutivos acarretados pela doença (TIMONEY et al., 1988). Marques e Cardoso (1997) referem que é a principal causa de abortamento em rebanhos bubalinos na Índia, na Itália e no Brasil. Algumas fêmeas que abortam permanecem estéreis devido às lesões crônicas no útero (GENTILE, 1957). Das et al. (1990) relataram abortamento entre três meses e meio e quatro meses e meio de gestação em 50% das búfalas estudadas. Além disso, seu

principal produto com maior valor agregado, a mussarela frescal, deve provir de animais sãos. Portadores não identificados, além de servirem como fonte de infecção para o rebanho, podem eliminar a bactéria pelo leite. O produto, quando ingerido *in natura* ou após ser utilizado para fabricação de derivados sem a prévia pasteurização, pode causar brucelose no homem (USDA, 2005).

O sistema de manejo extensivo, o insipiente programa de controle sanitário no Brasil, os grandes rebanhos, as condições ambientais das propriedades e a crença equivocada de que a espécie é imune a algumas doenças que acometem bovinos dificultam o controle da brucelose em bubalinos (GUARINO et al., 2001). FOSGATE et al. (2002) sugerem haver características epidemiológicas diferentes entre bovinos e bubalinos, ratificando a necessidade de mais estudos nesse tema, pois a maioria dos trabalhos sobre a brucelose animal refere-se à espécie bovina.

A *B. abortus* foi isolada tanto do búfalo indiano (*Bubalus bubalis*) como do búfalo africano - *Syncerus caffer* (BISHOP et al., 1994). Estudos sorológicos realizados com *S. caffer* na África, detectaram mais de 30% de reatores, indicando que a espécie pode ser importante reservatório para bovinos, quando ambos dividem o mesmo ambiente (METCALF et al., 1994). Fosgate et al. (2002) relataram taxa de prevalência, nas ilhas de Trindade e Tobago, situadas no Caribe, entre 4% e 56,4%. No Brasil, há poucos estudos sobre as características epidemiológicas e imunológicas dos rebanhos bubalinos. A maioria das populações é trabalhada sem controle específico (MOTTA et al., 2002). Entre os estudos de prevalência e ocorrência da doença na espécie no Brasil, destacam-se os de Mathias et al. (1998), que observaram prevalência de 10,4% de animais reatores encontrados em 11 focos (68,8%) de 16 rebanhos estudados na região do Vale do Ribeira – SP. Motta et al. (2002) encontraram uma taxa de 11% de animais reatores em oito rebanhos do Estado de Minas Gerais.

A brucelose, por ser zoonose e causar prejuízos à produção de carne e leite, tornou-se alvo de programas de controle e erradicação em vários países. Esses programas geralmente não fazem distinção entre as espécies bovina e bubalina, adotando estratégias comuns para ambas. Basicamente, esses programas apoiam-se em vacinação em massa de bezerras com a estirpe B19 ou RB51 e na certificação de rebanhos livres (OMS, 1986; SCHURIG et al., 2002).

Até o momento, somente as vacinas vivas conferiram imunidade satisfatória contra a brucelose. A mais utilizada no mundo é a B19, desenvolvida na década de 1930 (ADAMS, 1990). É estável, protege contra a infecção e o abortamento em cerca de 60 a 75%, de acordo com a prevalência da doença no rebanho. Corbel (1997) explica que sua atenuação e baixa patogenicidade derivam de perda do gen eritrose-1-fosfato de-hidrogenase durante a mutação espontânea ocorrida com a estirpe, e por isso não há produção da enzima D-Ery, o que leva à inibição da sua multiplicação. Assim, a B19 não se beneficia da degradação do eritritol, tendo, inclusive, seu crescimento inibido pelo mesmo (ADAMS, 1990). Seu inconveniente é a presença da cadeia O, que induz anticorpos nos primeiros meses pós-vacinais. Além do que é patogênica para bovídeos machos e outras espécies incluindo o homem. No Brasil é obrigatória a vacinação de fêmeas bovinas e bubalinas entre três e oito meses de idade (BRASIL, 2004).

A RB51 é outra vacina viva desenvolvida para bovinos contra brucelose. Trata-se de uma mutante rugosa, rinfampicina-resistente e com características semelhantes às da B19. Porém, devido à ausência da CO, não induz à formação de anticorpos detectáveis nos testes utilizados no sorodiagnóstico da *B. abortus* (SCHURIG et al., 2002). Outro fator a ser considerado a seu favor é que tem sua virulência comprometida (SCHURIG, 1997), provavelmente também devido à ausência da CO (QUINN et al., 1994). Este é um bom argumento na defesa da sua utilização em fêmeas adultas não reatoras visando aumentar a

cobertura vacinal em situações de alto risco de infecção; ou em fêmeas desprovidas da proteção conferida pela B19 devido à idade avançada ou a falhas na vacinação.

As operações de certificação de rebanhos livres apoiam-se no diagnóstico indireto. É estabelecida uma rotina de testes, a intervalos regulares, com sacrifício dos animais positivos, até a obtenção de três ou mais testes negativos para todos os animais de reprodução. Como o diagnóstico positivo significa a remoção do animal da população, as características de sensibilidade e especificidade dos testes tornam-se muito importantes, pois resultados falso-positivos significam sacrificar animais sadios, e resultados falsos negativos significam deixar fontes de infecção em contato com animais sadios.

Assim sendo, existe intensa atividade científica no sentido do aperfeiçoamento dos métodos de sorodiagnóstico da brucelose bovina. Como o interesse econômico pela espécie bubalina é mais restrito, naturalmente o número de estudos envolvendo búfalos é reduzido, havendo uma espécie de paradigma de que o que foi desenvolvido para bovinos também serve para bubalinos.

O diagnóstico definitivo de qualquer doença é obtido por isolamento e identificação do agente (BRICKER, 2002). No entanto, os métodos diretos são inviáveis quando se trabalha com rebanhos. Assim, os programas de combate à brucelose baseiam-se no sorodiagnóstico, levando-se em conta na escolha dos testes a serem aplicados, as suas características intrínsecas, o custo e a praticidade de execução. Os testes oficiais do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) do Brasil são o do antígeno acidificado tamponado (AAT), o 2-mercaptoetanol (ME) e o teste de fixação do complemento - FC (BRASIL, 2004).

O desempenho dos testes utilizados no sorodiagnóstico da brucelose baseia-se principalmente na detecção do anticorpo IgG<sub>1</sub>, o mais prevalente em animais naturalmente infectados. Os testes imunoenzimáticos (o ELISA Indireto – ELISAI e o ELISA Competitivo

– ELISAC) e a FC são aqueles com limiar de detecção mais baixo para essa classe de anticorpo (WRIGHT; NIELSEN, 1990).

Existem vários testes utilizando antígeno acidificado tamponado, como o do antígeno brucélico ácido tamponado para prova rápida em placa (BPA) e o AAT. O mais difundido é o AAT. São testes qualitativos, rápidos, baratos, de simples execução e possuem ótima sensibilidade e boa especificidade (KRUZE, 1975). A OIE refere que o AAT é a melhor alternativa para o diagnóstico em massa (OIE, 2005). Nicoletti (1969) demonstrou que o AAT detectou alta percentagem de animais positivos ao exame direto. HUNTER e ALLEN (1972) ao compararem várias provas sorológicas, constataram que o AAT detectou o maior número de reatores positivos ao exame direto.

O SLT, executada em pH neutro, demonstra alta sensibilidade analítica na detecção dos isotipos bovinos com uma exceção importante: o anticorpo IgG<sub>1</sub> (WRIGHT; NIELSEN, 1990). Alton (1978) refere que o desempenho do SRP é semelhante ao do SLT.

O ME inativa a atividade aglutinante do anticorpo IgM mediante processo químico, reduzindo as pontes dissulfídricas da sua estrutura pentamérica, degradando-a em cinco subunidades não aglutinantes (TIMONEY et al., 1988). O teste é eficiente para bovinos (MARIÑO et al., 1991) e bubalinos (SANDHU; JOSHI, 1993) e detecta tanto anticorpos IgG<sub>1</sub> como IgG<sub>2</sub> (NIELSEN et al., 1984). Além disso, o tratamento com o ME pode provocar aumento na sensibilidade do teste, pela otimização da reatividade de IgG<sub>1</sub> (NIELSEN & DUNCAN, 1990; WRIGHT; NIELSEN, 1990). Assim, além do ME possuir boa especificidade (NIELSEN, 1995; DAJER et al., 1999), também apresenta boa sensibilidade relativa (PAULIN et al., 2002). Nicoletti (1969) relatou concordância de 97% entre o ME e a FC. Paulin et al. (2002) estudando dois rebanhos bovinos, relataram concordâncias ao Kappa de 91,9% e 88,5% entre ME e FC. Como desvantagens, pode-se citar o tempo para a realização do teste (48 horas), grande volume de reagentes e vidraria utilizados por amostra e

necessidade de utilização de um reagente tóxico (NIELSEN, 2002).

Além disso, o ME deve ser executado junto com a SLT, por dois motivos básicos: o primeiro é que, como não detecta IgM, o ME não é adequado para casos de infecções agudas, podendo apresentar resultado negativo, em títulos de anticorpo IgM que variam de 25 a 200 na SLT (BERCOVICH, 1998). O segundo motivo está ligado ao fenômeno de prozona. Nicoletti (1992) demonstrou a ocorrência de falsos negativos no ME atribuída ao fenômeno de prozona.

O teste FC é o que apresenta melhor correlação com os isolamentos em animais natural ou experimentalmente infectados (NIELSEN, 1995), o que levou à sua adoção como *gold standard* para a avaliação de outros testes sorológicos. O Código Zoossanitário Internacional refere o FC como importante suporte técnico e teste exigido para comércio internacional de animais e produtos de origem animal (OIE, 2005). Quando feito a quente, é mais prático, há menos reações anticomplementares e anticorpos da classe IgM, aumentando sua especificidade (CHAPPEL, 1989). Detecta precocemente anticorpos IgG<sub>1</sub> no soro (HILL, 1963) e também revela casos crônicos, quando o anticorpo IgG<sub>1</sub> está em baixas concentrações (KRUIZE, 1975). Nielsen et al. (1995) citam o anticorpo IgG<sub>1</sub> como único detectado no FC em bovinos, o que eleva sua especificidade e geralmente não interfere no seu desempenho, pois o anticorpo IgG<sub>1</sub> predomina sobre a classe IgG<sub>2</sub> em animais infectados (WRIGHT; NIELSEN, 1990). Alton (1978) refere que a FC sofre menos interferência de anticorpos vacinais do que as provas de aglutinação. Nicoletti (1985) detectou soros de bubalinos com atividade fixadora de complemento, porém sem atividade aglutinante. As desvantagens são: o teste é trabalhoso, exige mão de obra especializada e controle rígido dos reagentes envolvidos. Além disso, em raras situações, nos soros com excesso ou predominância do anticorpo IgG<sub>2</sub>, pode impedir a ligação do anticorpo IgG<sub>1</sub> levando a reações falso-negativas. Não são claras as causas desse fato, mas sugere-se a idade avançada do animal, exposições repetidas ao agente, estresse e

transferência ativa do anticorpo IgG<sub>1</sub> para o colostro no período periparto (BRANDON et al. 1971; CHAPPEL, 1989). Brandon et al. (1971) e Timoney et al. (1988) afirmam que, embora o anticorpo IgG<sub>2</sub> não fixe complemento, reage com o antígeno, gerando uma leitura semelhante ao fenômeno de prozona, que resulta em reação falso-negativa. Nesses raros casos, outro teste de sensibilidade e especificidade elevadas como o teste de polarização fluorescente (PF), o ELISAC ou o ELISAI teriam importante papel na análise final da amostra.

Os testes imunoenzimáticos que têm apresentado melhores resultados são os ELISAC e o ELISAI. Como vantagens, podemos citar sensibilidade e especificidade elevadas (quadro 1). Além disso, não apresentam o fenômeno de prozona como ocorre no FC, e o processo pode ser automatizado (NIELSEN et al., 1995). As desvantagens estão no investimento inicial e na impossibilidade, tal como os demais testes citados, de distinguir animais vacinados dos infectados, além do tempo para sua realização ser maior que o do AAT, caso não esteja automatizado.

Recentemente, um novo teste tem sido desenvolvido para o sorodiagnóstico da brucelose em diversas espécies, o PF (NIELSEN et al., 1996). Baseia-se nas diferenças rotacionais entre o antígeno solúvel (LPS) e o complexo ag-ac. Quando o animal é não reator, o LPS gira aleatoriamente a uma velocidade muito alta, resultando em uma baixa despolarização de luz. Porém, em caso de animal reator, o complexo ag-ac, sendo mais pesado, girará mais lentamente e a despolarização da luz ocorrerá a uma velocidade maior. A diferença das velocidades das despolarizações é medida por um analisador de polarização de fluorescência (DAJER, et al., 1999; SAMARTINO et al., 1999 b). Vantagens do teste: o PF não requer remoção dos reagentes e, como o equipamento possui características portáteis, pode ser executado num laboratório simples ou mesmo no campo (NIELSEN *et al.*, 2001). O teste é rápido, relativamente barato e de fácil execução. O PF está validado para o



sorodiagnostics da brucelose em bovinos e outras espécies, como caprinos, suídeos e alguns animais silvestres (NIELSEN; GALL, 2001; NIELSEN et al., 1999; NIELSEN et al., 2005). Requer volumes menores de soro do que os testes convencionais e não é afetado pela hemólise (SAMARTINO et al., 1999 b). Além disso, acredita-se que seja capaz de distinguir animais vacinados de não vacinados, embora não exista uma explicação razoável para esse fenômeno (NIELSEN et al., 1996; SAMARTINO et al., 1998). Como desvantagem, pode-se citar o investimento inicial para a compra do equipamento. O quadro 1 traz os valores de sensibilidade e especificidade relativas de vários testes indiretos para o sorodiagnostics da brucelose em bovídeos.

Em búfalos, destacaram-se alguns estudos realizados por Nicoletti (1992), Sandhu e & Joshi (1993), Mathias et al. (1998), Fosgate et al. (2002), Molnár et al. (2002) e Pinto et al. (2005).

Nicoletti (1992), avaliou cinco testes sorológicos em soros de 64 fêmeas bubalinas com isolamento direto de secreções mamárias: o teste do cartão ou *card test* (TC - teste de campo que possuía semelhança com o AAT), o Rivanol, o ELISAI, o FC e o SLT. Quarenta e seis animais foram comprovadamente negativos e 18 positivos (*B. abortus*, biovar 1). A sensibilidade do TC, do FC e do Rivanol também foi de 100%. Porém, o autor relata ocorrência de falsos negativos e falso-positivos ao TC.

Sandhu e Joshi (1993), submetendo soros de 359 fêmeas bubalinas compararam os resultados do AAT frente à combinação do ME com o teste de inativação pelo calor. As sensibilidades relativas (Sr) encontradas foram de 95,3% e 93,7%, respectivamente para fêmeas vacinadas e não vacinadas.

Mathias *et al.* (1998) compararam 477 amostras soros de fêmeas de búfalos com histórico de vacinação desconhecida e aparentemente sadias através do AAT e do ELISAC. Desses, em 465 foi realizado o FC. Foram considerados reatores os animais com resultados

positivos no AAT e no FC e não reatores os animais com resultados negativos nessas duas provas. A Sr do ELISAC foi de 100% e a concordância Kappa, 0,97.

Fosgate et al. (2002), estudando quatro rebanhos infectados por *B. abortus* e quatro rebanhos considerados livres de brucelose, comparou os parâmetros estimados entre os testes para bovinos e bubalinos. Foram estudados 391 soros de bovinos e 381 soros de bubalinos, ambos os grupos divididos em subgrupos de vacinados e não vacinados. Os testes estudados foram o SRP, o TC, o BPA e o SLT e estimaram a sensibilidade e a especificidade relativas sem uso de *gold standard*, a partir de abordagem bayesiana, assumindo independência entre os testes. As Sr encontradas para bubalinos nos testes SRP, TC, BPA e SLT foram, respectivamente, 51,4%, 90,4%, 96,3%, e 75%. As Sr encontradas para bovinos nos testes SRP, TC, BPA e SLT foram, respectivamente, 66,7%, 72,7%, 88,1%, e 80,2%. O BPA destacou-se como o melhor teste de triagem para búfalos.

Molnár et al. (2002) estudaram 440 fêmeas com idade superior a três anos sem histórico de vacinação de rebanhos livres, de baixa, média e alta prevalência de infecção; e soros com valores de percentagem de positividade baixos, suspeitos e altos. Os testes estudados foram o SRP, o AAT, o ELISAI com conjugado antibovino de cadeia leve (composto por anticorpo monoclonal) e um ELISAC comercial (denominado ELISAC<sub>2</sub>). Os resultados do ELISAC1 foram aceitos como *gold standard* para comparação com o resultados dos outros testes. O intervalo de confiança utilizado foi de 95%. A Sr do AAT foi de 93,02 quando comparado ao ELISAC1 e o kappa foi de 0,989. A Sr SRP foi de 79,3% e o kappa 0,54. A Sr do ELISAI foi de 98,6 e o kappa foi de 0,93. A Sr do ELISAC2 foi de 97,1 e o kappa foi de 0,91.

Pinto et al. (2005), estudaram 90 fêmeas não vacinadas de fazenda infectada por *B. abortus* e compararam os resultados do AAT, ME e FC entre si e do AAT frente à combinação do ME com o FC. A Sr do AAT foi de 93,02 ( $87,57 \geq IC_{95\%} \leq 98,47$ ) quando

comparado ao *gold standard* composto pela combinação do ME e FC e o kappa foi de 0,93.

Teste	Sr	Er	Autor
AAT	99,6	83,1	DAVIES, 1971
	96,1	97,8	SAMARTINO <i>et al.</i> , 1999 a
	98,3	68,8	DAJER <i>et al.</i> , 1999
	91,4	94,0	MOLNÁR <i>et al.</i> , 2002*
	84,3	81,4	PAULIN <i>et al.</i> , 2005*
TC	96,0	87,0	CASAS-OLASCOAGA, 1976
	88,1	98,1	FOSGATE <i>et al.</i> , 2002
	90,4	90,7	FOSGATE <i>et al.</i> , 2002*
BPA	99,9	99,8	SAMARTINO <i>et al.</i> , 1999 a
	99,6	98,6	VANZINI <i>et al.</i> , 1998
	88,1	90,7	FOSGATE <i>et al.</i> , 2002
	96,3	98,1	FOSGATE <i>et al.</i> , 2002*
SLT	70,4	94,7	NIELSEN & DUNCAN, 1990
	70,4	94,7	FOSGATE <i>et al.</i> , 2002
	80,2	99,3	FOSGATE <i>et al.</i> , 2002*
SRP	66,0	-	NICOLETTI, 1969
	66,7	98,9	FOSGATE <i>et al.</i> , 2002
	51,4	99,3	FOSGATE <i>et al.</i> , 2002*
	79,3	86,3	MOLNÁR <i>et al.</i> , 2002*
ME	-	97,0	NICOLETTI & MURASCHI, 1966
	96,8	95,6	PAULIN <i>et al.</i> , 2002
	98,1	100,0	PAULIN <i>et al.</i> , 2004
FC	92,9	100,0	DOHOO <i>et al.</i> , 1986
	97,5	99,9	NIELSEN, 1995
	95,2	98,9	UZAL <i>et al.</i> , 1995
	93,3	95,5	NIELSEN <i>et al.</i> , 1999
ELISAI	98,6	97,3	MOLNÁR <i>et al.</i> , 2002*
	98,2	98,6	SAMARTINO <i>et al.</i> , 1999 a
	93,7	98,2	PAULIN <i>et al.</i> , 2004
	96,2	99,7	NIELSEN <i>et al.</i> , 2005
ELISAC	97,5	99,8	SAMARTINO <i>et al.</i> , 1999 a
	100,0	98,6	MATHIAS <i>et al.</i> , 1998*
	99,3	99,6	NIELSEN & GALL, 1998
	100,0	99,3	MOLNÁR <i>et al.</i> , 2002*
PF	93,5	97,2	NIELSEN <i>et al.</i> , 1999
	98,1	99,6	SAMARTINO <i>et al.</i> , 1999 b
	96,9	99,0	DAJER <i>et al.</i> , 1999
	92,0	98,4	PAULIN <i>et al.</i> , 2005*

Quadro 1 - Exemplos de sensibilidades e especificidades relativas elevadas, expressas em porcentagem, dos testes utilizados no sorodiagnóstico da brucelose em bovídeos. São Paulo, 2006

Legenda: Sr – sensibilidade relativa; Er – especificidade relativa; AAT- teste do antígeno acidificado tamponado; TC- teste do cartão ou “card Test”; BPA- teste do antígeno brucélico ácido tamponado para teste da soroaaglutinação rápida em placa; SLT- teste de soroaaglutinação lenta em tubos; SRP- teste de soroaaglutinação rápida em placa; ME- teste do 2-mercaptoetanol; FC- teste de fixação do complemento; ELISAI- teste imunoenzimático ELISA indireto; ELISAC- teste imunoenzimático ELISA competitivo; PF- teste de polarização fluorescente. \*Teste aplicado em soro de bubalinos (*B. bubalus*).

