

Rejane Silva Diniz

**DETERMINAÇÃO DO PONTO DE CORTE, SENSIBILIDADE E  
ESPECIFICIDADE DO ELISA rgp90 PARA O DIAGNÓSTICO DA ANEMIA  
INFECCIOSA EQUINA UTILIZANDO O MODELO BAYESIANO.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: João Paulo Amaral Haddad

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2009

D585d Diniz, Rejane Silva, 1967–

Determinação do ponto de corte, sensibilidade e especificidade do ELISA rgp90 para o diagnóstico da anemia infecciosa eqüina utilizando o modelo Bayesiano / Rejane Silva Diniz. – 2009.

27 p. :il.

Orientador: João Paulo Amaral Haddad

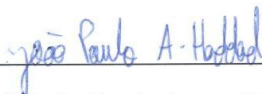
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Eqüino – Doenças – Teses. 2. Anemia infecciosa eqüina – Diagnóstico - Teses. 3. Teste imunoenzimático – Teses. I. Haddad, João Paulo Amaral. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 969

Dissertação defendida e aprovada em 23 de outubro de 2009, pela Comissão Examinadora constituída por:



---

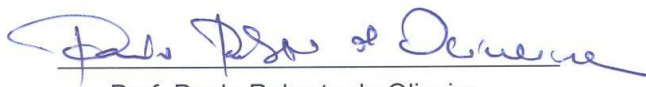
Prof. João Paulo Amaral Haddad

Orientador



---

Prof. Marcelo Fernandes Camargos



---

Prof. Paulo Roberto de Oliveira



Dedico esse trabalho a meus pais Roberto e Rita.

---

### **AGRADECIMENTOS**

Ao meu pai Roberto Palhares Diniz e a minha mãe Maria Rita Silva Diniz pela educação e amizade e por me ensinar a viver com perseverança.

A minha filha, Ana Luiza Diniz Basques pela alegria e simplesmente pela sua existência.

Ao Professor Jenner Karlisson Pimenta dos Reis pela confiança, profissionalismo e ensinamentos.

Ao Professor Rômulo Cerqueira Leite pela minha acolhida na equipe do Laboratório de Retrovírus e pela confiança depositada em meu trabalho.

Ao meu orientador, Professor João Paulo Amaral Haddad pelo aprendizado, orientação e pela cordialidade.

Aos Professores do setor de Patologia Clínica do Colégio técnico da UFMG, Professor Eduardo Antonio Ferraz Coelho e Professora Karina Braga Gomes Borges pelo incentivo e auxílio, pela oportunidade de realização do curso e pela amizade demonstrada.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), especialmente às médicas veterinárias Marilda Ferreira Martins e Valéria Maria de Andrade Almeida pelos dados fornecidos.

A equipe do Laboratório de Retrovírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG pelo convívio enriquecedor.

Aos professores da Escola de Veterinária da UFMG pelos ensinamentos, e aos funcionários pelos auxílios e atenção prestados.

Dedico também um agradecimento à Banca examinadora pelas contribuições para essa Dissertação.

---

## SUMÁRIO

---

|       |   |    |
|-------|---|----|
|       | RESUMO .....  | 8  |
|       | ABSTRACT.....   | 8  |
| 1.    | INTRODUÇÃO.....   | 9  |
| 2.    | LITERATURA CONSULTADA.....                                | 9  |
| 2.1   | Histórico da AIE .....                                    | 9  |
| 2.2   | Vírus .....   | 10 |
| 2.3   | Diagnóstico .....   | 11 |
| 2.3.1 | IDGA .....  | 12 |
| 2.3.2 | ELISA.....  | 13 |
| 2.4   | Validação de testes diagnósticos .....                    | 13 |
| 2.4.1 | Gold Standard.....  | 14 |
| 2.4.2 | Testes de precisão .....                                  | 14 |
| 2.4.3 | Curva ROC .....   | 14 |
| 2.4.4 | Modelo Bayesiano .....                                    | 15 |
| 3     | METODOLOGIA .....   | 16 |
| 3.1   | Dados em estudo .....                                     | 16 |
| 3.2   | Estudo de validação .....                                 | 16 |
| 3.2.1 | Avaliação da imprecisão.....                              | 16 |
| 3.2.2 | Avaliação do ponto de corte .....                         | 16 |
| 3.2.3 | Análise Bayesiana .....                                   | 17 |
| 4     | RESULTADOS .....  | 17 |
| 4.1   | Repetitividade e Reprodutibilidade.....                   | 17 |
| 4.2   | Ponto de corte .....                                      | 17 |
| 4.2.1 | Análise do “trade-off” sensibilidade/especificidade ..... | 18 |
| 4.3   | Estimativa Bayesiana .....                                | 20 |
| 4.3.1 | Densidade Beta <i>a priori</i> .....                      | 20 |
| 4.3.2 | Cenários .....  | 21 |
| 5.    | DISCUSSÃO.....  | 22 |
| 6     | CONCLUSÕES.....   | 24 |
| 7     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                           | 23 |

---

---

**LISTA DE TABELAS**

---

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Tabela 1- | Impacto da alteração do ponto de corte do ELISA rgp90 no desempenho do teste ..... | 19 |
| Tabela 2- | Resultados do ELISA rgp90 (cut off 0,220) e IDGA .....                             | 20 |
| Tabela 3- | Resultados do ELISA rgp90 (cut off 0,228) e IDGA .....                             | 20 |
| Tabela 4- | Resultados do ELISA rgp90 (cut off 0,232) e IDGA .....                             | 20 |
| Tabela 5- | Densidades beta <i>a priori</i> para o ELISA rgp90 .....                           | 21 |
| Tabela 6- | Parâmetros <i>a posteriori</i> do ELISA rgp90 (cut off 0,220) e IDGA .....         | 21 |
| Tabela 7- | Parâmetros <i>a posteriori</i> do ELISA rgp90 (cut off 0,228) e IDGA .....         | 22 |
| Tabela 8- | Parâmetros <i>a posteriori</i> do ELISA rgp90 (cut off 0,232) e IDGA .....         | 22 |

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1. | Organização do genoma proviral do vírus da AIE.....  | 10 |
| Figura 2. | Proteínas do Vírus da Anemia Infecciosa Equina ..... | 11 |
| Figura 3. | Teste IDGA .....                                     | 12 |
| Figura 4. | Teste ELISA.....                                     | 13 |

---

**LISTA DE GRÁFICOS**

---

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Gráfico 1. | Curva ROC do ELISA rgp90 utilizando IDGA como Gold Standard ..... | 18 |
| Gráfico 2. | Curva ROC dos pontos de corte em estudo do ELISA rgp90 .....      | 19 |

## RESUMO

A anemia infecciosa eqüina (AIE) é causada por um retrovírus. O animal infectado representa a principal fonte de vírus e o diagnóstico da doença através de sinais clínicos não é confiável. A disponibilidade dos testes diagnósticos marcou o início do controle da doença por demonstrarem correlação com a presença do vírus. No entanto, esses métodos frequentemente apresentam limitações atribuíveis a incerteza da estimativa da sensibilidade e especificidade sendo necessário estudos de validação. Nesse sentido resultados de dois testes diagnósticos IDGA e ELISA rgp90, foram avaliados através de testes estatísticos para estimar a incerteza no diagnóstico da AIE. O primeiro, a curva ROC, avaliou o ponto de corte para o imunoenensaio ELISA rgp90 considerando como parâmetro para decisão do melhor "cut off" a "Likelihood" positivo e negativo, a classificação correta dos resultados, a sensibilidade e especificidade individuais e acumuladas. O segundo, o modelo Bayesiano, verifica a sensibilidade e especificidade dos dois testes considerando o diagnóstico na ausência do "Gold standard". As distribuições *a posteriori* obtidas na análise Bayesiana foram comparadas considerando os testes isolados e combinados. A análise da área sob a curva ROC e a análise Bayesiana evidenciaram uma melhor acurácia com o ponto de corte 0,228 possibilitando o aumento da discriminação entre infectado e não infectado favorecendo a melhoria do diagnóstico da anemia infecciosa eqüina.

Palavras-chave: AIE, Sensibilidade, Especificidade, Modelo Bayesiano, Curva ROC, Validação.

## ABSTRACT

Equine infectious anemia (EIA) is caused by a retrovirus. The EIAV infected animal represents the main source of virus and the diagnosis of disease through clinical signs is not reliable. The availability of diagnostic tests marked the beginning of disease control by proof correlation with the presence of virus infection. These methods often have limitations attributable to the uncertainty of sensitivity and specificity estimates. Thus it is necessary studies of validation. In order to study these variations in specificity and sensitivity results of two diagnostic tests AGID and ELISA rgp90 were evaluated by statistical approach to estimate uncertainty for the diagnosis of EIA. The first, ROC curve, assessed values of optical density for the ELISA rgp90 as a parameter to select the optimal cut-off through the positive and negative results likelihood, the correct classification of results, an individual and accumulated sensitivity and specificity. The second, the Bayesian model, estimates the sensitivity and the specificity of two diagnostic tests in the absence of a Gold Standard. The posterior distribution computed with Bayesian analysis was compared considering just one test and both combined as well. The analysis of the area under the ROC curve and Bayesian analysis revealed the best accurate results when cut-off of 0.228 was established enabling the most discrimination between infected and non-infected approaching to improve the diagnosis of equine infectious anemia.

Key words: EIA, Sensitivity, Specificity, Bayesian model, ROC curve, Validation.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é detentor do quarto maior rebanho eqüino do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, da China e do México. Segundo dados do IBGE, o rebanho nacional é de 5,602 milhões de animais (dados de dezembro de 2007). Desse efetivo, em termos regionais a liderança é ocupada pelo Sudeste com 25,6% desses animais, seguido pelo Nordeste, com praticamente o mesmo percentual.

O comércio do cavalo em nosso país tem crescido nos últimos anos. Atualmente, o mercado de eqüídeos no Brasil movimenta R\$ 7,3 bilhões por ano e é responsável por 642,5 mil empregos diretos e 2,6 milhões de empregos indiretos, segundo a Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA, 2006).

Além da importante participação no setor produtivo destacam-se outros segmentos como a Equoterapia, jockeys clubes, lazer, provas funcionais e cavalgadas de longa distância.

Algumas doenças, dentre as quais a Anemia Infecciosa Eqüina (AIE), podem comprometer irreversivelmente o desempenho dos eqüídeos. A AIE é uma infecção viral persistente causada por um vírus do gênero *Lentivirus* da família *Retroviridae* e da subfamília *Orthoretrovirinae*. Ainda não é conhecido vacina e tratamento eficazes contra a doença, sendo a fonte dos vírus representada essencialmente por eqüídeo infectado e sua identificação o ponto de partida para qualquer ação preventiva e de controle.

Estudos de métodos para identificar a infecção tem aumentado o interesse nas questões relacionadas a sensibilidade e especificidade de testes sorológicos para AIE assim como a relação dos testes no diagnóstico da infecção pelo vírus da AIE (Mc Connico, 2000).

O diagnóstico laboratorial da doença tem sido realizado utilizando-se basicamente dois testes sorológicos, a imunodifusão em gel de Agar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA).

O animal reportado como falso negativo, movendo livremente coloca em risco outros eqüídeos, atuando na disseminação e interferindo no controle da doença. No caso de ocorrência de resultado falso-positivo o animal será indevidamente eutanasiado. A OIE recomenda o IDGA como teste referência. O ELISA também é recomendado como teste alternativo, mas nos Estados Unidos resultados positivos devem ser confirmados pelo IDGA.

O impacto dos resultados duvidosos na epidemiologia da doença motivaram a realização do presente trabalho. O objetivo desse estudo foi validar o diagnóstico sorológico da AIE, utilizando a formulação Bayesiana como possível forma de redução das incertezas do diagnóstico.