## **2. OBJETIVO**

Tendo em vista a importância da bubalinocultura para o Brasil e também do PNCEBT para a evolução das cadeias produtoras de bovinos e bubalinos, e devido à escassez de estudos sobre o diagnóstico indireto da brucelose na espécie bubalina, procedimento no qual apoia-se o processo de certificação de rebanhos livres e monitorados, pretende-se comparar o desempenho de diferentes testes sorológicos para o sorodiagnóstico da brucelose nessa espécie.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Delineamento experimental**

Foram utilizados os soros de 696 fêmeas bubalinas adultas. Esses soros foram submetidos a nove diferentes testes sorológicos, visando o diagnóstico da brucelose. Os nove testes realizados foram: SRP, SLT, BPA, AAT, ELISAI, ELISAC, PF e ME e FC.

#### **3.2 Animais e amostras**

No período de janeiro a julho de 2002, foram obtidas amostras de sangue de 696 fêmeas bubalinas da raça Murrah, de aptidão leiteira, com idade entre 24 e 60 meses, com histórico de vacinação irregular com a amostra B19 e criadas em oito propriedades situadas na região do Vale do Ribeira, São Paulo, um dos mais importantes pólos da bubalinocultura nacional (MARQUES; CARDOSO, 1997). Todas as propriedades apresentavam histórico de falhas reprodutivas compatíveis com a brucelose. As amostras foram colhidas por venipunção, pelo sistema a vácuo, em frascos de vidro siliconizados sem anticoagulante. Dessas amostras foram obtidos os soros, que foram envasados em criotubos e mantidos a temperatura de menos 20°C. A tabela 32 (contida no APÊNDICE A) traz os resultados dos testes sorológicos para diagnóstico da brucelose nos animais do presente estudo.

### 3.3 Laboratórios

Os testes AAT, ME, SRP, SLT, FC e parte do BPA foram realizados no Laboratório de Brucelose do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, do Instituto Biológico, situado na cidade de São Paulo.

Os testes ELISAI, ELISAC, PF e a maior parte do BPA foram realizados no Laboratório de Sorologia e Imunologia (LSI) do Centro de Investigações em Ciências Veterinárias e Agronômicas (CICVyA) do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), situado na cidade de Castelar, Estado de Buenos Aires, República Argentina.

O tratamento dos dados foi realizado no Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

### 3.4 Antígenos

Os três antígenos utilizados nos testes SRP, AAT, ME, SLT e FC, quais sejam, antígeno de Huddleson, o antígeno para o sorodiagnóstico do AAT e o antígeno para o sorodiagnóstico do SLT, foram produzidos no Instituto Biológico, de acordo com o protocolo descrito pelo Centro Panamericano de Zoonoses (CEPANZO, 1969). Todos foram produzidos a partir da amostra 1119-3 de *Brucella abortus*, inativada pelo calor.

O antígeno para o teste BPA foi produzido pelo LSB/CICVyA/INTA, certificado pelo SENASA (Serviço Nacional de Sanidade e Qualidade Agroalimentária da Argentina) e elaborado de acordo com o método original de Angus e Barton (1984). Também foi produzido a partir da amostra 1119-3 de *Brucella abortus*, inativada pelo calor (SENASA, 2003).

O antígeno para a realização do ELISAI foi o do *kit* Creditest® *Brucella abortus*, desenvolvido pelo *Institute for Animal Science and Health* (INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE AND HEALTH, 2000), para detectar anticorpos da classe IgG1 contra a *B. abortus*, em bovinos.

O antígeno utilizado no ELISAC foi o LPS obtida de *B. abortus* amostra 1119-3, produzido no CCVA/INTA, conforme protocolo de Nielsen et al. (1998).

O antígeno utilizado no PF foi desenvolvido pela empresa *Diachemix Corporation* e constituiu-se do polissacarídeo LPS, contendo a cadeia O da amostra *B. abortus* 1119-3, conjugado ao isotiocianato de fluoresceína.

### **3.5 Protocolos dos testes**

Os testes SRP, AAT, ME e SLT foram executados conforme Alton et al. (1988). A interpretação do resultado do AAT e do ME foi feita de acordo com o regulamento do PNCEBT (BRASIL, 2004). Para o teste ME, foram acrescentadas as diluições 1:400 e 1:800 objetivando evitar o fenômeno de prozona. A interpretação do resultado do SRP foi feita segundo o regulamento da Portaria número 23 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1976).

O teste BPA foi executado e interpretado conforme Angus e Barton (1984).

O ELISAI utilizado foi o Creditest® *Brucella abortus* com conjugado de soro bovino, cujo protocolo foi desenvolvido pelo *Institute for Animal Science and Health* (INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE AND HEALTH, 2000). Os resultados foram expressos em percentagem de positividade (PP), ou seja,  $PP < 45\%$  os soros são considerados não reatores e  $PP \geq 45\%$  o soro em teste é considerado reator (critério para bovinos).



O ELISAC foi executado conforme descrito por Nielsen et al. (1998). Os resultados também foram expressos em percentagem de positividade (PP). Soros  $PP < 40\%$  foram considerados não reatores e os que apresentaram  $PP \geq 40\%$  foram considerados reatores (critério para bovinos).

O PF foi realizado de acordo com protocolo desenvolvido por Nielsen et al. (2001). Adicionaram-se 10  $\mu\text{L}$  de soro em tubos de ensaio borossilicado 9 x 75 mm contendo um mL de tampão tris a 0,01 M e pH 7, mais 0,15 M de NaCl, 10 mM de EDTA e 0,05% de NP40 (diluição final de 1:100). Uma primeira leitura foi feita no Sentry. A seguir, agregou-se 10  $\mu\text{L}$  de antígeno em cada tubo, procedeu-se à homogeneização da amostra, incubou-se durante dois minutos à temperatura ambiente e realizou-se a leitura final no Sentry. O resultado foi expresso em unidades de millipolarização (mP). Os pontos de corte foram os mesmos adotados por Samartino et al. (1999 b) levando-se em conta que os animais poderiam estar vacinados com a cepa B19. Ou seja, soros com valores até 94mP foram considerados não reatores. De 95mP a 104mP foram considerados inconclusivos e, acima de 105mP, foram considerados reatores (critério para bovinos).

A execução do FC a quente em microplaca, assim como a titulação da hemolisina, complemento e antígeno foram feitos de acordo com a técnica descrita por Alton et al. (1988). Todos os soros foram previamente inativados em banho-maria a 58°C por 30 minutos. As reações foram realizadas em placas de polietileno de fundo “U” com 25  $\mu\text{L}$  de soro a uma diluição inicial de 1:2 com igual volume de antígeno e 25  $\mu\text{L}$  soro de cobaio contendo cinco unidades de complemento capazes de hemolisar 50% das hemáceas de carneiro sensibilizadas pela hemolisina (sistema hemolítico). Após a placa ser incubada por 30 minutos a 37°C, 25  $\mu\text{L}$  de sistema hemolítico foi colocado, incubando-a por 30 minutos a 37°C. O título do soro foi obtido determinando a recíproca da maior diluição em que ocorreu fixação de 25% de complemento, convertendo-se o resultado em unidades internacionais de acordo com a técnica

padronizada no Laboratório Central de Veterinária (CVL) e utilizando como base soro bovino positivo padrão internacional adquirido no CVL (MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, 1991). Empregou-se uma escala de lise para a leitura das reações (grau de hemólise). Foram considerados positivos soros com títulos iguais ou acima de 20 UI.

#### 4. TRATAMENTO DOS DADOS

Devido aos animais possuírem histórico de vacinação irregular e o ponto de corte do ME ser diferente para animais vacinados e não vacinados, foram feitas duas análises, uma considerando todos os animais como vacinados e outra como não vacinados. Isso foi necessário, pois o resultado obtido frente aos dois testes considerados como referência (denominado, no presente estudo, de *gold standard*), foi constituído pela combinação dos testes de FC e ME.

Assim, os resultados foram divididos em duas séries de análises: a primeira considerando como *gold standards* positivos os animais positivos para o teste FC (título $\geq$ 20UI) e para o ME (critério para fêmea vacinada) e *gold standards* negativos aqueles negativos para o teste FC (título $<$ 20UI) e para o ME (critério para fêmea vacinada), e a segunda série de análises considerando como *gold standards* positivos os animais positivos para o teste FC (título $\geq$ 20UI) e para o ME (critério para fêmea não vacinada) e *gold standards* negativos os negativos para o teste FC (título $<$ 20UI) e para o ME (critério para fêmea não vacinada). Esses critérios seguem a recomendação de Martin et al. (1987). A interpretação do teste ME seguiu a legislação do PNCEBT (BRASIL, 2004). Como o ME possui uma faixa de resultados considerados como inconclusivos, esses resultados foram excluídos das análises.

Com base nos *gold standards* positivos e negativos, foi construída curvas ROC (*receiver operating characteristic*) para cada um dos testes quantitativos, quais sejam, SRP, SLT, ELISAC, ELISAI e PF (METZ, 1978). Nesta operação, foi utilizado o programa MedCalc. Os resultados dessa análise permitiram estabelecer os pontos de corte que otimizam os valores de sensibilidade relativa e especificidade relativa para cada um dos testes.

Esses pontos de corte foram utilizados para o cálculo do índice de concordância Kappa de cada teste, frente os mesmos *gold standards*. O cálculo foi realizado pelo programa MedCalc. O índice Kappa também foi calculado para os testes qualitativos (AAT, AATE e BPA).

## 5. RESULTADOS

Seguem os resultados das duas séries de análises, critério para fêmea vacinada e critério para fêmea não vacinada.

### 5.1 Análises considerando como *gold standards* positivos os animais positivos para o teste da FC (título $\geq$ 20UI) e para o ME (critério para fêmea vacinada) e *gold standards* negativos aqueles negativos para o teste da FC (título $<$ 20UI) e para o ME (critério para fêmea vacinada).

Em primeiro lugar foram definidos os pontos de corte para os testes quantitativos através da análise ROC. Assim, foram construídas curvas ROC para os testes SRP (figura 1 e tabela 1), SLT (figura 2 e tabela 2), ELISAC (figura 3 e tabela 3), ELISAI (figura 4 e tabela 4), e PF (figura 5, tabela 5), Como o teste da SLT apresenta a possibilidade de aglutinação completa e incompleta, os títulos das aglutinações incompletas foram considerados como sendo a média aritmética dos títulos inferior e superior. Assim, 25I foi transformado em 12,5, 50I em 37,5 e 100I em 150.

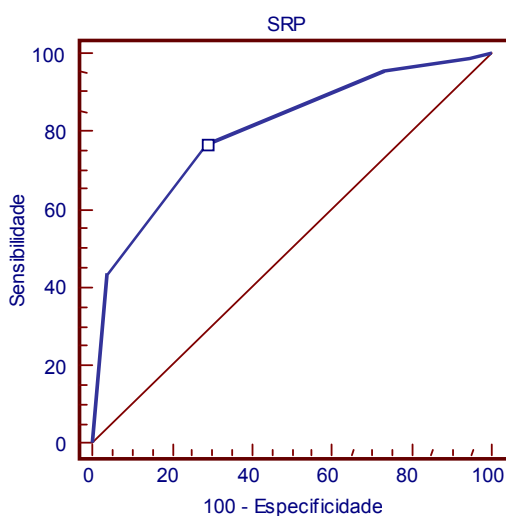


Figura 1 - Curva ROC para o teste SRP, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

Tabela 1 - Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo o título de anticorpos para o teste SRP gerados pela análise ROC, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

Título de anticorpos no SRP	Sr (IC=95%)	Er (IC=95%)
≥ 0	100,0 (94,3 - 100,0)	0,0 (0,0 - 0,6)
> 0	98,4 (91,6 - 99,7)	5,3 (3,6 - 7,5)
> 25	95,3 (86,9 - 99,0)	27,1 (23,5 - 30,9)
> 50*	76,6 (64,3 - 86,2)	71,7 (67,9 - 75,4)
> 100	43,7 (31,4 - 56,7)	96,2 (94,4 - 97,6)
> 200**	0,0 (0,0 - 5,7)	100,0 (99,4 - 100,0)

\*título que otimiza os valores de sensibilidade e especificidade; totais de *gold standards*: positivos=64; negativos=586. Total=650

\*\*ponto de corte para bovinos

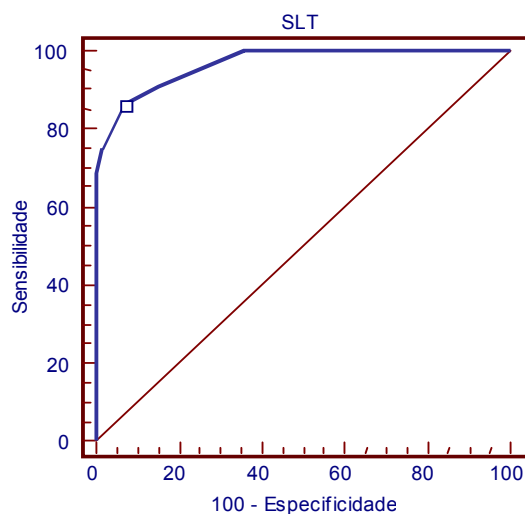


Figura 2 - Curva ROC para o teste SLT, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

Tabela 2 - Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo o título de anticorpos para o teste SLT gerados pela análise ROC, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

Título de anticorpos no SLT**	Sr (IC=95%)	Er (IC=95%)
≥ 0	100,0 (94,3 - 100,0)	0,0 (0,0 - 0,6)
> 0	100,0 (94,3 - 100,0)	61,1 (57,0 - 65,1)
> 12,5	100,0 (94,3 - 100,0)	64,5 (60,5 - 68,4)
> 25	90,6 (80,7 - 96,5)	85,0 (81,8 - 87,8)
> 37,5*	85,9 (75,0 - 93,3)	93,2 (90,8 - 95,1)
> 50	75,0 (62,6 - 85,0)	98,8 (97,6 - 99,5)
> 75	68,7 (55,9 - 79,8)	100,0 (99,4 - 100,0)
> 100	60,9 (47,9 - 72,9)	100,0 (99,4 - 100,0)
> 150	57,8 (44,8 - 70,1)	100,0 (99,4 - 100,0)
> 200**	18,8 (10,1 - 30,5)	100,0 (99,4 - 100,0)
> 400	10,9 (4,5 - 21,3)	100,0 (99,4 - 100,0)
> 800	0,0 (0,0 - 5,7)	100,0 (99,4 - 100,0)

\* título que otimiza os valores de sensibilidade e especificidade; totais de *gold standards*: positivos=64; negativos=586. Total=650

\*\* 12,5=25I, 37,5=50I, 150=100I

\*\*\*ponto de corte para bovinos

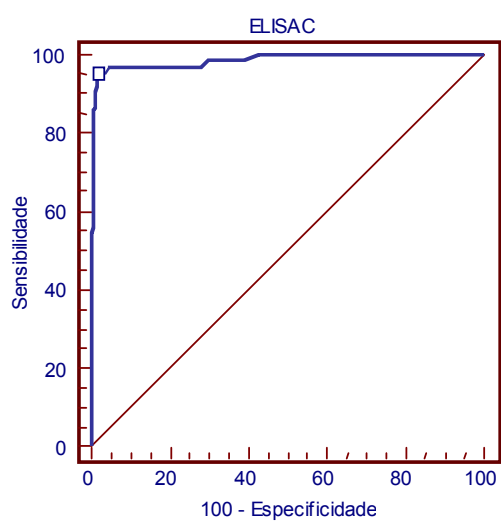


Figura 3 - Curva ROC para o teste ELISAC, considerando como *gold standard* a combinação do teste da FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

Tabela 3 - Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo o título de anticorpos para o teste da ELISAC gerados pela análise ROC, considerando como *gold standard* a combinação do teste da FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006. São Paulo, 2006

Título de anticorpos no ELISAC	Sr (IC=95%)	Er (IC=95%)
> 0	100,0 (94,3 - 100,0)	0,0 (0,0 - 0,6)
> 0	100,0 (94,3 - 100,0)	1,9 (0,9 - 3,3)
> 1	100,0 (94,3 - 100,0)	4,9 (3,3 - 7,0)
> 2	100,0 (94,3 - 100,0)	9,4 (7,1 - 12,0)
> 3	100,0 (94,3 - 100,0)	13,5 (10,8 - 16,5)
> 4	100,0 (94,3 - 100,0)	18,3 (15,2 - 21,6)
> 5	100,0 (94,3 - 100,0)	21,5 (18,2 - 25,1)
> 6	100,0 (94,3 - 100,0)	26,1 (22,6 - 29,9)
> 7	100,0 (94,3 - 100,0)	30,2 (26,5 - 34,1)
> 8	100,0 (94,3 - 100,0)	32,9 (21,9 - 36,9)
> 9	100,0 (94,3 - 100,0)	36,2 (32,3 - 40,2)
> 10	100,0 (94,3 - 100,0)	38,6 (34,6 - 42,6)
> 11	100,0 (94,3 - 100,0)	42,3 (38,3 - 46,4)
> 12	100,0 (94,3 - 100,0)	46,6 (42,5 - 50,7)
> 13	100,0 (94,3 - 100,0)	50,3 (46,2 - 54,5)
> 14	100,0 (94,3 - 100,0)	53,1 (48,9 - 57,2)
> 15	100,0 (94,3 - 100,0)	57,5 (53,4 - 61,5)
> 16	98,4 (91,6 - 99,7)	61,1 (57,0 - 65,1)
> 17	98,4 (91,6 - 99,7)	64,5 (60,5 - 68,4)
> 18	98,4 (91,6 - 99,7)	67,9 (64,0 - 71,7)
> 19	98,4 (91,6 - 99,7)	70,5 (66,6 - 74,1)
> 20	96,9 (89,1 - 99,5)	72,4 (68,5 - 75,9)
> 21	96,9 (89,1 - 99,5)	74,9 (71,2 - 78,4)
> 22	96,9 (89,1 - 99,5)	77,3 (73,7 - 80,6)
> 23	96,9 (89,1 - 99,5)	78,5 (74,9 - 81,8)
> 24	96,9 (89,1 - 99,5)	80,5 (77,1 - 83,7)
> 25	96,9 (89,1 - 99,5)	82,4 (79,1 - 85,4)
> 26	96,9 (89,1 - 99,5)	83,4 (80,2 - 86,4)
> 27	96,9 (89,1 - 99,5)	86,0 (82,9 - 88,7)
> 28	96,9 (89,1 - 99,5)	87,7 (84,8 - 90,3)
> 29	96,9 (89,1 - 99,5)	88,6 (85,7 - 91,0)
> 30	96,9 (89,1 - 99,5)	89,4 (86,6 - 91,8)
> 31	96,9 (89,1 - 99,5)	90,6 (88,0 - 92,9)
> 32	96,9 (89,1 - 99,5)	91,6 (89,1 - 93,7)
> 33	96,9 (89,1 - 99,5)	92,5 (90,1 - 94,5)
> 34	96,9 (89,1 - 99,5)	94,0 (91,8 - 95,8)
> 35	96,9 (89,1 - 99,5)	95,1 (93,0 - 96,7)
> 36	96,9 (89,1 - 99,5)	95,7 (93,8 - 97,2)
> 37	95,3 (86,9 - 99,0)	96,9 (95,2 - 98,2)
> 38	95,3 (86,9 - 99,0)	97,6 (96,0 - 98,7)
> 39	95,3 (86,9 - 99,0)	98,1 (96,7 - 99,1)
> 40**	95,3 (86,9 - 99,0)	98,5 (97,1 - 99,3)
> 43*	95,3 (86,9 - 99,0)	98,6 (97,3 - 99,4)
> 45	92,2 (82,7 - 97,4)	98,8 (97,6 - 99,5)
> 53	90,6 (80,7 - 96,5)	99,0 (97,8 - 99,6)
> 54	89,1 (78,7 - 95,5)	99,0 (97,8 - 99,6)
> 57	89,1 (78,7 - 95,5)	99,1 (98,0 - 99,7)
> 58	85,9 (75,0 - 93,3)	99,1 (98,0 - 99,7)
> 66	85,9 (75,0 - 93,3)	99,3 (98,3 - 99,8)
> 69	85,9 (75,0 - 93,3)	99,3 (98,3 - 99,8)
> 70	84,4 (73,1 - 92,2)	99,3 (98,3 - 99,8)
> 72	84,4 (73,1 - 92,2)	99,5 (98,5 - 99,9)
> 74	81,2 (69,5 - 89,9)	99,5 (98,5 - 99,9)
> 75	79,7 (67,8 - 88,7)	99,5 (98,5 - 99,9)
> 77	78,1 (66,0 - 87,5)	99,5 (98,5 - 99,9)
> 78	75,0 (62,6 - 85,0)	99,5 (98,5 - 99,9)
> 79	73,4 (60,9 - 83,7)	99,5 (98,5 - 99,9)
> 80	71,9 (59,2 - 82,4)	99,5 (98,5 - 99,9)
> 83	70,3 (57,6 - 81,1)	99,5 (98,5 - 99,9)
> 87	64,1 (51,1 - 75,7)	99,7 (98,8 - 99,9)
> 88	62,5 (49,5 - 74,3)	99,7 (98,8 - 99,9)
> 89	60,9 (47,9 - 72,9)	99,7 (98,8 - 99,9)
> 90	59,4 (46,4 - 71,5)	99,7 (98,8 - 99,9)
> 91	57,8 (44,8 - 70,1)	99,7 (98,8 - 99,9)
> 92	56,2 (43,3 - 68,6)	99,7 (98,8 - 99,9)
> 93	54,7 (41,7 - 67,2)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 94	45,3 (32,8 - 58,3)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 95	34,4 (23,0 - 47,3)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 96	20,3 (11,3 - 32,2)	100,0 (99,4 - 100,0)
> 97	12,5 (5,6 - 23,2)	100,0 (99,4 - 100,0)
> 98	3,1 (0,5 - 10,9)	100,0 (99,4 - 100,0)
> 99	0,0 (0,0 - 5,7)	100,0 (99,4 - 100,0)