## 2. LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 Histórico da AIE

A AIE foi descrita pela primeira vez na França em 1843, sendo verificada pela primeira vez no Brasil em 1968, nos Estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (Guerreiro et al., 1968) sendo a etiologia viral demonstrada por Vallée & Carré em 1904. A dificuldade de obtenção de ensaio *in vitro* começou a ser superada quando pesquisadores japoneses utilizaram cultura de leucócitos para documentar a cinética da persistência do vírus em eqüídeos infectados e descobriram o fenômeno da antigenicidade do vírus da anemia infecciosa eqüina (VAIE) em animais com sinais crônicos da AIE (kono et al., 1973). O progresso significativo no diagnóstico ocorreu com a descrição do teste de imunodifusão por Coggins e Norcross em 1970. Segundo Issel (1988), antes do aparecimento do diagnóstico por teste sorológico a maioria dos eqüídeos infectados não eram detectados e a

associação do teste com os sinais clínicos compatíveis com a infecção como perda de peso, anemia, depressão e edema ventral favoreceu o diagnóstico.

Anticorpos contra proteínas de superfície do VAIE foram aparentemente detectados em inibição da hemaglutinação e testes de neutralização utilizando antígeno viral completo (Tanaka e Sakaki, 1962; Sentsui e Kono, 1981). A presença de epítomos altamente conservados nas glicoproteínas de superfície gp90 e gp45 foi demonstrada em estudos realizados por Hussain et al. (1987) e consideradas por Issel (1988) como potencial seguro no uso de reagente diagnóstico ou imunógenos de ampla proteção e mercedores de maiores estudos.

A padronização do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) para o diagnóstico da AIE incluía teste positivo no IDGA e teste positivo por inoculação de sangue de animal suspeito em animal sadio ou ambos os testes. Animal com teste de reação por IDGA equivocado (Issel e Adams, 1982) e outros estudos, sugeriram modificação nessa proposta devido a constante detecção no teste de ELISA que apresentava restrição pela USDA.

Vários estudos de transmissão mecânica do vírus foram realizados e resultados de testes do ELISA pela técnica de Konish e Yamanish (1984) modificada foram significativos pela detecção em resíduos de sangue do transmissor após alimentação em aproximadamente 10 nl com desvio

padrão de 5 nl como descrito por Foil et al. (1987).

Posteriormente outras técnicas de diagnóstico foram descritas, Western Blot desenvolvida por Rossmanith e Horvath, 1989 e a reação em cadeia de polimerase como o procedimento de amplificação do RNA viral em amostras de plasma e sua quantificação usando RT-PCR semiquantitativo (Lichtenstein et al., 1995) e Real-Time PCR (Cook et al., 2002).

## 2.2 Vírus

O vírus da AIE é um *Lentivirus*, membro da família *Retroviridae*, transmitido mecanicamente (Foil, 1987) por vetores. Os insetos hematófagos, *Stomoxys calcitrans*, *Chrysops* spp e *Tabanus* sp, são os principais vetores (Cup, 1980; Hawkins, 1973 e Issel, 1984). O sangue de equídeo com infecção persistente, quando ocorre o pico de viremia, é a mais importante fonte de vírus AIE (Issel et al., 1981) que em exaustivos estudos não tem mostrado multiplicação em células de insetos ou mesmo se mantido em populações de insetos encontrados naturalmente no campo (Shen et al., 1978).

O vírus AIE contém três principais genes estruturais / funcionais - O gene gag codifica as proteínas do core p26, p15, p11 e p9; o gene pol codifica a transcriptase reversa, integrase e protease e o gene env codifica as glicoproteínas transmembrana e de superfície gp45 e gp90 respectivamente (Figura 1).

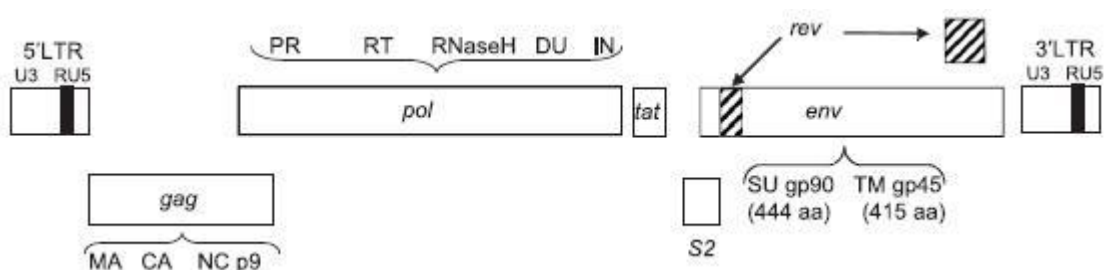


Figura 1. Organização do genoma proviral do vírus da AIE (Leroux et al., 2004)

O reconhecimento da relação entre vírus AIE e o vírus da imunodeficiência humana (HIV), em meados de 1980 pelos cientistas, renovou a pesquisa da patogenia do vírus AIE e induziu a novas descobertas sobre o vírus e a doença, como a similaridade da mutação antigênica que o vírus sofre logo após a sua entrada no organismo do animal, surgindo novas variantes que causam

respostas imunológicas diferentes (Sellon, 1993; Leroux, 2004).

Animais infectados pelo VAIE desenvolvem uma resposta imune intensa contra as glicoproteínas de superfície gp90, transmembrana gp45 e do core viral p26 (Figura 2).

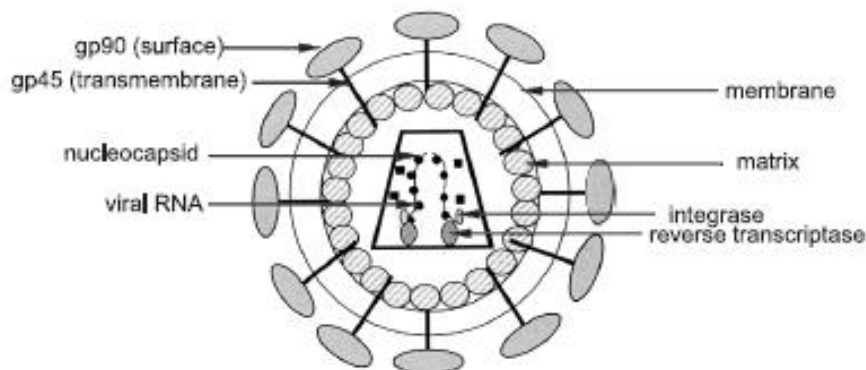


Figura 2. Estrutura do vírion do VAIE (Leroux et al., 2004)

Apesar da p26 ser a proteína mais abundante no virion, a resposta imune humoral contra a p26 é 10 a 100 vezes menor que a reatividade contra a gp90 e gp45 (Hammond, 1997; O'Rourke, 1988, citado por Leroux et al., 2004).

Kono et al. (1968) haviam demonstrado que no decorrer da infecção, os antígenos periféricos do vírus sofriam uma modificação antigênica que presumia o aparecimento de variantes antigênicas que levariam o organismo a se adaptar produzindo anticorpos que neutralizam a nova especificidade biológica.

Essa rápida variação antigênica do VAIE durante a infecção persistente sob pressão imune seletiva tem sido relatada como causa da natureza recorrente da AIE (Montelaro, 1984). Segundo Leroux (2004) durante a trajetória da doença, a glicoproteína de superfície gp90 é objeto de evolução rápida.

### 2.3 Diagnóstico

Métodos sorológicos tem um papel importante no diagnóstico da doença. Animais infectados apresentam sinais clínicos na fase aguda e crônica como febre alta, trombocitopenia, perda de peso, anemia e edema ventral, ocasionalmente mostram anormalidades neurológicas e na fase inaparente mantém-se como portadores assintomáticos. O desenvolvimento da infecção depende de fatores como virulência, dose infectante do vírus e resposta imunológica individual do hospedeiro (Sellon, 1993).

O relato de sinais clínicos associados a outras doenças como Leptospirose e Tripanossomíase (CFIA, 2006) e a alta prevalência de portadores assintomáticos dificulta um diagnóstico conclusivo enfatizando a importância do auxílio do diagnóstico laboratorial.

Além da prova de inoculação, vários testes foram desenvolvidos para detectar a

doença: inibição da hemaglutinação (Tanaka e Sakaki, 1962), fixação de complemento (Kono e Kobayashi, 1966), imunofluorescência em estudo demonstrado por Ushimi et al. em 1970, imunodifusão (Coggins, 1970), estudos de soroneutralização (Kono et al., 1971), ensaio imunoenzimático (Konish e Yamanish, 1984), Western Blot (Rossmanith e Horvath, 1989), reação em cadeia da polimerase (PCR) (Lichtenstein et al., 1995), e um teste baseado em fluorescência de polarização (FP) usando peptídeo derivado de gp45 tem sido desenvolvido (Tencza et al., 2000), citado por Leroux (2004). O teste mais recentemente descrito foi a PCR em tempo real (Cook et al., 2002; Quilivan et al., 2007).

Atualmente o diagnóstico laboratorial de rotina da doença tem sido realizado basicamente utilizando-se dois testes

sorológicos, a imunodifusão em gel de ágar e o ensaio imunoenzimático (ELISA), quando os resultados desses testes são discrepantes o Western blot pode ser usado como teste confirmatório (Issel, 1993).

### 2.3.1 IDGA

O teste sorológico de imunodifusão para o diagnóstico da AIE usando a proteína do core viral p26 foi descrito por Coggins e Norcross em 1970. Coggins fez a primeira observação do antígeno da AIE e Norcross, colaborador do projeto, confirmou a especificidade do mesmo (Coggins, 1994).

O princípio do teste consiste numa migração simultânea do antígeno e do anticorpo em sentido convergente em agar gel formando complexos antígeno-anticorpo insolúveis que precipitam, tornando-se visíveis sob a forma de linha de precipitação (Figura 3).

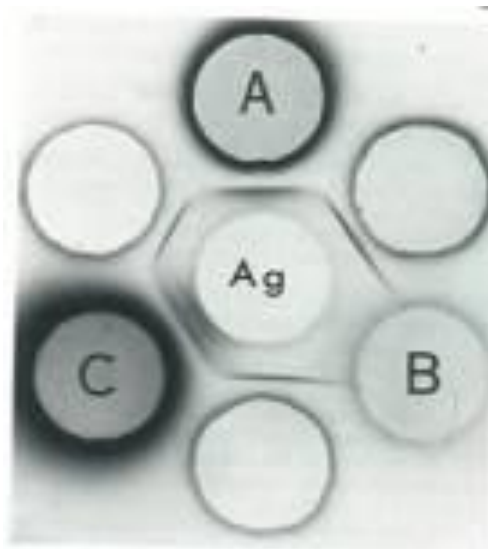


Figura 3. Teste IDGA. A: amostra positiva, B: amostra negativa, C: amostra positiva, Ag: Antígeno, Círculos Brancos: Anti-soro controle.

Atualmente, o teste IDGA é a prova qualitativa reconhecida oficialmente pela OIE e também utilizada como referência no Brasil. A limitação da IDGA está relacionada a amostras com baixos níveis de anticorpos

em que se torna difícil efetuar a leitura do teste como positivo, então resultados falsos negativos podem ser reportados, já que a leitura é visual e subjetiva, sujeita a erros de interpretação.

### 2.3.2 ELISA

O teste imunoenzimático baseia-se na imobilização de um dos reagentes (no caso

antígeno) em fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima com preservação tanto da atividade enzimática como imunológica (Figura 4).