\*título que otimiza os valores de sensibilidade e especificidade; totais de *gold standards*: positivos= 64; negativos= 586. Total=650

\*\*ponto de corte para bovinos

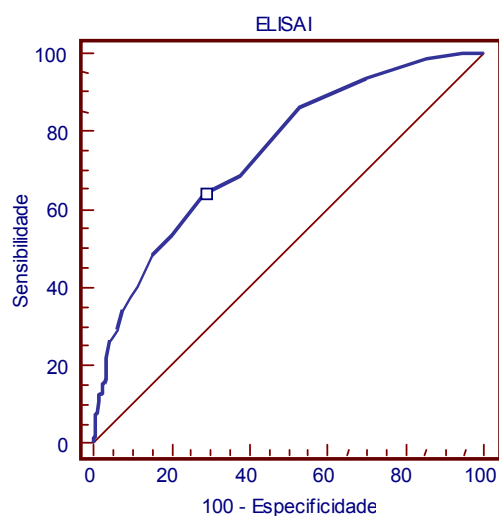


Figura 4 - Curva ROC para o teste ELISAI, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

Tabela 4 - Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo o título de anticorpos para o teste ELISAI gerados pela análise ROC, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

<b>Título de anticorpos no ELISAI</b>	<b>Sr (IC=95%)</b>	<b>Er (IC=95%)</b>
> 0	100,0 (94,3 - 100,0)	0,0 (0,0 - 0,6)
> 0	100,0 (94,3 - 100,0)	0,2 (0,0 - 1,0)
> 1	100,0 (94,3 - 100,0)	1,0 (0,4 - 2,2)
> 2	100,0 (94,3 - 100,0)	5,5 (3,8 - 7,6)
> 3	98,4 (91,6 - 99,7)	14,5 (11,8 - 17,6)
> 4	93,7 (84,7 - 98,2)	30,4 (26,7 - 34,3)
> 5	85,9 (75,0 - 93,3)	47,4 (43,3 - 51,6)
> 6	68,7 (55,9 - 79,8)	62,6 (58,6 - 66,6)
> 7*	64,1 (51,1 - 75,7)	71,8 (68,0 - 75,5)
> 8	53,1 (40,2 - 65,7)	80,2 (76,7 - 83,4)
> 9	48,4 (35,8 - 61,3)	85,3 (82,2 - 88,1)
> 10	40,6 (28,5 - 53,6)	89,1 (86,3 - 91,5)
> 11	37,5 (25,7 - 50,5)	90,6 (88,0 - 92,9)
> 12	34,4 (23,0 - 47,3)	92,8 (90,4 - 94,8)
> 13	29,7 (18,9 - 42,4)	93,9 (91,6 - 95,7)
> 14	28,1 (17,6 - 40,8)	94,7 (92,6 - 96,4)
> 15	26,6 (16,3 - 39,1)	95,6 (93,6 - 97,1)
> 16	21,9 (12,5 - 34,0)	96,6 (94,8 - 97,9)
> 17	17,2 (8,9 - 28,7)	96,9 (95,2 - 98,2)
> 18	15,6 (7,8 - 26,9)	97,3 (95,6 - 98,4)
> 19	15,6 (7,8 - 26,9)	97,6 (96,0 - 98,7)
> 20	14,1 (6,7 - 25,0)	97,6 (96,0 - 98,7)
> 21	12,5 (5,6 - 23,2)	97,8 (96,2 - 98,8)
> 22	12,5 (5,6 - 23,2)	98,0 (96,4 - 98,9)
> 24	12,5 (5,6 - 23,2)	98,3 (96,9 - 99,2)
> 25	12,5 (5,6 - 23,2)	98,8 (97,6 - 99,5)
> 26	10,9 (4,5 - 21,3)	98,8 (97,6 - 99,5)
> 28	7,8 (2,6 - 17,3)	99,1 (98,0 - 99,7)
> 33	7,8 (2,6 - 17,3)	99,3 (98,3 - 99,8)
> 35	7,8 (2,6 - 17,3)	99,5 (98,5 - 99,9)
> 41	6,2 (1,8 - 15,3)	99,5 (98,5 - 99,9)
> 44**	4,7 (1,0 - 13,1)	99,5 (98,5 - 99,9)
> 46	1,6 (0,3 - 8,4)	99,5 (98,5 - 99,9)
> 48	1,6 (0,3 - 8,4)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 74	0,0 (0,0 - 5,7)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 76	0,0 (0,0 - 5,7)	100,0 (99,4 - 100,0)

\*título que otimiza os valores de sensibilidade e especificidade relativas; totais de *gold standards*: positivos= 64; negativos= 540. Total=650

\*\*ponto de corte para bovinos



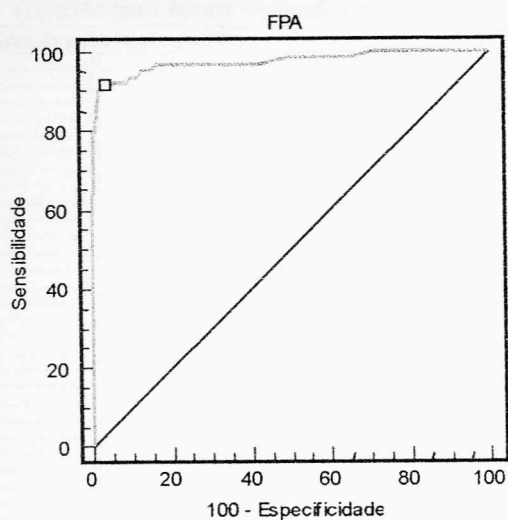


Figura 5 - Curva ROC para o teste PF, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006.

Tabela 5 - Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo unidades de minipolarização (mP) para o teste PF, gerados pela análise ROC, considerando como *gold standard* a combinação do FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

Unidades de polarização do PF	Sr (IC=95%)	Er (IC=95%)
>32	100,0 (94,3 - 100,0)	0,0 (0,0 - 0,6)
>32	100,0 (94,3 - 100,0)	0,2 (0,0 - 1,0)
>35	100,0 (94,3 - 100,0)	0,3 (0,1 - 1,2)
>37	100,0 (94,3 - 100,0)	0,5 (0,1 - 1,5)
>39	100,0 (94,3 - 100,0)	0,7 (0,2 - 1,7)
>44	100,0 (94,3 - 100,0)	0,9 (0,3 - 2,0)
>48	100,0 (94,3 - 100,0)	1,0 (0,4 - 2,2)
>49	100,0 (94,3 - 100,0)	1,2 (0,5 - 2,4)
>50	100,0 (94,3 - 100,0)	1,7 (0,8 - 3,1)
>51	100,0 (94,3 - 100,0)	1,9 (0,9 - 3,3)
>52	100,0 (94,3 - 100,0)	2,0 (1,1 - 3,6)
>53	100,0 (94,3 - 100,0)	2,2 (1,2 - 3,8)
>54	100,0 (94,3 - 100,0)	2,9 (1,7 - 4,6)
>55	100,0 (94,3 - 100,0)	3,4 (2,1 - 5,2)
>56	100,0 (94,3 - 100,0)	4,6 (3,1 - 6,6)
>57	100,0 (94,3 - 100,0)	5,5 (3,8 - 7,6)
>58	100,0 (94,3 - 100,0)	7,8 (5,8 - 10,3)
>59	100,0 (94,3 - 100,0)	8,9 (6,7 - 11,5)
>60	100,0 (94,3 - 100,0)	9,7 (7,5 - 12,4)
>61	100,0 (94,3 - 100,0)	11,3 (8,8 - 14,1)
>62	100,0 (94,3 - 100,0)	12,3 (9,7 - 15,2)
>63	100,0 (94,3 - 100,0)	14,7 (11,9 - 17,8)
>64	100,0 (94,3 - 100,0)	19,1 (16,0 - 22,5)
>65	100,0 (94,3 - 100,0)	23,4 (20,0 - 27,0)
>66	100,0 (94,3 - 100,0)	28,8 (25,2 - 32,7)
>67	98,4 (91,6 - 99,7)	34,3 (30,5 - 38,3)
>68	98,4 (91,6 - 99,7)	42,3 (38,3 - 46,4)
>69	98,4 (91,6 - 99,7)	50,2 (46,0 - 54,3)
>70	96,9 (89,1 - 99,5)	57,8 (53,7 - 61,9)
>71	96,9 (89,1 - 99,5)	64,3 (60,3 - 68,2)
>72	96,9 (89,1 - 99,5)	70,0 (66,1 - 73,7)
>73	96,9 (89,1 - 99,5)	74,9 (71,2 - 78,4)
>74	96,9 (89,1 - 99,5)	78,5 (74,9 - 81,8)
>75	96,9 (89,1 - 99,5)	81,2 (77,8 - 84,3)
>76	96,9 (89,1 - 99,5)	83,8 (80,6 - 86,7)
>77	95,3 (86,9 - 99,0)	85,2 (82,0 - 87,9)
>78	95,3 (86,9 - 99,0)	87,0 (84,0 - 89,6)
>79	95,3 (86,9 - 99,0)	87,4 (84,4 - 90,0)
>80	93,7 (84,7 - 98,2)	88,2 (85,3 - 90,7)
>81	93,7 (84,7 - 98,2)	90,1 (87,4 - 92,4)
>82	93,7 (84,7 - 98,2)	90,4 (87,8 - 92,7)
>83	92,2 (82,7 - 97,4)	91,1 (88,5 - 93,5)
>84	92,2 (82,7 - 97,4)	91,8 (89,3 - 93,9)
>85	92,2 (82,7 - 97,4)	93,0 (90,6 - 94,9)
>86	92,2 (82,7 - 97,4)	93,3 (91,0 - 95,2)
>87	92,2 (82,7 - 97,4)	93,9 (91,6 - 95,7)
>88	92,2 (82,7 - 97,4)	94,4 (92,2 - 96,1)
>89	92,2 (82,7 - 97,4)	95,1 (93,0 - 96,7)
>90	92,2 (82,7 - 97,4)	95,7 (93,8 - 97,2)
>91	92,2 (82,7 - 97,4)	96,6 (94,8 - 97,9)
>92*	92,2 (82,7 - 97,4)	97,1 (95,4 - 98,3)
>93	90,6 (80,7 - 96,5)	97,8 (96,2 - 98,8)
>94	90,6 (80,7 - 96,5)	98,3 (96,9 - 99,2)
>95	87,5 (76,8 - 94,4)	98,3 (96,9 - 99,2)
>97	87,5 (76,8 - 94,4)	98,5 (97,1 - 99,3)
>98	85,9 (75,0 - 93,3)	98,5 (97,1 - 99,3)
>99**	84,4 (73,1 - 92,2)	98,5 (97,1 - 99,3)
>107	84,4 (73,1 - 92,2)	98,6 (97,3 - 99,4)
>112	84,4 (73,1 - 92,2)	98,8 (97,6 - 99,5)
>115	82,8 (71,3 - 91,1)	98,8 (97,6 - 99,5)
>116	82,8 (71,3 - 91,1)	99,0 (97,8 - 99,6)
>117	82,8 (71,3 - 91,1)	99,1 (98,0 - 99,7)
>118	81,2 (69,5 - 89,9)	99,1 (98,0 - 99,7)
>119	79,7 (67,8 - 88,7)	99,1 (98,0 - 99,7)
>128	79,7 (67,8 - 88,7)	99,3 (98,3 - 99,8)
>130	78,1 (66,0 - 87,5)	99,3 (98,3 - 99,8)
>131	76,6 (64,3 - 86,2)	99,3 (98,3 - 99,8)
>132	73,4 (60,9 - 83,7)	99,3 (98,3 - 99,8)
>133	71,9 (59,2 - 82,4)	99,3 (98,3 - 99,8)
>135	70,3 (57,6 - 81,1)	99,5 (98,5 - 99,9)
>136	68,7 (55,9 - 79,8)	99,5 (98,5 - 99,9)
>146	67,2 (54,3 - 78,4)	99,7 (98,8 - 99,9)
>151	65,6 (52,7 - 77,0)	99,7 (98,8 - 99,9)
>153	64,1 (51,1 - 75,7)	99,7 (98,8 - 99,9)
>154	64,1 (51,1 - 75,7)	99,8 (99,0 - 100,0)
>155	62,5 (49,5 - 74,3)	99,8 (99,0 - 100,0)
>156	60,9 (47,9 - 72,9)	99,8 (99,0 - 100,0)
>166	57,8 (44,8 - 70,1)	99,8 (99,0 - 100,0)
>167	57,8 (44,8 - 70,1)	100,0 (99,4 - 100,0)
>169	56,2 (43,3 - 68,6)	100,0 (99,4 - 100,0)
>171	54,7 (41,7 - 67,2)	100,0 (99,4 - 100,0)
>173	53,1 (40,2 - 65,7)	100,0 (99,4 - 100,0)
>178	51,6 (38,7 - 64,2)	100,0 (99,4 - 100,0)
>185	50,0 (37,2 - 62,8)	100,0 (99,4 - 100,0)
>188	48,4 (35,8 - 61,3)	100,0 (99,4 - 100,0)
>192	46,9 (34,3 - 59,8)	100,0 (99,4 - 100,0)
>219	45,3 (32,8 - 58,3)	100,0 (99,4 - 100,0)
>220	43,7 (31,4 - 56,7)	100,0 (99,4 - 100,0)
>224	40,6 (28,5 - 53,6)	100,0 (99,4 - 100,0)
>238	37,5 (25,7 - 50,5)	100,0 (99,4 - 100,0)
>241	35,9 (24,3 - 48,9)	100,0 (99,4 - 100,0)
>244	34,4 (23,0 - 47,3)	100,0 (99,4 - 100,0)
>245	31,2 (20,2 - 44,1)	100,0 (99,4 - 100,0)
>246	29,7 (18,9 - 42,4)	100,0 (99,4 - 100,0)
>248	28,1 (17,6 - 40,8)	100,0 (99,4 - 100,0)
>253	26,6 (16,3 - 39,1)	100,0 (99,4 - 100,0)
>254	23,4 (13,8 - 35,7)	100,0 (99,4 - 100,0)
>255	21,9 (12,5 - 34,0)	100,0 (99,4 - 100,0)
>258	17,2 (8,9 - 28,7)	100,0 (99,4 - 100,0)
>259	15,6 (7,8 - 26,9)	100,0 (99,4 - 100,0)
>263	12,5 (5,6 - 23,2)	100,0 (99,4 - 100,0)
>265	10,9 (4,5 - 21,3)	100,0 (99,4 - 100,0)
>267	6,2 (1,8 - 15,3)	100,0 (99,4 - 100,0)
>268	4,7 (1,0 - 13,1)	100,0 (99,4 - 100,0)
>274	3,1 (0,5 - 10,9)	100,0 (99,4 - 100,0)
>278	1,6 (0,3 - 8,4)	100,0 (99,4 - 100,0)
>303	0,0 (0,0 - 5,7)	100,0 (99,4 - 100,0)

\*título que otimiza os valores de sensibilidade e especificidade relativas; totais de gold standards: positivos= 64; negativos= 540. Total= 650

\*\*ponto de corte para bovinos

Os pontos de corte calculados acima foram utilizados para o cálculo do índice de Kappa de cada teste, frente os mesmos *gold standards*. Kappa é uma medida inter observadora que mede o grau de concordância além do que seria esperado pelo acaso. Tem como valor máximo 1, que representa concordância total. Valores próximos a zero e até zero indicam pouca ou nenhuma concordância, ou seja, a mesma foi casual. Os valores obtidos nos testes podem ser interpretados segundo a tabela 6:

Tabela 6 - Interpretação do teste Kappa segundo Landis e Koch (1977). São Paulo, 2006

Valor do kappa	Interpretação
<0	Não concorda
0-0.19	Concordância ruim
0.20-0.39	Concordância regular
0.40-0.59	Concordância moderada ou boa
0.60-0.79	Concordância substancial ou muito boa
0.80-1.00	Concordância quase perfeita ou ótima

O índice Kappa também foi calculado para os testes qualitativos (AAT, AATE e BPA). Os resultados constam das tabelas 7 a 14.

Tabela 7 - Resultados do teste ELISAC frente à combinação dos testes FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

FC + ME \ ELISAC	Positivo	Negativo	Total
Positivo	61	09	70
Negativo	03	577	580
Total	64	586	650

Kappa=0,900

Tabela 8 - Resultados do teste ELISAI frente à combinação dos testes FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

FC + ME \ ELISAI	Positivo	Negativo	Total
Positivo	44	219	263
Negativo	20	367	387
Total	64	586	650

Kappa=0,132

Tabela 9 - Resultados do teste PF frente à combinação dos testes FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

FC + ME \ PF	Positivo	Negativo	Total
Positivo	59	20	79
Negativo	05	566	371
Total	64	586	650

Kappa=0,804

Tabela 10 - Resultados do teste SLT frente à combinação dos testes FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

FC + ME \ SLT	Positivo	Negativo	Total
Positivo	58	88	146
Negativo	06	498	504
Total	64	586	650

Kappa=0,481

Tabela 11 - Resultados do teste SRP frente à combinação dos testes FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

FC + ME \ SRP	Positivo	Negativo	Total
Positivo	61	428	489
Negativo	03	158	161
Total	64	586	650

Kappa=0,056

Tabela 12 - Resultados do teste AAT frente à combinação dos testes FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

FC + ME \ AAT	Positivo	Negativo	Total
Positivo	61	60	74
Negativo	03	526	530
Total	64	586	650

Kappa=0,609

Tabela 13 - Resultados do teste AATE frente à combinação dos testes FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

FC + ME \ AATE	Positivo	Negativo	Total
Positivo	59	48	107
Negativo	05	538	543
Total	64	586	650

Kappa=0,646

Tabela 14 - Resultados do teste BPA frente à combinação dos testes FC com o ME (critério para fêmea vacinada). São Paulo, 2006

FC + ME \ BPA	Positivo	Negativo	Total
Positivo	63	34	97
Negativo	01	551	552
Total	64	585	649

Kappa=0,753

**5.2 - Análises considerando como *gold standards* positivos os animais positivos para o teste da FC (título $\geq$ 20UI) e para o ME (critério para fêmea não vacinada) e *gold standards* negativos aqueles negativos para o teste da FC (título $<$ 20UI) e para o ME (critério para fêmea não vacinada)**

Os pontos de corte para os testes quantitativos através da análise ROC foram definidos assim, como curvas ROC foram construídas para os testes SRP (figura 6 e tabela 15), SLT (figura 7 e tabela 16), ELISAC (figura 8 e tabela 17), ELISAI (figura 9 e tabela 18), e PF (figura 10 e tabela 19). Como o teste da SLT apresenta a possibilidade de aglutinação completa e incompleta, os títulos das aglutinações incompletas foram considerados como sendo a média aritmética dos títulos inferior e superior. Assim, 25I foi transformado em 12,5, 50I em 37,5 e 100I em 150.