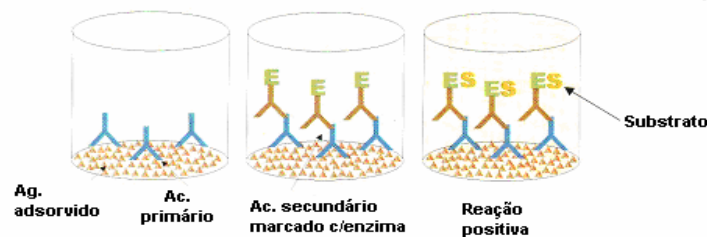


Figura 4. Teste ELISA

Após a introdução do ELISA (Van Weeman e Schwurs, 1971; Engvall e Perlmann, 1971) e da aplicação desse método para diagnóstico virológico (Voller, 1975) muitos laboratórios iniciaram o desenvolvimento do ELISA para detecção viral. Segundo Burki (1992) e Reis (1994) testes imunoenzimáticos baseados em ensaios competitivos ou não-competitivos tem sido desenvolvidos e comparados com o teste IDGA. As técnicas de ELISA que podem evidenciar os anticorpos contra a p26 tem sido também descritas, algumas estão atualmente sendo comercializadas (Toma, 1990). A limitação do ELISA está relacionada à ocorrência de resultados falsos positivos com maior frequência em relação ao IDGA (OIE, 2005).

Reis et al. (1997) desenvolveram um ELISA utilizando a glicoproteína recombinante gp90 detectando anticorpos anti VAIE mais precocemente do que o ELISA que utiliza proteína p26. É um método que combina a especificidade de um anticorpo com a sensibilidade de um ensaio simples enzimático. O método é indireto. O antígeno (gp90) adsorvido ao suporte sólido forma um complexo antígeno-anticorpo quando o anticorpo está presente na amostra em

teste. O conjugado é adicionado e liga-se ao complexo formado caracterizando a fase imunológica do teste. A medida da atividade enzimática se efetua por uma solução de cromogênio-substrato que, seguida pela ação enzimática, produz uma coloração que é quantificada pela medida da densidade óptica da solução. A cor formada (DO) é proporcional a quantidade de anticorpos específicos no soro ou plasma.

Nos últimos anos, a detecção dos anticorpos do VAIE pelo método ELISA tem sido feita em alguns países onde são comercializados em vários formatos (Paré, 2004). Atualmente há um consenso sobre sua maior sensibilidade no diagnóstico da AIE (Reis et al., 1994; Piza et al., 2006 citado por More et al., 2008, <http://dept.ca.uky.edu/eia>).

### 2.4 Validação de testes diagnósticos

Testes diagnósticos tem importantes aplicações em medicina veterinária, são usados em pesquisas, estudos epidemiológicos, em programas de erradicação e para confirmar e/ou definir o estágio de uma infecção, imunidade de um animal ou grupo de animais. A globalização

do comércio de animais tem aumentado o interesse em saúde animal e resultado em esforços para aperfeiçoar a qualidade diagnóstica dos testes (Greiner e Gardner, 2000).

A validação é um estudo conduzido com o objetivo de obter a estimativa da acurácia. Segundo Greiner (2000), considerando os diversos cenários em que os testes diagnósticos são validados e utilizados, apresenta-se como uma terminologia inconsistente e que na prática, um padrão simples para validação de testes não tem sido concordante. A OIE preconiza um procedimento padrão para validação e certificação de ensaios diagnósticos (SOP for OIE, versão 2.0,10/2007) contemplando um estudo com quatro estágios. O primeiro estágio, requer estudos de calibração, repetibilidade, sensibilidade e especificidade analítica, no segundo estágio, análise de amostras referências positivas e negativas incluindo descrição biológica do animal e estimativa do desempenho do teste com e sem animal referência definido. O terceiro estágio contempla identificação de laboratórios, painel de avaliações e reprodutibilidade, finalizando com o quarto estágio incluindo programas de testes interlaboratoriais e reconhecimento internacional.

Com o objetivo de assegurar a acurácia de um teste diagnóstico são avaliadas duas características importantes, que se constituem na estimativa da capacidade do teste em detectar animal infectado chamada de sensibilidade, e ao mesmo tempo, a capacidade do teste conferir a resposta correta se o animal em questão não está infectado, que denomina-se por especificidade. Outra investigação realizada no teste é a comparação desse teste com um Padrão ouro (Gold Standard).

#### 2.4.1 Gold Standard

Um dos conceitos atribuídos a um “Gold Standard” é o de ser um teste ou procedimento que é absolutamente exato. Em uma análise criteriosa, na verdade, existem poucos “Gold Standard” “verdadeiros”. O grupo de epidemiologia da

Universidade da Califórnia, Davis, define “Gold Standard” como um teste diagnóstico que possui sensibilidade e especificidade de alta qualidade.

No Brasil a NBR 14501 (ABNT, 2001) define o Método de Referência como o método minuciosamente investigado, no qual descrições claras e exatas das condições e procedimentos são dadas para a exata determinação de um ou mais valores de analitos, e no qual a exatidão e a precisão documentada do método são compatíveis com o uso para avaliar a exatidão de outros métodos para se medir os mesmos valores, ou para designar valores de métodos de referência para materiais de referência.

#### 2.4.2 Testes de precisão

Precisão refere-se à capacidade do teste diagnóstico produzir resultados consistentes dentro do limite de erro aceitável quando a amostra é retestada. Conforme a condição do reteste a repetibilidade é avaliada com os testes intra-ensaio, intra-placa e a reprodutibilidade avaliada em dias diferentes, operadores diferentes ou interlaboratórios. Dybkaer, 1995 (citado por Greiner, 2000) relata a precisão como a proximidade da concordância entre as repetidas medidas da mesma amostra sob condições determinadas.

#### 2.4.3 Curva ROC

A curva ROC (receiver operating characteristic) iniciou-se com a teoria de detecção de sinais. Consiste em um gráfico da sensibilidade versus 1-especificidade permitindo a medida da acurácia global através do cálculo da área sob a curva. A sensibilidade é a fração de casos positivos que são corretamente classificados pelo teste diagnóstico enquanto a especificidade é a fração de casos negativos corretamente classificados (Pepe, 2003). Representa outra medida do desempenho do teste diagnóstico expondo graficamente o (“trade-off”) equilíbrio entre sensibilidade e a especificidade e está sendo benéfico na determinação do melhor “cut-off” para uso clínico (Florkowski, 2008).

#### 2.4.4 Modelo Bayesiano

O modelo foi desenvolvido no século 18 pelo reverendo inglês Thomas Bayes (1702-1761). A idéia de Bayes para o cálculo de probabilidades foi publicada postumamente pela Royal Society com o título "Ensaio Voltado para Solução de um Problema na Doutrina do Acaso" e é uma explicação de como ele abordava os problemas propostos pelos matemáticos anteriores a ele. O trabalho passou a ser conhecido como Teorema de Bayes.

O teorema de Bayes proporciona a base para obtenção da atualização (distribuição *a posteriori*) sobre a hipótese existente (distribuição *a priori*), gerando novos dados (Verossimilhança). Os dados podem ser resultados de teste diagnóstico, ensaio clínico, experimentos laboratoriais ou estudo de fator de risco. O teorema pode ser escrito formalmente como:

$$\Pr(H|\text{Dados}) = \Pr(\text{Dados}|H) * \Pr(H) / \Pr(\text{Dados})$$

e a versão verbal da regra de Bayes expressa como:

$$\text{distribuição } a \text{ posteriori de } \theta = \frac{\text{distribuição } a \text{ priori de } \theta \times \text{verossimilhança}}{\text{fator de normalização}}$$

O método Bayesiano pode ser aplicado a diversas áreas do conhecimento e nos últimos 5 anos tem se verificado crescimento em sua aplicação na ciência veterinária, especialmente nas áreas de validação de testes e estimativa de prevalência (Gardner, 2002).

O uso da probabilidade *a posteriori*, valores preditivos no contexto de testes diagnósticos, condicionados a sensibilidade e especificidade do teste e prevalência da doença representam a ferramenta Bayesiana clássica que foi introduzida a ciência clínica por Galen e Gambino em 1975 (Greiner, 2000).

A informação *a priori* se encontra provavelmente disponível para o estudo vindo de relato de experimentos prévios. Teta ( $\theta$ ) é considerado uma variável aleatória e o teorema de Bayes transforma um conhecimento *a priori* de  $\theta$ , representado pela densidade *a priori*, em densidade *a posteriori*. Essa transformação é a combinação da informação *a priori* de  $\theta$  com a informação da amostra representada por  $f(x|\theta)$  onde  $x = (x_1, x_2, \dots, x_n)$  representando uma amostra aleatória do  $n$  total vindo do espaço amostral.

Thomas Bayes considerou um experimento binomial com  $n$  ensaios e assumiu que a probabilidade de sucesso de  $\theta$  era uniformemente distribuída e apresentou uma forma para calcular  $\Pr(a \leq \theta \leq b|x=p)$  onde  $x$  é o número de sucessos no ensaio independente. Assumindo também que o parâmetro era uniformemente distribuído, ele estava assumindo a imprecisão da informação *a priori* para  $\theta$  (Broemeling, 2007).

A informação *a priori* é combinada com a equação :

$$f(x / \theta) = \binom{n}{x} \theta^x (1 - \theta)^{n-x},$$

via teorema de Bayes com o objetivo de fazer inferências sobre os parâmetros. Onde  $x$  é o número de sucessos = 0,1,2,...,n. Na distribuição condicional de  $x$ , o número de sucessos é indicado por  $x \sim \text{binomial}(\theta, n)$ .

A distribuição beta é apropriada para a probabilidade de modelo binomial (sensibilidade, especificidade e prevalência) porque é flexível no uso e diferentes condições podem ser alcançadas pela

alteração da magnitude de  $\alpha$  e  $\beta$ . Além da distribuição beta simplificar o uso da Amostragem de Gibbs (Gardner, 2002).

Os métodos de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), dentre os quais se destaca a amostragem de Gibbs, podem ser utilizados como uma ferramenta de forma a propiciar uma inferência Bayesiana. O algoritmo de Gibbs é aplicado para gerar um valor para cada parâmetro desconhecido produzindo uma cadeia de amostras de Gibbs do número de ciclos especificados.

Ao final de  $N$  iterações, é obtido então um conjunto de  $N$  valores para cada parâmetro, sendo que estes conjuntos representam as amostras das distribuições marginais a *posteriori* dos parâmetros. À medida que o número de iterações aumenta, o conjunto de valores gerados aproxima de sua condição de equilíbrio. Assim, assume-se que a convergência é atingida em uma iteração cuja distribuição esteja arbitrariamente próxima da distribuição de equilíbrio, ou seja, da distribuição marginal desejada (NOGUEIRA et al., 2004).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Dados em estudo

O material do projeto constituiu nos dados originados na dissertação de mestrado de Martins (2004) e Almeida (2005). Sendo utilizados 1006 resultados de Martins (2004) e 641 de Almeida (2005) na determinação do ponto de corte. Na análise Bayesiana foram utilizados os 1006 resultados de Martins (2004). Os dados referem-se a resultados de testes sorológicos para o diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina, pelos imunodiagnósticos IDGA p26 (Coggins, 1970) e ELISA rpg90 segundo Reis (1997) incluindo dados biológicos como raça, sexo e idade. Para avaliação da imprecisão do ELISA foram utilizados replicatas de testes, controles negativos e positivos, realizados no laboratório de Retrovírus (RETROLAB) do Departamento de Medicina Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### 3.2 Estudo de validação

O estudo de validação, foi realizado contemplando parte dos testes preconizados nos estágios 1 e 2, dos requerimentos básicos, das normas estabelecidas pelo procedimento operacional padrão para validação e certificação de testes diagnósticos de uso veterinário, preconizado pela OIE versão 2.0 10/2007 (disponível em <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A-00082.htm>) visando a unificar os conceitos, e a assegurar a comparabilidade dos resultados para todos os países promotores de pesquisas semelhantes.