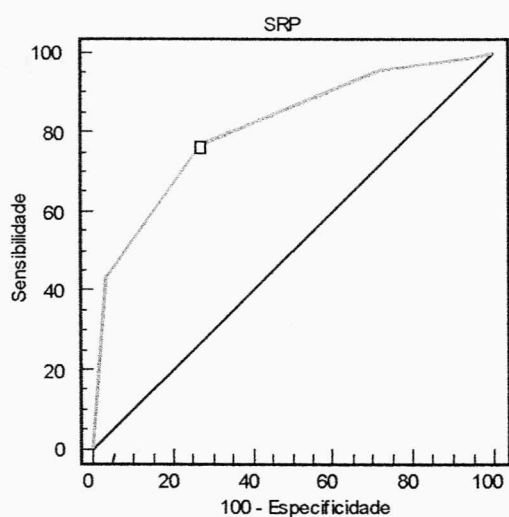


Figura 6 - Curva ROC para o teste SRP, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

Tabela 15: Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo o título de anticorpos para o teste SRP gerados pela análise ROC, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

Título de anticorpos ao SRP	Sr (IC= 95%)	Er (IC= 95%)
0	100,0 (94,3 - 100,0)	5,2 (3,5 - 7,4)
25	98,4 (91,6 - 99,7)	5,2 (3,5 - 7,4)
50*	76,6 (64,3 - 86,2)	73,5 (69,5 - 77,2)
100**	43,7 (31,4 - 56,7)	96,7 (94,8 - 98,0)
200	0,0 (0,0 - 5,7)	100,0 (99,3 - 100,0)

\*título que otimiza os valores de sensibilidade e especificidade relativas; totais de *gold standards*: positivos= 64; negativos= 540. Total= 604

\*\*ponto de corte para bovinos

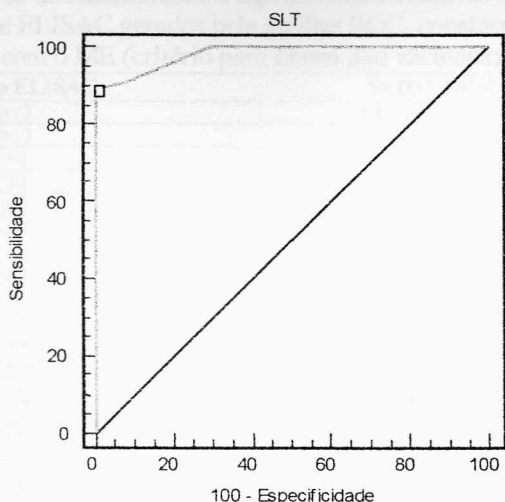


Figura 7 - Curva ROC para o teste SLT, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

Tabela 16 - Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo o título de anticorpos para o teste SLT gerados pela análise ROC, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

Título de anticorpos ao SLT**	Sr (IC= 95%)	Er (IC= 95%)
≥ 0	100,0 (94,3 - 100,0)	0,0 (0,0 - 0,7)
> 0	100,0 (94,3 - 100,0)	66,9 (62,7 - 70,8)
> 12,5	100,0 (94,3 - 100,0)	70,6 (66,5 - 74,4)
> 25	90,6 (80,7 - 96,5)	92,4 (89,8 - 94,5)
> 37,5*	89,1 (78,7 - 95,5)	99,6 (98,7 - 99,9)
> 50	76,6 (64,3 - 86,2)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 75	70,3 (57,6 - 81,1)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 100***	60,9 (47,9 - 72,9)	100,0 (99,3 - 100,0)
> 150	57,8 (44,8 - 70,1)	100,0 (99,3 - 100,0)
> 200	18,8 (10,1 - 30,5)	100,0 (99,3 - 100,0)
> 400	10,9 (4,5 - 21,3)	100,0 (99,3 - 100,0)
> 800	0,0 (0,0-5,7)	100,0 (99,3 - 100,0)

\*título que otimiza os valores de sensibilidade e especificidade relativas; totais de *gold standards*: positivos= 64; negativos:= 540.  
Total= 604

\*\*12,5= 25i, 37,5= 50i, 150= 100i

\*\*\*ponto de corte para bovinos

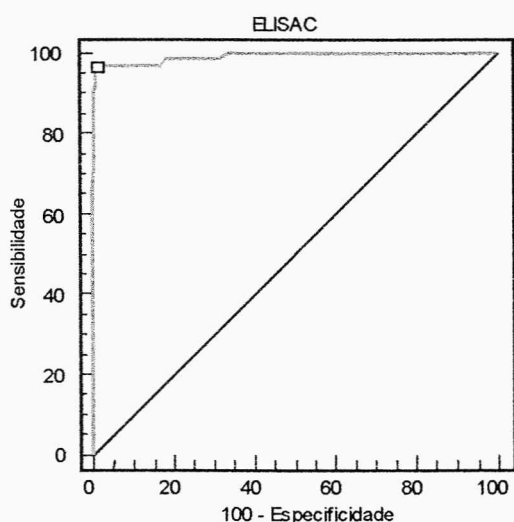


Figura 8 - Curva ROC para o teste da ELISAC, considerando como *gold standard* a combinação do teste da FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

Tabela 17 - Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo percentagem de positividade (PP) para o teste ELISAC gerados pela análise ROC, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

PP no ELISAC	Sr (IC=95%)	Er (IC=95%)
≥ -2	100,0 (94,3 - 100,0)	0,0 (0,0 - 0,7)
> -2	100,0 (94,3 - 100,0)	0,2 (0,0 - 1,0)
> 1	100,0 (94,3 - 100,0)	3,0 (1,7 - 4,8)
> 2	100,0 (94,3 - 100,0)	7,0 (5,0 - 9,5)
> 3	100,0 (94,3 - 100,0)	10,9 (8,4 - 13,9)
> 4	100,0 (94,3 - 100,0)	15,7 (12,8 - 19,1)
> 5	100,0 (94,3 - 100,0)	18,7 (15,5 - 22,3)
> 6	100,0 (94,3 - 100,0)	22,4 (19,0 - 26,2)
> 7	100,0 (94,3 - 100,0)	27,0 (23,3 - 31,0)
> 8	100,0 (94,3 - 100,0)	30,2 (26,3 - 34,3)
> 9	100,0 (94,3 - 100,0)	33,9 (29,9 - 38,1)
> 10	100,0 (94,3 - 100,0)	35,4 (31,3 - 39,6)
> 11	100,0 (94,3 - 100,0)	38,7 (34,6 - 43,0)
> 12	100,0 (94,3 - 100,0)	42,6 (38,4 - 46,9)
> 13	100,0 (94,3 - 100,0)	45,2 (40,9 - 49,5)
> 14	100,0 (94,3 - 100,0)	48,7 (44,4 - 53,0)
> 15	100,0 (94,3 - 100,0)	52,4 (48,1 - 56,7)
> 16	100,0 (94,3 - 100,0)	55,0 (50,7 - 59,3)
> 17	100,0 (94,3 - 100,0)	58,3 (54,0 - 62,5)
> 18	100,0 (94,3 - 100,0)	62,6 (58,4 - 66,7)
> 19	100,0 (94,3 - 100,0)	64,6 (60,4 - 68,7)
> 20	100,0 (94,3 - 100,0)	66,1 (61,9 - 70,1)
> 21	98,4 (91,6 - 99,7)	68,9 (64,8 - 72,8)
> 22	98,4 (91,6 - 99,7)	71,1 (67,1 - 74,9)
> 23	98,4 (91,6 - 99,7)	73,3 (69,4 - 77,0)
> 24	98,4 (91,6 - 99,7)	75,2 (71,3 - 78,8)
> 25	98,4 (91,6 - 99,7)	77,0 (73,3 - 80,5)
> 26	98,4 (91,6 - 99,7)	79,4 (75,8 - 82,8)
> 27	98,4 (91,6 - 99,7)	81,9 (78,3 - 85,0)
> 28	96,9 (89,1 - 99,5)	83,3 (79,9 - 86,4)
> 29	96,9 (89,1 - 99,5)	85,2 (81,9 - 88,1)
> 30	96,9 (89,1 - 99,5)	85,9 (82,7 - 88,7)
> 31	96,9 (89,1 - 99,5)	87,2 (84,1 - 89,9)
> 32	96,9 (89,1 - 99,5)	88,5 (85,5 - 91,1)
> 33	96,9 (89,1 - 99,5)	89,4 (86,5 - 91,9)
> 34	96,9 (89,1 - 99,5)	91,7 (89,0 - 93,9)
> 35	96,9 (89,1 - 99,5)	92,8 (90,3 - 94,8)
> 36	96,9 (89,1 - 99,5)	93,9 (91,5 - 95,8)
> 37	96,9 (89,1 - 99,5)	96,1 (94,1 - 97,6)
> 38	96,9 (89,1 - 99,5)	97,8 (96,1 - 98,8)
> 39	96,9 (89,1 - 99,5)	98,5 (97,1 - 99,4)
> 40	96,9 (89,1 - 99,5)	98,9 (97,6 - 99,6)
> 41*	96,9 (89,1 - 99,5)	99,1 (97,9 - 99,7)
> 45**	93,7 (84,7 - 98,2)	99,3 (98,1 - 99,8)
> 46	92,2 (82,7 - 97,4)	99,3 (98,1 - 99,8)
> 53	90,6 (80,7 - 96,5)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 54	89,1 (78,7 - 95,5)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 64	87,5 (76,8 - 94,4)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 69	85,9 (75,0 - 93,3)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 70	84,4 (73,1 - 92,2)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 74	81,2 (69,5 - 89,9)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 75	79,7 (67,8 - 88,7)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 77	78,1 (66,0 - 87,5)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 78	75,0 (62,6 - 85,0)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 80	73,4 (60,9 - 83,7)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 83	71,9 (59,2 - 82,4)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 85	71,9 (59,2 - 82,4)	99,6 (98,7 - 99,9)
> 87	65,6 (52,7 - 77,0)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 88	64,1 (51,1 - 75,7)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 89	62,5 (49,5 - 74,3)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 90	60,9 (47,9 - 72,9)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 91	59,4 (46,4 - 71,5)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 92	57,8 (44,8 - 70,1)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 93	56,2 (43,3 - 68,6)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 94	45,3 (32,8 - 58,3)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 95	32,8 (21,6 - 45,7)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 96	20,3 (11,3 - 32,2)	100,0 (99,3 - 100,0)
> 97	12,5 (5,6 - 23,2)	100,0 (99,3 - 100,0)
> 98	3,1 (0,5 - 10,9)	100,0 (99,3 - 100,0)
> 99	0,0 (0,0 - 5,7)	100,0 (99,3 - 100,0)

\*título que otimiza os valores de sensibilidade e especificidade relativas; totais de *gold standards*: positivos= 64; negativos:= 534. Total= 604

\*\*ponto de corte para bovinos

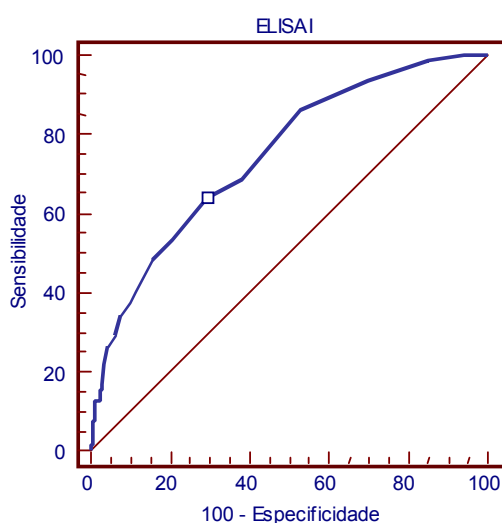


Figura 9 - Curva ROC para o teste ELISAI, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

Tabela 18- Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo o título de anticorpos para o teste ELISAI gerados pela análise ROC, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

<b>Título de anticorpos no ELISAI</b>	<b>Sr (IC=95%)</b>	<b>Er (IC=95%)</b>
> 0	100,0 (94,3 - 100,0)	0,0 (0,0 - 0,7)
> 0	100,0 (94,3 - 100,0)	0,2 (0,0 - 1,0)
> 1	100,0 (94,3 - 100,0)	1,1 (0,4 - 2,4)
> 2	100,0 (94,3 - 100,0)	5,9 (4,1 - 8,3)
> 3	98,4 (91,6 - 99,7)	15,0 (12,1 - 18,3)
> 4	93,7 (84,7 - 98,2)	30,4 (26,5 - 34,4)
> 5	85,9 (75,0 - 93,3)	47,6 (43,3 - 51,9)
> 6	68,7 (55,9 - 79,8)	62,0 (57,8 - 66,1)
> 7*	64,1 (51,1 - 75,7)	71,1 (67,1 - 74,9)
> 8	53,1 (40,2 - 65,7)	79,6 (76,0 - 82,9)
> 9	48,4 (35,8 - 61,3)	84,6 (81,3 - 87,6)
> 10	40,6 (28,5 - 53,6)	88,9 (85,9 - 91,4)
> 11	37,5 (25,7 - 50,5)	90,6 (87,8 - 92,9)
> 12	34,4 (23,0 - 47,3)	92,8 (90,3 - 94,8)
> 13	29,7 (18,9 - 42,4)	93,9 (91,5 - 95,8)
> 14	28,1 (17,6 - 40,8)	94,6 (92,4 - 96,4)
> 15	26,6 (16,3 - 39,1)	95,6 (93,5 - 97,1)
> 16	21,9 (12,5 - 34,0)	96,7 (94,8 - 98,0)
> 17	17,2 (8,9 - 28,7)	97,0 (95,2 - 98,3)
> 18	15,6 (7,8 - 26,9)	97,2 (95,5 - 98,4)
> 19	15,6 (7,8 - 26,9)	97,6 (95,9 - 98,7)
> 20	14,1 (6,7 - 25,0)	97,6 (95,9 - 98,7)
> 21	12,5 (5,6 - 23,2)	97,8 (96,1 - 98,8)
> 22	12,5 (5,6 - 23,2)	98,0 (96,4 - 99,0)
> 24	12,5 (5,6 - 23,2)	98,3 (96,9 - 99,2)
> 25	12,5 (5,6 - 23,2)	98,9 (97,6 - 99,6)
> 26	10,9 (4,5 - 21,3)	98,9 (97,6 - 99,6)
> 28	7,8 (2,6 - 17,3)	99,1 (97,9 - 99,7)
> 33	7,8 (2,6 - 17,3)	99,3 (98,1 - 99,8)
> 35	7,8 (2,6 - 17,3)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 41	6,2 (1,8 - 15,3)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 44**	4,7 (1,0 - 13,1)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 46	1,6 (0,3 - 8,4)	99,4 (98,4 - 99,9)
> 48	1,6 (0,3 - 8,4)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 74	0,0 (0,0 - 5,7)	99,8 (99,0 - 100,0)
> 64	0,0 (0,0 - 5,7)	100,0 (99,3 - 100,0)

\*título que otimiza os valores de sensibilidade e especificidade relativas; totais de *gold standards*: positivos= 64; negativos= 534. Total= 604.

\*\*ponto de corte para bovinos



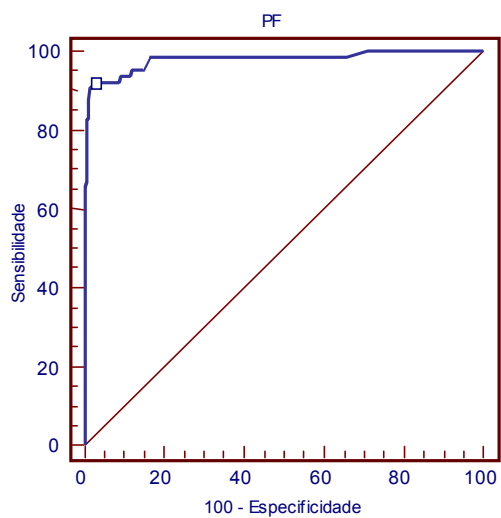


Figura 10- Curva ROC para o teste PF, considerando como *gold standard* a combinação do teste FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

Tabela 19 - Valores de sensibilidade e especificidade relativas segundo o título de anticorpos para o teste da PF gerados pela análise ROC, considerando como *gold standard* a combinação do teste da FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

Unidades de polarização do PF	Sr (IC=95%)	Er (IC=95%)
>35	100,0 (94,3 - 100,0)	0,0 (0,0 - 0,7)
>35	100,0 (94,3 - 100,0)	0,1 (0,0 - 1,0)
>37	100,0 (94,3 - 100,0)	0,4 (0,1 - 1,3)
>39	100,0 (94,3 - 100,0)	0,6 (0,1 - 1,6)
>44	100,0 (94,3 - 100,0)	0,7 (0,2 - 1,9)
>48	100,0 (94,3 - 100,0)	0,9 (0,3 - 2,1)
>49	100,0 (94,3 - 100,0)	1,3 (0,5 - 2,7)
>50	100,0 (94,3 - 100,0)	1,9 (0,9 - 3,4)
>51	100,0 (94,3 - 100,0)	2,0 (1,0 - 3,5)
>52	100,0 (94,3 - 100,0)	2,2 (1,2 - 3,9)
>53	100,0 (94,3 - 100,0)	2,4 (1,3 - 4,1)
>54	100,0 (94,3 - 100,0)	3,1 (1,8 - 5,0)
>55	100,0 (94,3 - 100,0)	3,5 (2,1 - 5,4)
>56	100,0 (94,3 - 100,0)	4,4 (2,9 - 6,5)
>57	100,0 (94,3 - 100,0)	5,0 (3,3 - 7,2)
>58	100,0 (94,3 - 100,0)	7,8 (5,7 - 10,4)
>59	100,0 (94,3 - 100,0)	9,1 (6,8 - 11,8)
>60	100,0 (94,3 - 100,0)	9,4 (7,1 - 12,2)
>61	100,0 (94,3 - 100,0)	11,1 (8,6 - 14,1)
>62	100,0 (94,3 - 100,0)	12,6 (9,9 - 15,7)
>63	100,0 (94,3 - 100,0)	14,6 (11,8 - 17,9)
>64	100,0 (94,3 - 100,0)	19,4 (16,2 - 23,0)
>65	100,0 (94,3 - 100,0)	23,5 (20,0 - 27,3)
>66	100,0 (94,3 - 100,0)	28,9 (25,1 - 32,9)
>67	98,4 (91,6 - 99,7)	34,3 (30,3 - 38,4)
>68	98,4 (91,6 - 99,7)	42,2 (38,0 - 46,5)
>69	98,4 (91,6 - 99,7)	50,0 (45,7 - 54,3)
>70	98,4 (91,6 - 99,7)	58,0 (53,7 - 62,2)
>71	98,4 (91,6 - 99,7)	64,6 (60,4 - 68,7)
>72	98,4 (91,6 - 99,7)	70,2 (66,1 - 74,0)
>73	98,4 (91,6 - 99,7)	75,0 (71,1 - 78,6)
>74	98,4 (91,6 - 99,7)	78,7 (75,0 - 82,1)
>75	98,4 (91,6 - 99,7)	81,1 (77,6 - 84,3)
>76	98,4 (91,6 - 99,7)	83,7 (80,3 - 86,7)
>77	95,3 (86,9 - 99,0)	85,4 (82,1 - 88,2)
>78	95,3 (86,9 - 99,0)	87,4 (84,3 - 90,1)
>79	95,3 (86,9 - 99,0)	87,8 (84,7 - 90,4)
>80	93,7 (84,7 - 98,2)	88,5 (85,5 - 91,1)
>81	93,7 (84,7 - 98,2)	90,6 (87,8 - 92,9)
>82	93,7 (84,7 - 98,2)	90,7 (88,0 - 93,0)
>83	92,2 (82,7 - 97,4)	91,5 (88,8 - 93,7)
>84	92,2 (82,7 - 97,4)	92,0 (89,4 - 94,2)
>85	92,2 (82,7 - 97,4)	93,3 (90,9 - 95,3)
>86	92,2 (82,7 - 97,4)	93,9 (91,5 - 95,8)
>87	92,2 (82,7 - 97,4)	94,4 (92,2 - 96,2)
>88	92,2 (82,7 - 97,4)	94,8 (92,6 - 96,5)
>89	92,2 (82,7 - 97,4)	95,6 (93,5 - 97,1)
>90	92,2 (82,7 - 97,4)	96,3 (94,3 - 97,7)
>91	92,2 (82,7 - 97,4)	97,2 (95,5 - 98,4)
>92*	92,2 (82,7 - 97,4)	97,6 (95,9 - 98,7)
>93	90,6 (80,7 - 96,5)	98,1 (96,6 - 99,1)
>94	90,6 (80,7 - 96,5)	98,5 (97,1 - 99,4)
>95	87,5 (76,8 - 94,4)	98,7 (97,3 - 99,5)
>97	85,9 (75,0 - 93,3)	98,7 (97,3 - 99,5)
>98	84,4 (73,1 - 92,2)	98,7 (97,3 - 99,5)
>104	82,8 (71,3 - 91,1)	98,7 (97,3 - 99,5)
>107	82,8 (71,3 - 91,1)	98,9 (97,6 - 99,6)
>112	82,8 (71,3 - 91,1)	99,1 (97,9 - 99,7)
>115	81,2 (69,5 - 89,9)	99,1 (97,9 - 99,7)
>116	81,2 (69,5 - 89,9)	99,3 (98,1 - 99,8)
>117	81,2 (69,5 - 89,9)	99,4 (98,4 - 99,9)
>118	79,7 (67,8 - 88,7)	99,4 (98,4 - 99,9)
>119	78,1 (66,0 - 87,5)	99,4 (98,4 - 99,9)
>128	78,1 (66,0 - 87,5)	99,4 (98,4 - 99,9)
>130	76,6 (64,3 - 86,2)	99,4 (98,4 - 99,9)
>131	75,0 (62,6 - 85,0)	99,4 (98,4 - 99,9)
>132	71,9 (59,2 - 82,4)	99,4 (98,4 - 99,9)
>133	70,3 (57,6 - 81,1)	99,4 (98,4 - 99,9)
>135	68,7 (55,9 - 79,8)	99,4 (98,4 - 99,9)
>136	67,2 (54,3 - 78,4)	99,4 (98,4 - 99,9)
>146	65,6 (52,7 - 77,0)	99,6 (98,7 - 99,9)
>151	64,1 (51,1 - 75,7)	99,6 (98,7 - 99,9)
>153	62,5 (49,5 - 74,3)	99,6 (98,7 - 99,9)
>154	62,5 (49,5 - 74,3)	99,8 (99,0 - 100,0)
>155	60,9 (47,9 - 72,9)	99,8 (99,0 - 100,0)
>156	59,4 (46,4 - 71,5)	99,8 (99,0 - 100,0)
>166	56,2 (43,3 - 68,6)	99,8 (99,0 - 100,0)
>167	56,2 (43,3 - 68,6)	100,0 (99,3 - 100,0)
>169	54,7 (41,7 - 67,2)	100,0 (99,3 - 100,0)
>171	53,1 (40,2 - 65,7)	100,0 (99,3 - 100,0)
>178	51,6 (38,7 - 64,2)	100,0 (99,3 - 100,0)
>185	50,0 (37,2 - 62,8)	100,0 (99,3 - 100,0)
>188	48,4 (35,8 - 61,3)	100,0 (99,3 - 100,0)
>192	46,9 (34,3 - 59,8)	100,0 (99,3 - 100,0)
>197	45,3 (32,8 - 58,3)	100,0 (99,3 - 100,0)
>219	43,7 (31,4 - 56,7)	100,0 (99,3 - 100,0)
>220	42,2 (29,9 - 55,2)	100,0 (99,3 - 100,0)
>224	39,1 (27,1 - 52,1)	100,0 (99,3 - 100,0)
>238	37,5 (25,7 - 50,5)	100,0 (99,3 - 100,0)
>241	35,9 (24,3 - 48,9)	100,0 (99,3 - 100,0)
>244	34,4 (23,0 - 47,3)	100,0 (99,3 - 100,0)
>245	31,2 (20,2 - 44,1)	100,0 (99,3 - 100,0)
>246	29,7 (18,9 - 42,4)	100,0 (99,3 - 100,0)
>248	28,1 (17,6 - 40,8)	100,0 (99,3 - 100,0)
>253	26,6 (16,3 - 39,1)	100,0 (99,3 - 100,0)
>254	23,4 (13,8 - 35,7)	100,0 (99,3 - 100,0)
>255	21,9 (12,5 - 34,0)	100,0 (99,3 - 100,0)
>258	17,2 (8,9 - 28,7)	100,0 (99,3 - 100,0)
>259	15,6 (7,8 - 26,9)	100,0 (99,3 - 100,0)
>263	12,5 (5,6 - 23,2)	100,0 (99,3 - 100,0)
>265	10,9 (4,5 - 21,3)	100,0 (99,3 - 100,0)
>267	6,2 (1,8 - 15,3)	100,0 (99,3 - 100,0)
>268	4,7 (1,0 - 13,1)	100,0 (99,3 - 100,0)
>274	3,1 (0,5 - 10,9)	100,0 (99,3 - 100,0)
>278	1,6 (0,3 - 8,4)	100,0 (99,3 - 100,0)
>303	0,0 (0,0 - 5,7)	100,0 (99,3 - 100,0)

\*título que otimiza os valores de sensibilidade e especificidade relativas; totais de *gold standards*: positivos= 64; negativos= 534. Total= 604

\*\*ponto de corte para bovinos

Os pontos de corte calculados acima foram utilizados para o cálculo do índice de concordância Kappa de cada teste, frente os mesmos *gold standards*. O índice Kappa também foi calculado para os testes qualitativos (AAT, AATE e BPA). Os resultados constam das Tabelas 20 a 28.

Tabela 20 - Resultados do ELISAC frente à combinação dos testes de FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

<b>FC + ME</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>ELISAC</b>			
Positivo	62	6	68
Negativo	2	534	536
Total	64	540	604

Kappa=0,932

Tabela 21 - Resultados do ELISAI frente à combinação dos testes de FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

<b>FC + ME</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>ELISAI</b>			
Positivo	44	205	249
Negativo	20	335	355
Total	64	540	604

Kappa=0,135

Tabela 22 - Resultados do PF frente à combinação dos testes de FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

<b>FC + ME</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>PF</b>			
Positivo	59	15	74
Negativo	05	525	530
Total	64	540	604

Kappa=0,836

Tabela 23 - Resultados do SLT frente à combinação dos testes de FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

<b>FC + ME</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>SLT</b>			
Positivo	58	41	74
Negativo	06	499	530
Total	64	540	604

Kappa=0,669

Tabela 24 - Resultados do SRP frente à combinação dos testes de FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

<b>FC + ME</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>SRP</b>			
Positivo	61	388	449
Negativo	03	152	155
Total	64	540	604

Kappa=0,064

Tabela 25 - Resultados do AAT frente à combinação dos testes de FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

<b>FC + ME</b> \ <b>AAT</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
Positivo	61	41	102
Negativo	03	499	502
Total	64	540	604

Kappa=0,695

Tabela 26 - Resultados do AATE frente à combinação dos testes de FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

<b>FC + ME</b> \ <b>AATE</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
Positivo	59	30	89
Negativo	05	510	515
Total	64	540	604

Kappa=0,739

Tabela 27 - Resultados do BPA frente à combinação dos testes de FC com o ME (critério para fêmea não vacinada). São Paulo, 2006

<b>FC + ME</b> \ <b>BPA</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
Positivo	63	22	85
Negativo	01	518	519
Total	64	540	604

Kappa=0,824

A tabela 28 mostra os pontos de corte originais dos testes quantitativos utilizados para classificar bovinos como positivos (critério para animais vacinados e não vacinados) (CASAS-OLASCOAGA, 1976) e ponto de corte sugerido pelas análises das curvas ROC. A tabela 29 traz os resultados consolidados para os testes quantitativos avaliados e como seriam esses valores com os respectivos pontos de corte originais dos testes. A tabela 30 mostra os resultados consolidados para os testes quantitativos avaliados e, a tabela 31, traz os resultados dos valores de Kappa dos testes sorológicos quantitativos

Tabela 28 - Pontos de corte dos testes sorológicos quantitativos para diagnóstico da brucelose bubalina, segundo os dois critérios de composição dos *gold standards*. São Paulo, 2006

Teste	Pontos de corte gerados pela curva ROC (fêmeas vacinadas)	Pontos de corte originais (fêmeas vacinadas)	Pontos de corte gerados pela curva ROC (fêmeas não vacinadas)	Pontos de corte originais (fêmeas não vacinadas)
ELISAC	43	40	40	40
PF	92	105	105	105
SLT	50I	200	50I	100
ELISAI	7	45	7	45
SRP	50I	200	50I	100

Legenda - ELISAC- teste imunoenzimático ELISA competitivo; PF- teste de polarização fluorescente; SLT- teste de soroaglutinação lenta em tubos; ELISAI- teste imunoenzimático ELISA indireto; SRP- teste de soroaglutinação rápida em placa

Tabela 29 - Valores de sensibilidades (Sr) e especificidades (Er) relativas dos testes sorológicos quantitativos para diagnóstico da brucelose bubalina, segundo os dois critérios de composição dos *gold standards* e segundo os pontos de corte originais dos testes. São Paulo, 2006

<i>gold standards</i> Teste	Fêmeas vacinadas				Fêmeas não vacinadas			
	Composição dos <i>gold standards</i> - FC (tit $\geq$ 20UI) + ME		Pontos de corte originais		Composição dos <i>gold standards</i> - FC (tit $\geq$ 20UI) + ME		Pontos de corte originais	
	Sr	Er	Sr	Er	Sr	Er	Sr	Er
ELISAC	95,3	98,6	95,3	98,5	96,9	99,1	96,9	98,9
PF	92,2	97,1	84,4	98,5	92,2	97,6	82,8	98,7
SLT	85,9	93,2	18,8	100,0	89,1	99,6	18,8	100,0
ELISAI	64,1	71,8	4,7	99,5	64,1	71,1	4,7	99,4
SRP	76,6	71,7	0,0	100,0	76,6	73,5	0,0	100,0

Legenda - ELISAC- teste imunoenzimático ELISA competitivo; PF- teste de polarização fluorescente; SLT- teste de soroaglutinação lenta em tubos; ELISAI- teste imunoenzimático ELISA indireto; SRP- teste de soroaglutinação rápida em placa

Tabela 30 - Valores de sensibilidades (Sr) e especificidades (Er) relativas dos testes sorológicos qualitativos para diagnóstico da brucelose bubalina, segundo os dois critérios de composição dos *gold standards*. São Paulo, 2006

<i>gold standards</i> Teste	FC (tit $\geq$ 20UI) e + ME (fêmeas vacinadas)		FC (tit $\geq$ 20UI) e + ME (fêmeas não vacinadas)	
	Sr	Er	Sr	Er
BPA	98,4%	94,2%	98,4%	95,9%
AAT	95,3%	91,8%	95,3%	94,4%
AATE	92,2%	89,8%	92,2%	92,4%

Legenda: AAT- teste do antígeno acidificado tamponado; BPA - teste do antígeno brucélico ácido tamponado para teste de soroaglutinação; AATE – teste do antígeno acidificado tamponado europeu.

Tabela 31 - Valores de Kappa dos testes sorológicos quantitativos para diagnóstico da brucelose bubalina, segundo os dois critérios de composição dos *Gold standards*. São Paulo, 2006

Teste	<i>Gold standard: FC e ME (fêmeas vacinadas)</i>	<i>Gold standard: FC e ME (fêmeas não vacinadas)</i>
<b>ELISAC</b>	0,900	0,932
<b>PF</b>	0,804	0,836
<b>BPA</b>	0,753	0,824
<b>AATE</b>	0,646	0,739
<b>AAT</b>	0,609	0,695
<b>SLT</b>	0,481	0,669
<b>ELISAI</b>	0,132	0,135
<b>SRP</b>	0,056	0,064

Legenda - ELISAC- teste imunoenzimático ELISA competitivo; PF- teste de polarização fluorescente; SLT- teste de soroaglutinação lenta em tubos; ELISAI- teste imunoenzimático ELISA indireto; SRP- teste de soroaglutinação rápida em placa; AAT- teste do antígeno acidificado tamponado; BPA - teste do antígeno brucélico ácido tamponado para teste da soroaglutinação; AATE – teste do antígeno acidificado tamponado europeu.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem apenas comparar o desempenho dos testes AAT, AATE, BPA, SLT, SRP, ELISAI, ELISAC e PF frente aos *gold standards* estabelecidos e classificar suas performances de modo a indicar quais os testes mais promissores para a espécie bubalina. São duas as razões dessa afirmação:

A primeira delas é o fato de não se saber ao certo se os animais foram ou não vacinados, o que foi descrito no material e métodos como vacinação irregular. Esse viés foi contornado através da realização de duas séries de análises, admitindo-se as duas condições.

A segunda razão é o fato dos *gold standards* serem baseados exclusivamente em sorodiagnóstico, em verdade numa combinação de dois testes (ME e FC). O teste ME possui uma faixa de resultados considerados inconclusivos. Esses resultados foram excluídos das análises. A consequência disso é que os *gold standards* ajudaram os testes, pois os grupos *gold standards* positivos e negativos foram construídos com rigor, eliminando soros de vários animais que se encontravam na área de sombra para o teste do ME. O ideal seria compor esses grupos com base em diagnóstico de certeza da brucelose. Entretanto, como o critério adotado foi o mesmo para todos os testes, os resultados permitem comparar seus desempenhos entre si.

O primeiro fato que chama a atenção é o resultado das análises das curvas ROC para estimar os pontos de corte dos testes quantitativos, observados na tabela 29, que traz os resultados consolidados para os testes quantitativos avaliados. Os resultados obtidos sugerem que para determinados testes há necessidade de se estabelecer pontos de corte específicos bubalinos.

Os pontos de corte para se classificar um bovino como positivo pelo SLT é de  $\geq 100$  (critério para animais vacinados) ou  $\geq 200$  (critério para animais não vacinados) (CASAS-

OLASCOAGA, 1976). Os resultados obtidos mostraram que se o mesmo critério for adotado para bubalinos a sensibilidade e a especificidade relativas seriam de 18,8% e 100,0% para os dois *gold standards* adotados (tabela 29). Para essas duas condições, o ponto de corte sugerido pelas análises foi de 50I, resultando em boa combinação de valores sensibilidade e especificidade relativas, respectivamente 85,9% e 89,1% e 93,2% e 99,6% (tabela 29). Houve ganhos substanciais em sensibilidade sem perder em especificidade.

O manual do ELISAI (INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE AND HEALTH, 2000) recomenda a adoção de porcentagem de positividade  $\geq 45\%$  para classificar bovinos como positivos. Os resultados do presente experimento mostraram que se o mesmo critério adotado para bovinos for adotado para bubalinos a sensibilidade relativa será inferior a 4,7% e a especificidade relativa inferior a 99,4%, para os dois *gold standards* adotados (tabela 29). Para essas duas condições, o ponto de corte sugerido pelas análises foi de 7, resultando em valores sensibilidade e especificidade relativas entre 64,1% e 71,8% e 71,1% (tabelas 4, 18 e 29).

Para o ELISAC, não foi verificada grande diferença entre o ponto de corte recomendado por Nielsen et al. (2000) para bovinos (PP  $\geq 40\%$ ) e o obtido no presente estudo (PP  $\geq 43\%$  ou  $\geq 41\%$ , para vacinados e não vacinados, respectivamente). Esses pontos de corte, para os dois critérios de *gold standards* adotados, resultaram em valores sensibilidade de 95,3% e 96,9% e especificidade relativas de 98,6% e 99,1% (tabela 29). Se fossem utilizados os pontos de corte recomendado, os valores de sensibilidade e especificidade relativas seriam 95,3% e 96,9% e especificidade relativas de 98,5% e 98,9% (tabela 29).

Para o PF, Nielsen et al. (1996) recomendaram  $\geq 92$  unidades de minipolarização (mP) e Samartino et al. (1999 b) 105 mP. No presente experimento o ponto de corte foi de 92, resultando em valores de sensibilidades relativas de 92,2% e especificidades relativas de 97,1% e 97,6% (tabela 29). Caso fosse adotado o critério de  $>99$ , esses valores seriam, respectivamente de 84,4% e 98,5%.



Portanto, esses resultados sugerem que os pontos de corte do ELISAC e PF para bovinos e bubalinos podem ser os mesmos (ponto de corte para bovinos adotado por Nielsen et al. (1996). Porém, para o SLT, SRP e ELISAI, os pontos de corte para bubalinos devem ser revistos. Importante ressaltar que o estabelecimento desses pontos de corte deverá ser feito em ensaios com *gold standards* baseados em diagnóstico direto.

Para permitir que os testes qualitativos sejam comparados entre si e com os quantitativos, no referente às suas características intrínsecas, foi construída a tabela 30, com base nas tabelas 25, 26 e 27. Os valores de sensibilidade e especificidade relativas encontrados para o AAT e AATE são muito próximos e mantêm-se dentro das variações observadas por outros autores (quadro 1).

Os valores de sensibilidade e especificidade relativas para os testes qualitativos e quantitativos verificadas no presente estudo estão contidos dentro dos valores máximos e mínimos do quadro 1, exceto para as situações abaixo enumeradas.

As especificidades relativas verificadas para o BPA (tabela 30) são levemente inferiores aos relatados por Vanzini et al. (1998) e Uzal et al. (1996) e superior àquela relatada por Fosgate et al. (2002), respectivamente de 98,6% e 97,6% e 90,7%, salientando que o último autor trabalhou com bubalinos. Vanzini et al. (1998) utilizaram como *gold standards* negativos 2.646 amostras de soro de fêmeas bovinas provenientes de rebanhos livres de brucelose por no mínimo cinco anos e constataram especificidade relativa do BPA em relação ao FC de 98,6%. Uzal et al. (1996) estudaram 501 soros de fêmeas bovinas adultas regularmente vacinadas com a B19 e negativas ao AAT e ME e obtiveram especificidade relativa de 97,6% para o BPA. Os mesmos autores obtiveram 100% de especificidade relativa do BPA quando examinaram 235 soros de fêmeas não vacinadas provenientes de rebanhos livres de brucelose. Fosgate et al. (2002) examinaram 381 soros bubalinos provenientes de rebanhos livres e infectados nos quais realizaram SRP, TC, BPA e SLT e a partir de

abordagem baiesiana verificou especificidade relativa de 90,7% para o BPA.

A especificidade relativa do SRP verificada no presente experimento foi de 76,6% (tabela 29), muito inferior à de 86,3%, relatada por Molnár et al. (2002) e 99,3% por Fosgate (2002), a despeito de também terem sido calculadas para a espécie bubalina. Molnár et al. (2002) estudaram 440 soros bubalinos e utilizou como *gold standard* os resultados do ELISAC, fornecido pela FAO/IAEA, composto por anticorpos monoclonais M84, com ponto de corte de 40% de PP, seguindo recomendação de Nielsen et al. (1995). Fosgate et al. (2002) examinaram 381 soros bubalinos provenientes de rebanhos livres e infectados nos quais realizaram SRP, TC, BPA e SLT e a partir de abordagem baiesiana verificou especificidade de 99,3% para o SRP.

As sensibilidades relativas do SLT verificadas no presente estudo (Tabela 29) foram bastante superiores à relatada por Fosgate et al. (2002), de 75,0%. Esses autores examinaram 381 soros bubalinos provenientes de rebanhos livres e infectados nos quais realizaram SRP, TC, BPA e SLT e calcularam a sensibilidade a partir de abordagem baiesiana. Nielsen e Duncan (1990) obtiveram sensibilidade de 70,4%, porém para bovinos.

O ELISAI apresentou valores de sensibilidade e especificidade relativas (tabela 29) inferiores a 98,57% e 97,33%, respectivamente, relatado por Molnár et al. (2002). Esses autores examinaram 440 soros bubalinos e elegeram como *gold standard* o ELISAC. Paulin et al. (2004) e Samartino et al. (1999a), que relataram valores sensibilidade e especificidade superiores a 93,7%, além de terem trabalhado com bovinos, adotaram pontos de corte diverso (PP de 45% e 40 %, respectivamente).