##### 3.2.1 Avaliação da imprecisão

A repetitividade e reprodutibilidade do ELISA rpg90 foi estimada utilizando resultados de replicatas de testes dos controles negativos e positivos corretamente classificados, utilizando um  $n=55$ . A média, o desvio padrão e coeficiente de variação (CV) foram computados através do Excel versão 2007 e posteriormente os CVs avaliados em relação aos dados de precisão encontrados em estudo de comparação de imunoenaios (ELISA) comerciais para diagnóstico da anemia infecciosa equina (Paré, 2004).

##### 3.2.2 Avaliação do ponto de corte

O ponto de corte do ELISA foi avaliado através da curva ROC considerando o IDGA como Gold standard. Os dados, 1006 resultados de Martins (2004) e 641 de Almeida (2005), foram tratados no software STATA versão 10. Esse programa possibilitou a avaliação da acurácia global através da área sob a curva ROC e o estudo da sensibilidade e especificidade com vários pontos de corte gerando uma tabela do impacto de cada ponto de corte na sensibilidade e especificidade com detalhamento do "likelihood" positivo e negativo conformando, assim, um conjunto de informações que subsidiaram uma melhor identificação, a partir dos parâmetros avaliados, do ponto de corte ideal contribuindo para garantir uma melhor qualidade na análise do teste diagnóstico.

### 3.2.3 Análise Bayesiana

A qualidade dos testes diagnósticos foi mensurada através dos indicadores de validade do teste, sensibilidade e especificidade, verificando os índices que combinam a sensibilidade e especificidade e a razão de verossimilhança positiva e negativa. A análise incluiu também o valor preditivo positivo, probabilidade de um indivíduo ter a doença quando o teste é positivo e o valor preditivo negativo, probabilidade de um indivíduo não ter a doença quando o teste é negativo. Nessa análise a unidade de investigação compreendeu os dados da população estudada na dissertação de Martins (2004).

A situação do modelo Bayesiano considerada foi a que é aplicável a dois testes diagnósticos, independentes, para a mesma doença e nenhum teste pode ser considerado como Gold standard.  $P=1$  (população) e  $D=2$  (testes diagnósticos) estimando 5 parâmetros: sensibilidade e especificidade para cada teste e adicionalmente a prevalência na população segundo Joseph (1995).

O parâmetro beta *a priori* para a prevalência da Anemia Infecciosa Equina usado foi beta (1,1) ou seja, uma distribuição uniforme.

As densidades beta *a priori* para os pontos de corte do ELISA rgp90 que representam os cenários em estudo, foram calculadas utilizando-se do programa escrito em S-PLUS, como não há relatos de dados *a priori* do teste IDGA foi considerado o mesmo como teste perfeito e utilizou-se coeficientes Beta (1,1) como dados de entrada. Posteriormente, através da função de verossimilhança os dados foram combinados com a distribuição *a priori* para derivar a distribuição *a posteriori* usando o teorema de Bayes. A aproximação da densidade posterior marginal de todos os parâmetros de interesse para dois testes diagnósticos na ausência do Gold Standard

foram calculados usando o método da amostragem de Gibbs. Através desse método executou-se 20500 iterações sendo as 500 primeiras para obter a convergência e as 20000 posteriores para a inferência Bayesiana utilizando-se do programa BayesDiagnosticTests que utiliza o WinBUGS (Bayesian inference Using Gibbs Sampling) para saída dos resultados (disponível em <http://www.medicine.mcgill.ca/epidemiology/Joseph>).

As densidades *a posteriori* para os parâmetros dos testes, relativas aos cenários em estudo, foram obtidas utilizando os resultados dos testes diagnósticos independentes e combinados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Repetitividade e Reprodutibilidade

Na análise da variação intra-placa foram encontrados, para o controle negativo, média = 0,188, desvio padrão = 0,014 e coeficiente de variação = 7,58%, para o controle positivo média = 0,692, desvio padrão = 0,046 e coeficiente de variação = 6,65%.

Avaliando a imprecisão total do teste foram encontrados para o controle negativo, média = 0,159, desvio padrão = 0,036 e coeficiente de variação = 22,37%, para o controle positivo média = 0,939, desvio padrão = 0,209 e coeficiente de variação = 22,24%.

### 4.2 Ponto de corte

A avaliação inicial do rgp90 com o ponto de corte estabelecido através do cálculo: média de DO do controle negativo + 2X desvio padrão dos negativos, definido como negativo  $DO < 0,220$  e positivo  $DO \geq 0,264$  segundo Martins (2004) apresentou um valor de 0,9798 da área sob a curva com intervalo de confiança 95% de 0,96 a 0,99 (Gráfico 1).