Essa baixa sensibilidade relativa pode ter sido resultado do conjugado utilizado no presente experimento, composto por anticorpos policlonais antiespécie bovina. Os isotipos da molécula do anticorpo IgG<sub>1</sub> da espécie bovina apresentam pequenas variações em relação ao isotipo da molécula do anticorpo IgG<sub>1</sub> de bubalinos. Acredita-se que possam ocorrer reações

cruzadas entre as duas espécies. Todavia, nesse caso, as variações entre os isotipos da molécula de anticorpo responsáveis por essas reações interespecie deveriam ser determinadas. Conforme Dra. Olga Mariño<sup>1</sup>, o ideal seria produzir um conjugado específico para o anticorpo monoclonal da classe IgG<sub>1</sub> antiespecie bubalina, o que poderia melhorar a qualidade do ELISAI (informação verbal). Guarino et al. (2001) e Molnár et al. (2002), utilizaram conjugados anti anticorpo IgG<sub>1</sub> bubalino e, de fato, obtiveram valores de sensibilidade (100,0% e 98,6%, respectivamente) e especificidade (98,6% e 97,3%, respectivamente) relativas superiores.

Quanto ao ELISAC, o conjugado empregado (soro monoclonal de roedor anti-CO marcado com peroxidase) é direcionado contra a CO, razão pela qual, quando se aplica o teste, não há diferença de resultados entre soros de espécies distintas, pois o que se reconhece é uma parte da estrutura da parede bacteriana. O anticorpo do bubalino competirá com o anticorpo monoclonal que se liga ao antígeno adsorvido na placa. Se este soro possuir anticorpos, o anticorpo monoclonal ficará livre e não haverá produção de cor.

No presente trabalho, o ELISAC apresentou valores de sensibilidade e especificidade relativas (tabela 29) ligeiramente inferiores aos relatados pelos autores constantes do quadro 1. Nielsen e Gall (1998) e Samartino et al. (1999a) trabalharam com bovinos. Mathias et al. (1998) e Molnár et al. (2002) com bubalinos. Embora esses autores tenham elegido pontos de corte pouco superiores aos aqui adotados ( $PP \geq 40$ ), essa pequena diferença nos valores podem ter sido decorrentes das diferentes estratégias adotadas para a composição dos *gold standards*. Em relação ao PF, as sensibilidades e especificidades relativas foram semelhantes às encontradas por Dajer et al. (1999), Nielsen et al. (1996), Nielsen et al. (1998), Nielsen et al. (1999) e Samartino et al. (1999 b) (quadro 1), comprovando ser este teste também muito bom para a espécie bubalina.

---

Informações fornecidas por Dra. Olga Mariño em 2006 no 12<sup>th</sup> International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Montevideo, 2005.

Portanto, a comparação dos valores sensibilidade e especificidade relativas obtidos no presente trabalho com aqueles obtidos por outros autores deve ser feita com cautela, pois existem diferenças quanto à composição dos *gold standards* e pontos de corte adotados. Até variações de técnica devem ser consideradas. Ainda assim, os resultados obtidos sugerem que as melhores combinações de sensibilidade e especificidade relativas foram alcançadas pelo ELISAC, PF, BPA e AAT.

A tabela 31 traz os resultados do Kappa para os dois conjuntos de *gold standards*, com base nas tabelas 7 a 14 (critério para fêmeas vacinadas) e 20 a 28 (critério para fêmeas não vacinadas).

Os valores de Kappa verificados para o ELISAC (0,900 e 0,932, tabelas 7 e 20) foram levemente inferiores aos relatados por Mathias et al. (1998), e Samartino et al. (1999 a) e Vanzini et al. (1998), respectivamente de 0,970, 0,980 e 0,980. Mathias et al. (1998), os únicos que trabalharam com bubalinos, analisaram 455 amostras de soros de fêmeas e estabeleceram como *gold standard* positivo os animais com resultados positivos no AAT e no FC e negativos os animais com resultados negativos nesses dois testes. Vanzini et al. (1998) e Samartino et al. (1999 a) trabalharam com bovinos.

Os valores de Kappa verificados para o PF (0,804 e 0,836, tabelas 9 e 22) foram levemente inferiores a 0,96 relatado por Dajer et al. (1999). Importante ressaltar que esses autores trabalharam com bovinos e compuseram os *gold standards* exclusivamente com o FC. A condição vacinal era desconhecida.

Os valores de Kappa verificados para o BPA (0,753 e 0,824, tabelas 14 e 27) foram levemente inferiores aos relatados por Uzal et al. (1996) e Vanzini et al. (1998), respectivamente de 0,971 e 0,960. Vale lembrar que ambos estudos foram realizados com bovinos.

Os valores de Kappa verificados para o AAT (0,609 e 0,695, tabelas 12 e 25) foram

inferiores aos relatados por Dajer et al. (1999), Molnár et al. (2002) e Pinto et al. (2005), respectivamente de 0,700, 0,845 e 0,927. Molnár et al. (2002) estudaram 440 amostras de soros bubalinos e compuseram os testes de *gold standards* com base, exclusivamente, nos resultados do ELISAC. Pinto et al. (2005) analisaram 90 soros de fêmeas bubalinas adultas e não vacinadas e estabeleceram os *gold standards* da mesma forma que o presente estudo, conforme recomendação de Martin et al. (1987). Dajer et al. (1999), conforme já referido, trabalharam com bovinos.

Os valores de Kappa verificados para o ELISAI (0,132 e 0,135, tabelas 8 e 21) foram muito inferiores aos relatados por Molnár et al. (2002) e Samartino et al. (1999), respectivamente de 0,912 e 0,980. Molnár et al. (2002), os únicos que trabalharam com bubalinos, utilizaram conjugado diverso daquele empregado no presente estudo, mais apropriado para bubalinos, conforme já exposto acima.

Os valores de Kappa verificados para o SRP (0,056 e 0,064, tabelas 11 e 24) foram muito inferiores a 0,543, relatado por Molnár et al. (2002). Vale lembrar que esses autores basearam seus *gold standards* no ELISAC, exclusivamente.

Na literatura consultada não foram encontrados valores de Kappa para o SLT.

Analisando os resultados de Kappa contidos na tabela 31, verificamos que, neste estudo, os melhores resultados, respectivamente para critério de animais vacinados e não vacinados, foram os do ELISAC (0,9 e 0,932 - ótimos), seguidos do PF (0,804 e 0,836 - ótimos), BPA (0,753 e 0,824 - bons), AATE (0,646 e 0,739 - bons) e AAT (0,609 e 0,695 - bons).

Assim, se analisarmos os resultados de Kappa (tabela 31), os resultados de sensibilidade e especificidade relativas (tabela 29) e a facilidade de realização dos testes, podemos concluir que o BPA, o AAT e o AATE são os melhores testes para o diagnóstico de triagem em bubalinos e que o ELISAC e o PF são os testes mais promissores para o

diagnóstico confirmatório nessa espécie, pois ganhos adicionais de especificidade podem ser alcançados pelo simples aumento do ponto de corte.

## 7. CONCLUSÕES

1. Os resultados dos estudos com os testes ELISAC e PF em bovinos podem ser inferidos para bubalinos com uma razoável segurança.
2. Devem ser estabelecidos pontos de corte específicos para bubalinos para os testes SLT, SRP e ELISAI.
3. As melhores combinações de sensibilidade e especificidade relativas foram alcançadas pelos testes ELISAC, PF, BPA e AAT.
4. Os melhores resultados de Kappa foram verificados para o ELISAC (0,9 e 0,932 - ótimos), seguidos do PF (0,804 e 0,836 - ótimos), do BPA (0,753 e 0,824 - muito bom e ótimo), do AATE (0,646 e 0,739 – muito bons) e do AAT (0,609 e 0,695 – muito bons).
5. O BPA, o AAT e o AATE foram os melhores testes para o sorodiagnóstico de triagem em bubalinos e o ELISAC e o PF foram os testes mais promissores para o diagnóstico confirmatório nessa espécie, já que ganhos adicionais de especificidade podem ser alcançados pelo simples aumento do ponto de corte.

## REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B.; BRUCELOSIS, In: ACHA, P. N.; SZYFRES, B. (Ed.). **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales** Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986. p.14-35. (Publicación Científica 503).
- ADAMS, L. G. Development of live Brucella vaccines. In: ADAMS, L.G. (Editor). **Advances in brucellosis research**. Austin: Texas A&M University Press, College Station, 1990. p. 251-276.
- ALLAN, G. S.; CHAPPEL, R. J.; WILLIAMSON, P.; MACNAUGHT, D. J. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. **Journal of Hygiene of Cambridge**, v. 76, p. 287-298, 1976.
- 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. 545 p.
- 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 tests. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, n. 2, p. 57-63, 1978.
- ANGUS, R. D.; BARTON, C. The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in the presumptive test for brucellosis. **Development Biological Standard**, v. 56, p. 349-358. 1984.
- BARUSELLI, P. S. Manejo reprodutivo de bubalinos. (S.l.): Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1993. 46 p. (Manual Técnico).
- BATHKE, W.; BRUCELOSIS. In: BEER, J. (Ed.). **Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose**. São Paulo: Roca, 1988, v. 2, p. 144-160.
- BEDFORD, C. A.; HARRISON, F. A.; HEAP, R. B. The metabolic clearance rate and production rate of progesterone and the conversion of progesterone to 20 -hydroxypregn-4-en-3-one in the sheep. **The Journal of Endocrinology**, v. 55, n. 1, p. 105-118, 1972.
- BEER, J. (Ed.). **Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose**. São Paulo: Roca, 1988. v. 2, p. 144-160.
- 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.
- BISHOP, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J. A. N.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. (Ed.). **Infectious diseases of Livestock**, Austin: Texas A&M University Press, College Station, 1994. v. 2, p.1053-1066.



BRANDON, M. R.; WATSON, D. C.; LASCELLES, A. K. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 49, p. 613-623, 1971.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. Portaria número 23. **Boletim do Serviço de Defesa Sanitária Animal, número especial**, 1976. 8 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. As doenças dos animais no Brasil: histórico das primeiras observações. **Boletim do Serviço de Defesa Sanitária Animal, número especial**, 1988. 101p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento (MAPA). Planos e Programas. Programas. Área Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCBT)**. Instrução Normativa do Serviço Nacional Animal número 6, de oito de janeiro de 2004. Regulamento PNCEBT. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2004.

BREW, S. D.; PERRETT, L. L.; STACK, J. A.; MACMILLAN, A. P.; STAUNTON, N. J. Human exposure to Brucella recovered from a sea mammal. **The Veterinary Record**, v. 144, n. 17, p. 483, 1999.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 435-436, 2002.

BUBBALIFE. Búfalos. Disponível em: <<http://www.bubbalife.com.br.html>>. Acesso em: 02 jan. 2005.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. Brucella. In: CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. (Ed.). **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4. ed. Philadelphia: London, 1991. p. 196-201.

CASAS-OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis animal. Boletín do Centro Panamericano de Zoonosis. **Oficina Sanitaria Panamericana, Organización Mundial de La Salud**, v. 18 n. 3/4, p. 107-139, 1976.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Elaboración y normatización de antígenos para las pruebas de sero-aglutinación de la brucelosis**. Ramos Mejía: Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, 1969, 21 p. Nota Técnica n. 3, rev. 3.

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

CLOECKAERT, A.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; PAQUET J. Y.; GARIN-BASTUJI, B.; FOSTER, G; GODFROID, J. Classification of brucella spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. **Microbes Infectology**, v. 3 n. 9, p. 729-738, 2001.

CORBEL, M. J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. **Veterinary Bulletin**, v. 55, n. 12, p. 927-942, 1985.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING ZOOSES, EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 1., 1997, Jerusalem. **Proceedings...** v. 3, n. 2, p. 213-221.

DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E.; ZAPATA, D.; VILLEGAS, S.; GUTIÉRREZ, E.; PEÑA, G.; GURRÍA, F.; NIELSEN, K.; GALL, D. Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, n. 3-4, p. 67-73, 1999.

DAS, L. V. M.; PARANJAPE, V. L.; CORBEL, M. J. Investigation of brucellosis-associated abortion in dairy buffaloes and cows in Bombay. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 60, n. 10, p. 1193-1194, 1990.

DAVIES, G. The Rose Bengal test. **The Veterinary Record**, v. 88, p. 447-449, 1971.

DOHOO, I. R.; WRIGTH, P. F.; RUCKERBAUER, R.; SAMAGH, B. S.; ROBERTSON, F. J.; FORBES, L. B. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 485-493, 1986.

EWALT, D. R.; PAYEUR, J. B.; MARTIN, B. M.; CUMMINS, D. R.; MILLER, W. G. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 4, p. 448-452, 1994.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MediSci Press, 1999. 272 p.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Bovine brucellosis**. Health, diseases cards. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 23 de maio de 2005.

FOSGATE, G. T.; ADESIYUN, A. A.; HIRD, D. W.; JOHNSON, W. O.; HIETALA, S. K.; SCHURIG, G. G.; RYAN, J. Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n.11, p. 1473-1608, 2002.

GARCÍA-CARRILLO, C. **Animal and human brucellosis in the Americas**. Paris: Office Internationale Epizootique, 1990. 299 p.

GENTILE, A. Sulla brucellosi del bufali. **Veterinaria Italiana**, v. 18, p. 591-596, 1957.

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

HILL, W. K. Standardization of the complement fixation test for brucellosis, **Bulletin Office Internationale Epizootique**, v. 12, p.401, 1963.

INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE AND HEALTH. *Ceditest*<sup>®</sup> *Brucella abortus*. ELISA for detection of antibodies against *Brucella abortus* in bovine serum and milk. Lelystad: I. A. S. H., 2000. 9 p.

HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B.; MORAES, Z. M.; VEIGA, J. B.; LAU, H. D.; TOURRAND, J. F.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Some zoonosis in the Eastern Amazon. Case of Uruará, Brazil. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL HYGIENE, 10., 2000, Maastricht. **Proceedings...** p. 204-210.

HUBER, J. D.; NICOLETTI, P. Comparison of the results of card, RIV, complement fixation, and milk ring tests with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 1529-1531, 1986.

HUNTER, D.; ALLEN, J. An evaluation of milk and blood test used to diagnose brucellosis. **The Veterinary Record**, v. 91, p. 310-312, 1972.

INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE AND HEALTH. *Ceditest*<sup>®</sup> *Brucella abortus*. ELISA for detection of antibodies against *Brucella abortus* in bovine serum and milk. Lelystad: I. A. S. H., 2000, 9 p.

JORGE, A. M. Fazendas de ensino, pesquisa e produção – bubalinos. Botucatu: UNESP, [2000]. (Folder).

KEPPIE, J.; WILLIAMS, A. E.; WITT, K; SMITH, H. The role of erythritol in the tissue localization of the *brucellae*. **Microbiological Research Establishment**, Porton, v. 10, p. 104-108, 1964.

KRUZE, M.V. Métodos de diagnóstico en el control de brucelosis bovina. II. Métodos serológicos. **Archives of Medicine Veterinary**, v.7, n.2, p.52 - 64, 1975.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, n. 33, p. 159-174, 1977.

MANUAL MERCK, Seção 17, infecções. Capítulo 177. Infecções bacilares. Brucelose. Disponível em: <<http://www.manualmerck.com>>. Acesso em: 12 dez. 2004.

MARIÑO, J. O. C; GALLEGO, M.; 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. 120-130.

MARQUES, J. R. F.; CARDOSO, L. S. A bubalinocultura no Brasil e no Mundo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUBALINOCULTURA, 1., 1997, **Anais...** Cruz das Almas: Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 1997. p. 210-221.

MARTIN, S. W., MEEK, A. H., WILLEBERG, P. Veterinary epidemiology: principles, and methods. Ames: Iowa State, University Press, 1987. 343 p.

MATHIAS, L. A.; GIRIO, R. J. S.; DEL FAVA, C. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico da brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n.3-4, p. 111-114, 1998.

MATHIAS, L. A.; PINTO, A. A. Serological diagnosis of brucellosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **International Journal of Zoonosis**, v. 10, n. 2, p. 122-126, 1983.

METCALF, H. E.; LUCHSINGER, D. W.; RAY, W. C. Brucellosis. In: BERAN, G. W.; STEELE, J. H. (Ed.). **Handbook series in zoonosis. Section A: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial, and Mycotic**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 9-39.

METZ, C. E. Basic principles of ROC analysis. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 8, n. 8, p. 283-298, 1978.

MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. **Standard laboratory techniques for brucellosis diagnosis**. New Haw: Central Veterinary Laboratory, 1991. 48 p.

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. 41-44, 2002.

MORENO, C.; ROJAS, N.; NIELSEN, K.; GALL, D. Comparison of different serological assays for the differential diagnosis of brucellosis. In: COLLING, A. (Ed.). **Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America**. Viena: International Atomic Energy Agency, IAEA-TECDOC-1055, 1998, p. 153-161.

MOTTA, P. M. C.; LEITE, R. C.; LOPES, L. B.; AMARAL, F. R.; PREDO, P. E. F.; LAGE, A. P. Brucelose e tuberculose em oito rebanhos de núcleo de bubalinos de Luz das Dores do Indaiá. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2002, Belo Horizonte. **Resumos...** p. 104.

NICOLETTI, P. Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, p. 1811-1816, 1969.

NICOLETTI, P. The serologic diagnosis of brucellosis in buffaloes. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 1985, Cairo. **Proceedings...** p. 830-833.

NICOLETTI, P. An evaluation of serological tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Tropical Animal Health and Production**, v. 24, n. 1, p. 40-44, 1992.

NICOLETTI, P.; MURASCHI, T. F. Bacteriologic evaluation of serologic test procedures for the diagnosis of brucellosis in problems cattle herds. **American Journal of Veterinary Research**, v. 27, p. 689-694, 1966.

NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. **Archives of Medicine Veterinary**, v. 28, p. 9-17, 1995. Extraordinary.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 447-459, 2002.

NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 453 p.

NIELSEN, K.; GALL, D. Summary of field trials using the indirect and competitive enzyme immunoassays for detection of antibody to *Brucella abortus*. In: COLLING, A. (Ed.). **Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America**. Viena: International Atomic Energy Agency, IAEA-TECDOC-1055, 1998, p. 107-111.

NIELSEN, K.; GALL, D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. **Journal of Immunoassay Immunochemistry**, v. 22, n. 3, p. 183-201, 2001.

NIELSEN, K.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN, G.; BALSEVICIUS, S.; SMITH, NICOLETTI, P.; THOMAS, F. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. **Journal of Immunological Methods**, v. 195, p. 161-168. 1996.

NIELSEN, K.; GALL, D.; LIN, M.; MASSANGILL, C.; SAMARTINO, L. E.; PEREZ, B.; COATS, M.; HENNAGER, S.; DAGER, A.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 66, p. 321-329, 1998.

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; BERMUDEZ, R.; MORENO, F.; RENTERIA, T.; RUIZ, A.; APARICIO, L.; VAZQUEZ, S.; DAGER, A.; LUNA-MARTINEZ, E.; SAMARTINO, L. E.; HALBERT, G. Evaluation of serological tests for detection of caprine antibody to *Brucella melitensis*. **Small Ruminant Research**, v. 56, p. 253-258, 2005.

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; VIGLIOCCO, A.; PEREZ, B.; SAMARTINO, L. E.; NICOLETTI, P.; DAGER, A.; ELZER, P.; ENRIGHT, F. Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presuntive diagnosis of porcine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, n. 68, p. 245-253, 1999.

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HENEGHAN, T.; MCNAMARA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROLL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L. E.; DAGER, A.; LUNA-MARTINEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Veterinary Microbiology**, v. 21, n. 80, p. 163-170, 2001.

NIELSEN, K.; HECH, F.; WAGNER, G.; STILLER, J.; ROSENBAUM, B.; PUGH, R.; FLORES, E. Comparative assessment of antibody isotopes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assays. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, p. 197-204, 1984.

NIELSEN, K.; KELLY, L.; GALL, D.; NICOLETTI, P.; KELLY, W. Improved CELISA for the diagnosis of bovine brucellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, p. 285-295, 1995.

OGASSAWARA, S.; CURY, R.; D'APICE, V. B.; MENDES, M. F. M.; ROCHA, U. F. Higroma articular brucélico em búfalo, *Bubalus bubalis* (Linneu, 1758). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, n. 36, p. 117-121, 1969.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis**. Ginebra, 1986, 149 p. Série de informes técnicos, 740.

OIE. ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIA. **Bovine brucellosis**. Article 2.3.1.1. Terrestrial Animal Health Code 2005, Part 2, Section 2.3, chapter 2.3.1. Disponível em: <<http://www.oie.int.htm>>. Acesso em: 23 set. 2005.

PACHECO, G; MELLO, M. T. **Brucelose**. Rio de Janeiro: Livraria Ateneu, 1956, 727 p.

PAULIN, L. M. S.; PRADO, G. E. S.; FEDERSONI, I. S. P.; TEIXEIRA, A. C.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E. Estudo comparativo dos testes 2-mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 4, p.41-47, 2002.

PAULIN, L. M. S.; CONDE, S. B.; FEDERSONI, I. S. P.; PACHECO, W. A.; SAMARTINO, L. E. Comparación de pruebas utilizadas en el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina frente a la prueba de fijación de complemento. In: CONGRESO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 19., 2004, Buenos Aires. **Anais...** p. 41-47, RES. 491.

PAULIN, L. M. S.; CONDE, S. B.; PACHECO, W. A.; FEDERSONI, I. S. P.; CAMPELO, A. C.; SAMARTINO, L. E. Estudio comparativo de la prueba de polarización fluorescente y la de fijación de complemento para el diagnóstico serológico de la brucelosis en búfalos (*Bubalus bubalus*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE WORLD ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS, 12., 2005, Montevideo. **Anais...** p. 4, RES. 258.

PINTO, M. R. A. **Avaliação hematológica de búfalas da raça Murrah reagentes ou não à sorologia para brucelose**. Jaboticabal, 2003. 63 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, *Campus* de Jaboticabal, Jaboticabal, 2003.

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 do complemento e 2-mercaptoetanol, para o diagnóstico sorológico da brucelose em um rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) infectado por *Brucella abortus*. **Ars Veterinária**, v. 21, p. 147-154, 2005. Suplemento.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe Publishing, 1994, 648 p.

ROSS, H. M.; FOSTER, G.; REID, R. J.; JAHANS, K. L.; MACMILLAN, A. P. *Brucella* species infection in sea-mammals. **The Veterinary Record**, v. 134, n. 14, p. 359, 1994.

SAMARTINO, L. E.; GREGORET, R. J.; SIGAL, E. Field trial of brucellosis competitive enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. **Anais...** p. 34, RES. 491.

SAMARTINO, L.; GREGORET, R. J.; SIGAL, E. Field trial of brucellosis competitive enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). In: COLLING, A. (Ed.). **Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America**. Viena: International Atomic Energy Agency, IAEA-TECDOC-1055, 1998. p. 163-167.

a- SAMARTINO, L. E.; GALL, D.; GREGORET, R. J.; NIELSEN, K. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine. **Veterinary Microbiology**, v. 70, p. 193-200, 1999.

b- SAMARTINO, L. E.; GREGORET, R. J.; GALL, D.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. **Journal of Immunoassay**, v. 20, p. 115-120, 1999.

SANDHU, 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. 458-465, 1993.

SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. P.; TROISE, C. Títulos aglutinantes para “Brucella” em búfalos do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 28, p. 35-39, 1969.

SCHURIG, G. G. Vacinas contra brucelose: passado, presente e futuro. In: **ANNIVERSARY OF BRUCELLOSIS RESEARCH CONFERENCE**, 50., 1997, Chicago. P. 8-9.

SCHURIG, G. G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M. J. Brucellosis vaccines: past, present and future. **Veterinary Microbiology**, v.90, p. 479-496, 2002.

SENASA. SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA. Marco legal. Resoluciones ex SENASA n. 1484/83. Producto veterinario, diagnóstico. Brucelosis. Artículo n. 10, parágrafo VI. Disponível em: <<http://www.senasa.gov.ar>>. Acesso em: 12 set. 2003.

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. The genus *Brucella*. In: TYMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. (Ed.). **Hagan and bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. London: Comstock Publishing Associates, 1988. p. 135-152.

TONHATI, H. O búfalo no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUBALININOCULTURA, 1., 1997, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 1997. p. 210-221.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Animal and Plant Health Inspection Service. Animal Health. Veterinary Services. Disease Eradication. National Center for Animal Health Programs. Brucellosis. Facts about brucellosis. Disponível em: <<http://www.aphis.usda.gov>>. Acesso em: 10 ago. 2005.

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

VANZINI, V. R.; AGUIRRE, N; LUGARESI, C. I.; DE ECHAIDE, S. T.; DE CANAVESIO, V. G.; GUGLIEMONE, A. A.; MARCHESINO, M. D.; NIELSEN, K. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 36, p. 21-217, 1998.

WRAY, C. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. **Veterinary Bulletin**, Weybridge, v. 45, p. 543-550, 1975.

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



## APÊNDICE A

Tabela 32: Resultados dos testes sorológicos para diagnóstico da brucelose em fêmeas bubalinas adultas, vacinadas com B19 na idade recomendada. São Paulo, 2006.

Teste\Animal	AAT	SRP	ME	SLT	ELISAC	PF	FC
1	N	100	N	50	8	70	N
2	P	200	N	25	14	66	N
3	N	100	N	50 i	17	68	N
4	N	100	N	N	15	71	N
5	N	25	N	50 i	14	70	N
6	N	100	N	N	9	71	N
7	N	100	N	N	14	71	N
8	N	50	N	N	12	69	N
9	N	50	N	N	16	64	N
10	N	100	N	N	11	66	N
11	P	25	N	100i	60	120	N
12	N	25	N	N	9	69	N
13	N	100	N	50 i	12	65	N
14	N	200	N	25 i	9	70	N
15	N	100	N	N	16	63	N
16	N	100	N	N	10	66	N
17	N	100	N	N	17	68	N
18	N	200	N	25	7	70	N
19	N	100	N	25	20	87	23,2
20	N	50	N	25	21	62	16,6
21	N	100	N	N	12	70	N
22	N	50	N	25 i	9	70	N
23	N	25	N	25	14	69	N
24	N	25	N	25	14	58	N
25	N	50	N	N	14	67	N
26	N	100	N	25	7	58	N
27	N	100	N	50	14	67	N
28	N	50	N	N	7	58	N
29	N	50	N	N	7	66	N
30	N	100	N	25 i	5	68	N
31	N	50	N	25	5	63	N
32	N	100	N	100i	10	69	N
33	P	100	N	100	2	72	N
34	N	25	N	50	14	65	N
35	N	200	N	N	15	67	N
36	PP	200	50	100	74	155	185,6
37	N	50	N	25	11	73	N
38	N	100	N	N	16	74	N
39	N	50	N	25	22	64	N
40	N	50	N	N	24	63	N
41	N	50	N	N	22	71	N
42	N	100	N	N	8	67	N
43	N	100	N	N	29	66	N
44	N	100	N	N	28	65	N
45	N	50	N	N	31	69	N
46	N	100	N	N	23	64	N
47	N	50	N	N	32	50	N
48	N	50	N	N	24	65	N
49	N	100	N	N	24	65	N
50	N	50	N	N	37	70	N

Teste\Animal	AAT	SRP	ME	SLT	ELISAC	PF	FC
51	<b>PP</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	21	77	<b>26,6</b>
52	N	<b>100</b>	N	25	34	66	N
53	N	N	N	N	26	62	N
54	N	100	N	N	26	68	N
55	N	50	N	N	24	71	N
56	N	<b>100</b>	N	N	32	73	N
57	N	<b>100</b>	N	N	27	64	N
58	N	<b>100</b>	N	N	35	68	N
59	N	50	N	N	27	68	N
60	N	25	N	N	37	68	N
61	N	50	N	N	27	68	N
62	N	50	N	N	26	69	N
63	N	50	N	N	18	72	N
64	N	50	N	N	26	70	N
65	N	50	N	N	38	69	10 UI
66	<b>PPP</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>94</b>	<b>130</b>	<b>1702,4</b>
67	N	50	N	25	39	72	<b>23,2</b>
68	N	50	N	N	26	68	N
69	N	25	N	N	27	69	N
70	N	50	N	N	23	87	N
71	<b>PPP</b>	50	<b>100i</b>	<b>200</b>	<b>89</b>	<b>263</b>	<b>1702,4</b>
72	<b>P</b>	50	N	N	6	70	N
73	<b>P</b>	50	N	N	27	72	N
74	N	N	N	N	9	69	N
75	N	25	N	N	11	64	N
76	N	25	N	N	29	60	N
77	N	25	N	N	29	68	N
78	<b>P</b>	50	N	N	24	71	N
79	<b>PPP</b>	<b>100</b>	<b>50 i</b>	50 i	<b>93</b>	<b>254</b>	<b>1062,4</b>
80	N	50	N	N	23	64	N
81	N	50	N	N	39	56	N
82	N	25	N	25 i	39	80	N
83	<b>PPP</b>	<b>200</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>94</b>	<b>115</b>	<b>53,2</b>
84	N	25	N	N	34	70	N
85	<b>P</b>	<b>100</b>	<b>25 i</b>	<b>200</b>	8	65	N
86	<b>PP</b>	N	N	N	36	91	N
87	N	50	N	N	37	72	N
88	N	50	N	N	35	<b>95</b>	N
89	N	50	N	25	21	66	N
90	N	<b>200</b>	N	25	22	70	N
91	<b>P</b>	50i	N	N	28	71	N
92	N	<b>100</b>	N	N	4	72	N
93	N	25	N	N	26	74	N
94	<b>P</b>	<b>100</b>	N	50	<b>85</b>	<b>214</b>	<b>185,6</b>
95	N	50	N	N	27	68	N
96	<b>PPP</b>	<b>200</b>	<b>50</b>	<b>200</b>	<b>96</b>	<b>268</b>	<b>1702,4</b>
97	<b>PPP</b>	<b>200</b>	<b>25</b>	<b>200 prozona</b>	<b>96</b>	<b>178</b>	<b>425,6</b>
98	<b>P</b>	50	N	N	38	56	N
99	N	<b>200</b>	N	25	38	62	N
100	N	<b>100</b>	<b>25</b>	25	<b>95</b>	<b>166</b>	<b>371,2</b>
101	<b>PPP</b>	<b>200</b>	<b>50i</b>	<b>200 prozona</b>	<b>95</b>	<b>131</b>	<b>212,8</b>
102	<b>PPP</b>	<b>200</b>	<b>100i</b>	<b>400 prozona</b>	<b>99</b>	<b>241</b>	<b>742,7</b>
103	<b>P</b>	<b>200</b>	<b>100</b>	<b>200 prozona</b>	<b>46</b>	67	<b>46,4</b>
104	N	50	N	N	12	56	<b>26,6</b>
105	N	<b>100</b>	N	N	15	63	N

106	N	25	N	N	27	57	N
107	N	25	N	N	21	72	N
108	<b>PPP</b>	<b>200</b>	<b>200i</b>	<b>200</b>	<b>95</b>	<b>156</b>	<b>851</b>
109	<b>PP</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>96</b>	<b>267</b>	<b>185,6</b>
110	N	<b>200</b>	N	50	14	56	N
111	N	<b>100</b>	N	25	12	67	N
112	<b>PPP</b>	<b>200</b>	<b>800</b>	<b>800 prozona</b>	<b>98</b>	<b>259</b>	<b>1702,4</b>
113	N	50	N	50i	21	67	N
114	N	50	N	25 i	37	77	N
115	N	50	N	25 i	17	71	N
116	N	50	N	25	20	70	N
117	N	25	N	25	37	70	N
118	N	50	N	50 i	16	64	N
119	N	50	N	N	19	69	N
120	<b>P</b>	25	N	N	34	62	N
121	N	25	N	N	36	85	N
122	<b>PP</b>	25	<b>50</b>	<b>200 i</b>	<b>96</b>	<b>258</b>	<b>851,2</b>
123	N	50	N	N	9	54	N
124	N	<b>200</b>	N	N	12	58	N
125	N	25	N	N	18	71	N
126	<b>P</b>	25	N	25 i	38	67	N
127	N	50	<b>25</b>	<b>100 i</b>	<b>95</b>	<b>253</b>	<b>212,8</b>
128	N	25	N	25 i	30	74	N
129	N	50	N	N	39	71	N
130	N	25	N	N	16	75	N
131	N	50	N	25	27	69	N
132	N	50	N	25	13	74	N
133	N	50	N	50i	32	76	N
134	N	50	N	N	40	83	N
135	N	25	N	N	34	74	N
136	<b>P</b>	50	N	25i	1	76	N
137	N	50	N	25 i	21	69	N
138	N	50	N	50 i	20	73	N
139	N	<b>100</b>	N	50	30	76	N
140	<b>P</b>	50	<b>50</b>	<b>200</b>	<b>97</b>	<b>255</b>	<b>742,4</b>
141	N	25	N	25	<b>87</b>	86	N
142	N	50	N	N	33	70	N
143	N	<b>100</b>	N	N	33	59	N
144	<b>P</b>	50	<b>25</b>	25	11	68	N
145	N	50	N	N	35	67	N
146	<b>P</b>	50	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>97</b>	<b>185</b>	<b>425,6</b>
147	N	50	N	25	20	69	N
148	N	25	N	N	21	62	N
149	N	<b>100</b>	N	50i	33	63	N
150	N	50i	N	50i	23	70	N
151	N	25	N	25	21	69	N
152	<b>P</b>	50	N	25	28	73	N
153	N	50	N	50i	7	73	N
154	N	50	N	N	17	71	N
155	<b>P</b>	<b>100</b>	N	25	27	63	N
156	N	N	N	N	16	58	N
157	N	<b>100</b>	N	N	30	84	N
158	N	50	N	N	18	77	N
159	N	50	N	25	24	65	N
160	N	25	N	N	21	69	N
161	N	50	N	N	27	70	N

162	<b>P</b>	<b>200</b>	<b>50</b>	50	16	65	N
<b>Teste\Animal</b>	<b>AAT</b>	<b>SRP</b>	<b>ME</b>	<b>SLT</b>	<b>ELISAC</b>	<b>PF</b>	<b>FC</b>
163	N	<b>100</b>	N	25	28	77	N
164	N	50	N	N	25	77	N
165	N	50	N	N	31	75	N
166	N	50	N	N	18	65	N
167	N	50	N	N	38	72	N
168	N	25	N	N	36	68	N
169	<b>P</b>	50	N	25	30	68	N
170	N	50	N	25	20	78	N
171	<b>P</b>	50	N	N	22	66	N
172	N	50	N	N	17	72	N
173	N	25	25i	N	12	58	N
174	N	50	N	N	18	68	N
175	N	50	N	N	22	68	N
176	N	25	N	N	31	76	N
177	N	50	N	N	22	68	N
178	N	50	N	N	27	61	N
179	N	25	N	N	34	63	N
180	N	50	N	N	37	72	N
181	N	50	N	N	22	81	N
182	N	50	<b>25</b>	25	27	66	N
183	<b>P</b>	<b>100</b>	N	25	29	63	N
184	N	50	N	N	27	70	N
185	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>800</b>	<b>800</b>	<b>98</b>	<b>245</b>	<b>1702,4</b>
186	N	50	N	N	24	71	N
187	<b>PP</b>	<b>100</b>	<b>25</b>	25	<b>64</b>	<b>95</b>	<b>20</b>
188	<b>PP</b>	<b>200</b>	<b>25</b>	50i	<b>80</b>	<b>104</b>	<b>26,6</b>
189	<b>PPPP</b>	N	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>95</b>	<b>224</b>	<b>1702,4</b>
190	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>200i</b>	<b>200</b>	<b>45</b>	<b>95</b>	<b>46,4</b>
191	<b>P</b>	<b>100</b>	25i	50	26	80	N
192	N	25	N	25	28	70	N
193	<b>PP</b>	<b>200</b>	<b>25</b>	50	<b>96</b>	151	<b>26,6</b>
194	<b>P</b>	<b>200</b>	<b>25</b>	50	28	73	N
195	<b>PPP</b>	25	<b>200i</b>	<b>200</b>	<b>97</b>	<b>136</b>	<b>212,8</b>
196	<b>P</b>	N	<b>25</b>	25	32	80	N
197	<b>PP</b>	<b>100</b>	<b>25i</b>	<b>100i</b>	17	60	N
198	<b>PP</b>	<b>100</b>	N	50	28	59	N
199	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>94</b>	<b>188</b>	<b>106,4</b>
200	N	25	N	N	8	67	N
201	<b>PPPP</b>	50	<b>400</b>	<b>400</b>	<b>95</b>	<b>254</b>	<b>425,6</b>
202	<b>P</b>	<b>100</b>	N	N	25	74	N
203	N	25	N	25	<b>71</b>	<b>163</b>	<b>106,4</b>
204	<b>P</b>	<b>100</b>	25i	50	4	67	N
205	<b>P</b>	<b>100</b>	N	50	6	69	N
206	N	N	N	N	1	72	N
207	N	50	N	25	1	70	N
208	<b>PPP</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>92</b>	93	<b>80</b>
209	N	N	N	N	12	81	N
210	N	50	N	N	13	54	N
211	<b>PP</b>	50	N	25	<b>45</b>	<b>105</b>	<b>26,6</b>
212	N	<b>100</b>	N	25	23	68	N
213	N	<b>100</b>	N	N	1	71	N
214	N	N	N	25	22	67	N
215	N	25	N	50	14	72	N
216	<b>P</b>	<b>100</b>	N	25	1	71	N

217	<b>PPP</b>	<b>100</b>	N	25	4	66	<b>46,6</b>
218	<b>PPPP</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>97</b>	<b>224</b>	<b>1702,4</b>
219	<b>PPPP</b>	50	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>70</b>	<b>132</b>	<b>106,4</b>
220	N	50	N	25	7	67	N
221	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>800</b>	<b>800</b>	<b>96</b>	<b>303</b>	<b>851,2</b>
222	N	50	N	25	13	58	N
223	<b>P</b>	<b>100</b>	<b>25i</b>	<b>100</b>	18	62	N
224	<b>P</b>	<b>200</b>	N	50	12	60	N
225	N	N	N	N	6	78	N
226	<b>P</b>	25	N	N	4	68	N
227	<b>PP</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>100i</b>	<b>87</b>	<b>192</b>	<b>371,2</b>
228	<b>PPPP</b>	<b>100</b>	<b>200i</b>	<b>200</b>	8	81	N
229	N	25	N	<b>100</b>	1	68	N
230	<b>P</b>	50	N	25	7	69	N
231	<b>P</b>	25	25i	25	5	68	N
232	<b>P</b>	50	25i	50	5	73	N
233	N	25	N	25	6	81	N
234	<b>P</b>	<b>100</b>	N	N	16	68	N
235	<b>P</b>	50	<b>25i</b>	<b>100</b>	9	79	<b>53,2</b>
236	<b>P</b>	25	N	25	7	66	N
237	N	N	N	N	2	59	N
238	N	N	N	N	11	72	N
239	N	N	N	N	9	49	N
240	<b>P</b>	<b>100</b>	<b>25</b>	<b>200</b>	<b>87</b>	80	<b>23,2</b>
241	<b>P</b>	<b>100</b>	N	N	21	73	N
242	N	N	N	50	6	69	N
243	N	<b>100</b>	N	50	15	74	N
244	N	N	N	50	11	72	N
245	<b>PPPP</b>	50	<b>800</b>	<b>800</b>	<b>94</b>	<b>265</b>	<b>851,2</b>
246	<b>P</b>	N	N	N	36	84	N
247	<b>PPPP</b>	<b>100</b>	<b>400</b>	<b>400</b>	<b>95</b>	<b>278</b>	<b>425,6</b>
248	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>94</b>	<b>267</b>	<b>185,6</b>
249	<b>PPP</b>	100	<b>100i</b>	<b>100i</b>	<b>74</b>	<b>146</b>	<b>106,4</b>
250	<b>P</b>	<b>200</b>	N	50	14	66	N
251	<b>P</b>	100	25i	50	38	75	N
252	<b>PP</b>	50	<b>50</b>	<b>50</b>	5	69	N
253	<b>PP</b>	50	N	50	16	92	N
254	N	25	N	25	23	73	N
255	N	25	N	50i	9	71	<b>26,6</b>
256	N	25	N	25	7	72	N
257	<b>PP</b>	50	<b>50i</b>	<b>50</b>	17	73	N
258	N	25	N	N	16	72	N
259	N	50	N	N	11	68	N
260	N	50	N	N	5	70	N
261	N	<b>100</b>	N	N	4	69	N
262	N	50	N	N	13	81	N
263	N	25	N	N	1	70	N
264	N	50	N	25i	7	77	N
265	N	50	N	25	4	73	N
266	N	N	N	N	14	76	N
267	N	50	N	N	2	71	N
268	N	50	N	N	18	81	N
269	N	N	N	N	11	62	N
270	N	<b>100</b>	N	N	16	73	N
271	N	50	N	N	4	65	N
272	N	50	N	N	6	73	N

273	N	50	N	N	5	73	N
274	N	N	N	25	9	69	N
275	N	<b>200</b>	N	N	27	71	N
276	N	N	N	N	21	81	N
277	<b>PPP</b>	<b>100</b>	<b>25</b>	50	<b>45</b>	<b>171</b>	<b>26,6</b>
278	N	50	N	25	7	74	N
279	<b>PPP</b>	50	N	25	33	<b>117</b>	<b>11,6</b>
280	N	50	N	N	4	74	N
281	N	50	N	25	33	<b>146</b>	<b>13,3</b>
282	N	<b>100</b>	N	N	23	73	N
283	N	<b>100</b>	N	N	19	73	N
284	N	50	N	25	19	72	N
285	N	25	N	N	10	68	N
286	N	25	N	N	9	71	N
287	N	50	N	N	2	64	N
288	N	50	N	N	3	71	N
289	N	50	N	50	<b>46</b>	<b>95</b>	<b>23,2</b>
290	N	50	N	N	9	72	N
291	N	50	N	50i	9	75	N
292	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>400</b>	<b>98</b>	<b>274</b>	<b>851,2</b>
293	N	25	N	N	15	73	N
294	N	50	N	25	18	73	N
295	N	50	N	50i	13	67	N
296	N	25	N	N	11	70	N
297	N	50	N	N	15	58	N
298	N	50	N	<b>100i</b>	10	68	N
299	N	25	N	N	9	65	N
300	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>800</b>	<b>800</b>	<b>98</b>	<b>258</b>	<b>1702,4</b>
301	<b>P</b>	50	N	50	20	71	N
302	N	50	N	50	31	67	N
303	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>800</b>	<b>800</b>	<b>99</b>	<b>246</b>	<b>851,2</b>
304	N	25	N	25	10	71	N
305	N	50	N	25	17	66	N
306	<b>P</b>	<b>100</b>	<b>25</b>	50	<b>53</b>	<b>119</b>	<b>53,2</b>
307	N	25	N	N	1	75	N
308	N	25	N	25	4	71	N
309	<b>P</b>	<b>100</b>	<b>25</b>	50	<b>54</b>	<b>98</b>	<b>26,6</b>
310	N	50	N	25	14	70	N
311	N	25	N	N	14	73	N
312	<b>P</b>	50	N	<b>100</b>	20	61	<b>26,6</b>
313	<b>P</b>	50	N	50i	<b>98</b>	<b>100</b>	<b>53,2</b>
314	N	50	N	25	<b>8</b>	<b>75</b>	<b>92,8</b>
315	N	25	N	25	3	78	<b>13,3</b>
316	N	25	N	25	6	63	N
317	N	50	N	N	3	69	N
318	N	25	N	N	13	59	N
319	N	N	N	N	8	69	N
320	<b>P</b>	<b>100</b>	N	50	24	75	N
321	<b>PPPP</b>	<b>100</b>	<b>400i</b>	<b>400</b>	<b>94</b>	<b>135</b>	<b>851,2</b>
322	N	50	N	25	13	67	N
323	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>800</b>	<b>800</b>	<b>91</b>	<b>258</b>	<b>1702,4</b>
324	<b>P</b>	50	<b>25</b>	25	<b>69</b>	<b>97</b>	<b>26,6</b>
325	<b>PP</b>	50	<b>50i</b>	50	33	68	N
326	<b>P</b>	50	N	50	10	68	N
327	N	25	N	N	13	64	N
328	N	50	N	50i	3	56	N

329	N	N	N	N	8	74	N
330	<b>PP</b>	<b>100</b>	<b>100i</b>	<b>200i</b>	<b>97</b>	<b>263</b>	<b>752,4</b>
331	N	50	N	25	24	75	N
332	N	25	N	25	18	58	N
333	N	25	N	N	34	69	N
334	N	<b>100</b>	N	N	5	64	N
335	N	50	N	N	24	58	N
336	N	<b>100</b>	N	25	<b>76</b>	<b>95</b>	<b>185,6</b>
337	N	50	N	N	16	67	N
338	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>90</b>	<b>118</b>	<b>212,8</b>
339	N	50	N	N	18	68	N
340	N	25	N	N	<b>45</b>	<b>154</b>	N
341	N	50	N	N	25	72	N
342	<b>P</b>	<b>100</b>	N	N	37	68	N
343	N	25	N	25	6	67	N
344	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>95</b>	<b>245</b>	<b>425,6</b>
345	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>98</b>	<b>220</b>	<b>425,6</b>
346	N	50	N	25	2	69	N
347	N	<b>100</b>	<b>N</b>	<b>100</b>	26	62	N
348	N	25	N	N	12	66	N
349	<b>P</b>	<b>100</b>	N	25	21	67	N
350	N	50	N	N	2	68	N
351	<b>PPPP</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>98</b>	<b>219</b>	<b>212,8</b>
352	N	25	N	N	4	57	N
353	N	50	N	N	15	70	N
354	N	25	N	N	4	59	N
355	N	50	N	N	12	63	N
356	N	<b>100</b>	N	25	3	50	N
357	N	50	N	N	5	68	N
358	N	<b>100</b>	N	N	5	67	N
359	N	<b>100</b>	N	N	4	65	N
360	N	<b>100</b>	N	25	3	50	N
361	N	<b>100</b>	N	N	8	61	N
362	N	<b>200</b>	N	N	18	76	N
363	N	<b>100</b>	N	N	3	61	N
364	N	<b>100</b>	N	N	1	35	N
365	N	<b>100</b>	N	50i	1	91	<b>10</b>
366	N	<b>100</b>	N	N	2	54	N
367	N	<b>100</b>	N	N	3	48	N
368	N	<b>100</b>	N	N	2	55	N
369	N	<b>200</b>	N	25i	12	56	N
370	N	<b>100</b>	N	25	3	69	N
371	<b>PP</b>	<b>200</b>	<b>50i</b>	<b>100</b>	<b>96</b>	<b>267</b>	<b>106,4</b>
372	<b>PP</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	50	<b>78</b>	83	<b>33,2</b>
373	N	50	N	N	6	70	N
374	N	<b>200</b>	N	25	18	66	N
375	N	<b>100</b>	N	N	9	58	N
376	N	<b>100</b>	N	N	7	71	N
377	N	<b>200</b>	N	N	4	61	N
378	<b>P</b>	<b>200</b>	N	50	5	57	N
379	N	<b>100</b>	<b>25</b>	25	13	57	N
380	N	<b>100</b>	N	N	4	58	N
381	N	50	N	N	9	90	N
382	<b>P</b>	50	N	N	5	71	N
383	N	<b>200</b>	N	50i	17	67	N
384	N	<b>200</b>	N	25	9	66	N

385	N	200	N	25	3	75	N
386	N	50	N	25	15	65	N
387	P	200	N	50i	5	67	N
388	N	50	N	25	23	83	N
389	PP	100	25	50i	11	67	N
390	N	50	N	25	5	69	N
391	N	50	N	50i	3	90	N
392	N	100	N	50i	21	55	N
393	N	100	N	25	12	66	N
394	N	100	N	50	2	66	N
395	PP	100	50i	100i	25	76	N
396	N	50	N	50i	6	87	N
397	N	100	N	25	9	85	N
398	N	50	N	50	-4	66	N
399	N	50	N	25i	-2	66	N
400	N	25	N	50i	5	61	N
401	N	25	N	N	7	91	N
402	N	100	N	50i	6	66	N
403	N	50	N	50i	8	70	N
404	PPP	50	200i	200	96	248	1280
405	N	50	N	N	5	90	N
406	N	25	N	N	8	69	N
407	N	50	N	25	9	65	N
408	N	25	N	50i	3	66	N
409	N	N	N	N	31	52	N
410	N	50	25i	50i	6	85	N
411	N	50	25	25	1	47	N
412	N	50	N	50	7	68	N
413	N	50	50i	50i	3	66	N
414	N	100	N	50i	12	69	N
415	N	100	50i	50	3	66	N
416	N	50	N	25	3	73	N
417	N	25	N	50	6	60	N
418	P	50	50i	50	2	97	N
419	N	50	N	100i	12	97	N
420	PPP	50	25i	50	11	128	N
421	PPP	100	N	50	3	82	N
422	N	100	N	50i	6	68	N
423	P	50	N	100i	93	135	10
424	N	50	N	25	14	70	N
425	N	50	N	50i	19	56	N
426	N	50	N	N	38	54	N
427	N	25	N	50i	3	89	N
428	N	25	N	25	7	65	N
429	P	25	N	25i	7	65	N
430	PP	100	100	200	94	153	106,4
431	PP	100	25	50i	28	77	20
432	P	50	N	N	12	44	N
433	N	50	N	N	8	58	N
434	N	50	N	N	2	78	N
435	N	50	N	25	9	73	N
436	N	100	N	50	30	114	53,2
437	N	100	N	25	18	61	N
438	N	100	N	N	4	74	N
439	N	50	N	25	4	66	N
440	N	50	N	N	14	78	N



441	N	100	N	25i	4	71	N
442	P	100	N	N	15	72	N
443	N	200	N	N	6	64	N
444	PP	100	N	25	1	65	N
445	N	50	N	N	11	64	N
446	N	50	N	N	15	72	N
447	P	50	N	N	32	76	N
448	N	50	N	N	12	39	N
449	N	100	N	N	10	63	N
450	N	N	N	N	11	67	N
451	N	25	N	N	22	69	N
452	N	100	N	N	26	69	N
453	N	50	N	N	4	75	N
454	N	25	N	N	22	71	N
455	P	50	N	N	8	78	N
456	N	50	N	N	2	79	N
457	N	25	N	N	9	71	N
458	N	50	N	N	35	64	N
459	N	50	N	N	14	70	N
460	N	50	N	25	15	68	N
461	N	50	N	N	12	65	N
462	N	50	N	N	53	81	N
463	N	100	N	N	12	58	N
464	N	100	25	25	75	166	40
465	N	100	N	N	12	69	N
466	P	200	N	N	8	58	20
467	N	50	N	N	4	68	N
468	N	100	N	N	17	74	N
469	N	100	N	N	23	64	N
470	N	100	N	N	23	85	N
471	N	100	N	N	26	70	N
472	N	50	N	N	17	71	N
473	N	50	N	N	18	70	N
474	N	50	N	N	20	71	N
475	N	50	N	N	1	69	N
476	N	25	N	N	5	73	N
477	N	100	25	25	10	88	N
478	N	25	N	25	19	70	N
479	N	100	N	N	29	69	N
480	N	100	N	N	19	68	N
481	N	100	N	N	18	70	N
482	PP	200	50	100i	87	169	212,8
483	N	50	N	N	4	66	N
484	N	50	N	N	2	60	N
485	N	50	N	N	11	69	N
486	PP	100	25	25	78	133	425,6
487	N	100	N	N	11	68	N
488	N	100	N	N	23	59	10
489	N	25	N	N	14	76	N
490	N	25	N	N	7	71	N
491	P	100	N	25	7	66	N
492	N	25	N	N	6	85	N
493	N	50	N	N	17	69	N
494	N	50	N	N	10	72	N
495	N	100	N	25	23	81	N
496	N	N	N	N	18	66	N

497	N	25	N	N	8	65	N
498	N	50	N	N	10	62	N
499	N	50	N	N	10	69	N
500	N	<b>100</b>	N	N	<b>85</b>	<b>116</b>	N
501	<b>P</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>83</b>	<b>197</b>	<b>185,6</b>
502	N	N	N	N	17	92	N
503	<b>P</b>	<b>100</b>	N	N	23	<b>112</b>	N
504	N	50	N	N	25	70	N
505	N	50	N	N	10	73	N
506	N	50	N	N	17	75	N
507	N	25	N	N	25	66	N
508	N	<b>100</b>	N	N	4	76	N
509	N	25	N	N	20	68	N
510	N	<b>100</b>	N	25	18	71	N
511	N	50	N	N	3	71	N
512	N	25	N	N	20	73	N
513	N	N	N	N	17	70	N
514	<b>PP</b>	50	<b>25</b>	25	<b>88</b>	<b>238</b>	<b>53,2</b>
515	N	50	N	N	3	71	N
516	N	50	N	N	2	64	N
517	N	25	N	N	8	72	N
518	N	50	N	N	14	78	N
519	N	50	N	N	13	68	N
520	N	<b>100</b>	N	N	17	64	N
521	N	<b>100</b>	N	N	18	64	N
522	N	<b>100</b>	N	25	20	70	N
523	N	<b>100</b>	N	25	13	57	N
524	N	50	N	N	5	70	N
525	N	25	N	N	12	74	N
526	N	50	N	N	7	71	N
527	<b>P</b>	50	N	N	4	74	N
528	N	50	N	N	19	64	N
529	N	<b>100</b>	N	25	25	68	N
530	N	50	N	25	15	72	N
531	N	50	N	25	16	72	N
532	N	<b>100</b>	N	N	11	61	N
533	N	50	N	N	5	62	N
534	N	<b>100</b>	N	25	7	70	N
535	N	<b>100</b>	N	N	7	58	N
536	N	<b>100</b>	N	25	7	68	N
537	N	50	N	N	38	66	N
538	N	50	N	N	34	49	N
539	N	50	N	N	32	66	N
540	N	50	N	50 i	35	63	N
541	N	50	N	25	33	66	N
542	N	50	N	N	30	70	N
543	N	25	N	50 i	26	78	N
544	N	25	N	N	8	68	N
545	N	25	N	25	38	64	N
546	N	50	N	25 i	38	64	N
547	N	<b>100</b>	N	N	31	68	N
548	N	50	N	25	39	65	N
549	N	50	N	50 i	28	65	N
550	N	<b>100</b>	N	N	28	61	N
551	N	<b>100</b>	N	N	34	69	N
552	N	50	N	25	32	65	N

553	N	50	N	25	32	65	N
554	N	100	N	25	29	59	N
555	N	100	N	50 i	29	65	N
556	N	50	N	25	35	68	N
557	N	100	N	50 i	14	64	N
558	<b>P</b>	100	<b>N</b>	100 i	30	68	N
559	N	25	N	50 i	15	73	N
560	N	100	<b>N</b>	100 i	46	66	40
561	N	N	N	N	15	71	N
562	N	25	N	50 i	21	61	N
563	N	25	N	50 i	29	69	N
564	<b>PPP</b>	200	200	200	77	132	106,4
565	N	25	N	25	37	59	N
566	N	50	N	50 i	40	64	N
567	N	50	N	25	37	69	N
568	N	50	N	25	18	67	N
569	N	25	N	25	15	68	N
570	N	50	N	N	14	64	N
571	N	N	N	25	34	51	N
572	N	25	N	50i	32	80	N
573	N	25	N	25	29	67	N
574	N	50	N	N	26	80	N
575	N	50	N	N	25	93	N
576	N	50	N	50 i	25	66	N
577	N	100	N	N	29	79	N
578	N	50	N	50 i	22	73	N
579	N	50	N	N	17	72	N
580	N	100	N	25 i	15	64	N
581	N	100	N	50 i	3	74	N
582	N	25	N	N	9	53	N
583	N	25	N	50 i	37	69	N
584	N	25	N	N	36	80	20
585	N	100	N	N	18	67	N
586	N	25	N	25	24	77	N
587	N	25	N	25	18	65	N
588	N	N	<b>N</b>	100 i	25	65	16,6
589	N	100	N	50 i	34	70	N
590	N	100	N	50 i	15	75	N
591	N	50	N	50 i	19	72	N
592	N	25	N	N	19	84	N
593	N	50	N	50 i	14	74	N
594	N	50	N	N	26	67	N
595	N	N	N	N	34	83	N
596	N	25	N	N	36	65	N
597	N	50	N	N	37	82	N
598	N	100	N	25	34	81	N
599	N	50	N	N	31	107	N
600	N	50	N	N	37	77	N
601	N	50	N	25 i	15	91	N
602	<b>P</b>	100	N	25	14	67	N
603	N	100	N	50	7	89	N
604	N	50	N	50 i	36	87	N
605	N	25	N	50 i	31	74	N
606	N	25	N	25	11	94	N
607	N	25	N	N	22	76	N
608	N	25	N	N	13	72	N

609	N	N	N	N	14	64	N
610	N	50	N	N	11	86	N
611	N	50	N	25	16	69	N
612	N	25	N	N	7	85	N
613	N	50	N	25	1	75	N
614	N	50	N	N	6	70	N
615	N	<b>100</b>	N	25	41	89	N
616	N	50	N	N	3	72	N
617	N	<b>100</b>	N	25	19	77	N
618	N	25	N	N	12	67	N
619	N	25	N	N	26	72	N
620	N	N	N	N	16	65	N
621	N	50	N	N	17	71	N
622	N	25	N	N	8	72	N
623	N	50	N	N	8	73	N
624	N	50	N	N	8	70	N
625	N	25	N	N	8	78	N
626	N	25	N	N	8	67	N
627	N	25	N	N	1	75	N
628	N	25	N	N	2	85	N
629	N	25	N	N	14	67	N
630	N	50	N	N	4	86	N
631	N	25	N	N	2	94	N
632	N	25	N	N	6	73	N
633	N	25	N	N	2	69	N
634	N	50	N	N	11	66	N
635	N	25	N	N	13	74	N
636	N	<b>100</b>	N	25	7	88	N
637	N	50	N	N	25	70	N
638	N	50	N	25 i	15	67	N
639	N	50	N	N	11	66	N
640	N	<b>100</b>	N	50	4	88	N
641	N	<b>100</b>	N	25	2	83	N
642	<b>P</b>	50	N	25	<b>96</b>	<b>167</b>	N
643	N	50	N	N	2	73	N
644	N	<b>100</b>	N	25	3	72	N
645	N	50	N	25	6	89	N
646	N	50	N	N	4	76	N
647	N	50	N	N	28	92	N
648	N	50	N	N	2	93	N
649	N	50	N	N	2	72	N
650	N	25	N	N	11	67	N
651	N	25	N	N	17	74	N
652	N	50	N	N	6	91	N
653	N	50	N	N	7	74	N
654	N	50	N	N	26	64	N
655	N	<b>100</b>	N	N	12	64	N
656	N	<b>100</b>	N	25	1	90	N
657	N	50	N	N	4	80	N
658	N	100	<b>N</b>	<b>100</b>	1	87	N
659	N	50	N	N	18	69	N
660	N	25	N	N	16	71	N
661	N	50	N	N	6	81	N
662	N	50	N	N	3	75	N
663	N	25	N	N	2	69	N
664	<b>PP</b>	50	N	50 i	<b>63</b>	<b>133</b>	<b>26,6</b>

665	N	50	N	25	6	81	N
666	<b>PP</b>	50	N	50	6	78	N
667	N	<b>100</b>	N	50	6	75	N
668	N	50	N	N	2	70	N
669	N	50	N	N	21	76	N
670	N	50	N	N	13	68	N
671	N	<b>200</b>	N	N	3	70	N
672	N	50	N	N	4	73	N
673	N	<b>100</b>	N	N	18	76	N
674	N	<b>100</b>	N	N	7	70	N
675	N	50	N	N	15	77	N
676	N	50	N	N	6	75	N
677	N	<b>100</b>	N	N	12	76	N
678	N	25	N	N	18	78	N
679	<b>PPP</b>	<b>100</b>	<b>50i</b>	<b>50i</b>	31	74	N
680	N	<b>100</b>	N	N	13	66	N
681	N	25	N	N	21	68	N
682	N	50	N	N	15	72	N
683	N	<b>100</b>	N	N	4	70	N
684	N	50	N	N	2	71	N
685	N	<b>100</b>	25i	25i	20	<b>107</b>	<b>40</b>
686	N	25	N	N	20	67	N
687	N	50	N	N	16	76	N
688	N	<b>100</b>	N	N	<b>25</b>	<b>73</b>	<b>N</b>
689	N	50	N	N	2	74	N
690	N	25	N	25i	17	88	N
691	N	25	N	N	11	78	N
692	N	50	N	N	12	93	N
693	N	50	N	N	21	69	N
694	<b>P</b>	50	N	N	19	76	N
695	N	25	N	N	4	68	N
696	<b>PP</b>	50	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>87</b>	<b>244</b>	<b>53,2</b>

---