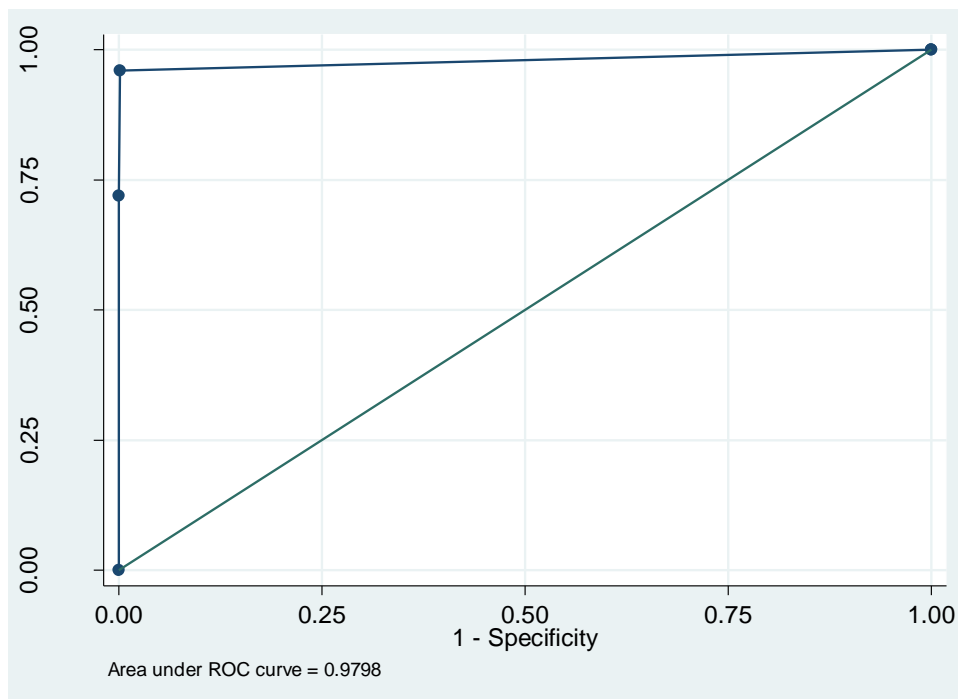


Gráfico 1. Curva ROC do ELISA rpg90 utilizando IDGA como Gold Standard

#### 4.2.1 Análise do “trade-off” sensibilidade/ especificidade

A tabela 1 registra o impacto de diferentes “cut off” no equilíbrio da sensibilidade e especificidade do ELISA rpg90. Os pontos de corte 0,220, 0,224, 0,228 e 0,232 apresentaram valores somatórios da sensibilidade e especificidade de 177,56, 177,67, 171,22 e 164,67 respectivamente, observando-se uma variação de 97,27% a 97,49% nos resultados corretamente classificados, 80% a 66,67% para os valores de sensibilidade, 97,56% a 98,00%

para as especificidades encontradas, valores de “Likelihood” positivo (LR+) entre 32,72 e 33,3 e “Likelihood” negativo (LR-) de 0,20 a 0,34, definindo assim a faixa de estudo a ser realizada na análise Bayesiana.

O ajustamento dos valores observados de sensibilidade versus 1- Especificidade dos vários pontos de corte da tabela 1 pode ser visualizada no gráfico 2 possibilitando a avaliação da proximidade dos pontos da curva em relação ao ponto (0,1).

Tabela 1- Impacto da alteração do ponto de corte do ELISA rgp90 no desempenho do teste.

| Ponto de corte | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) | Corretamente classificados (%) | LR+     | LR-    |
|----------------|-------------------|--------------------|--------------------------------|---------|--------|
| y = 0          | 100,00            | 0,00               | 1,64                           | 1,0000  |        |
| y = 0,200      | 86,67             | 96,22              | 96,07                          | 22,9412 | 0,1386 |
| y = 0,220      | 80,00             | 97,56              | 97,27                          | 32,7273 | 0,2050 |
| y = 0,224      | 80,00             | 97,67              | 97,38                          | 34,2858 | 0,2048 |
| y = 0,228      | 73,33             | 97,89              | 97,49                          | 34,7368 | 0,2724 |
| y = 0,232      | 66,67             | 98,00              | 97,49                          | 33,3333 | 0,3401 |
| y = 0,236      | 66,67             | 98,33              | 97,81                          | 40,0001 | 0,3390 |
| y = 0,240      | 60,00             | 98,56              | 97,92                          | 41,5383 | 0,4059 |
| y = 0,244      | 60,00             | 98,67              | 98,03                          | 45,0002 | 0,4054 |
| y = 0,248      | 46,67             | 98,89              | 98,03                          | 41,9999 | 0,5393 |
| y = 0,252      | 33,33             | 99,22              | 98,14                          | 42,8571 | 0,6719 |
| y = 0,256      | 26,67             | 99,22              | 98,03                          | 34,2857 | 0,7391 |
| y = 0,260      | 13,33             | 99,44              | 98,03                          | 23,9999 | 0,8715 |
| y = 0,264      | 0,00              | 99,78              | 98,14                          | 0,0000  | 1,0022 |
| y = 0,268      | 0,00              | 99,89              | 98,25                          | 0,0000  | 1,0011 |
| y = 0,268      | 0,00              | 100,00             | 98,36                          |         | 1,0000 |

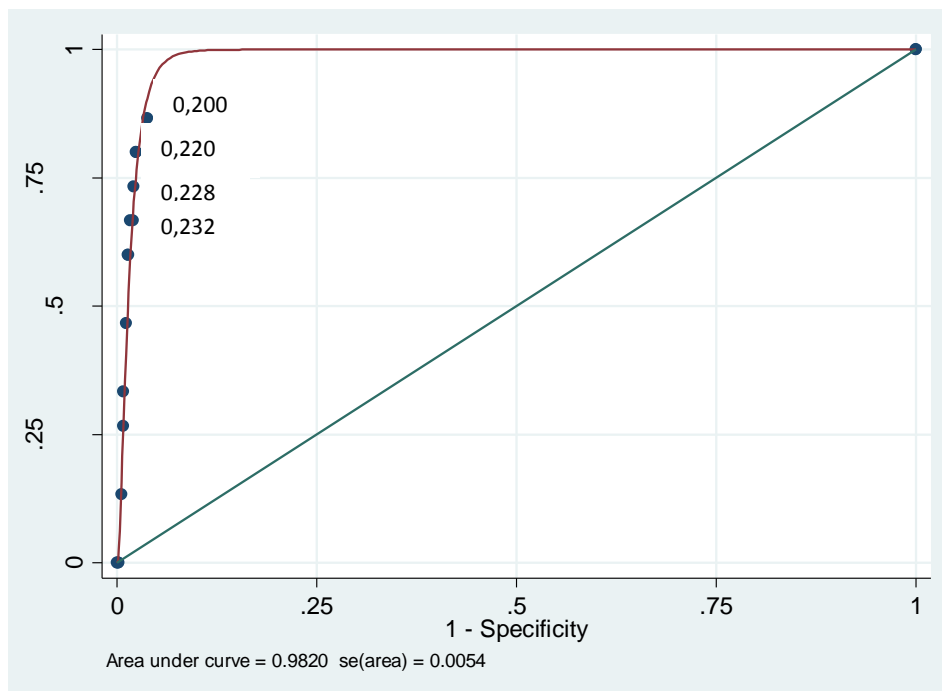


Gráfico 2. Curva ROC dos pontos de corte em estudo do ELISA rgp90

### 4.3 Estimativa Bayesiana

#### 4.3.1 Densidades Beta *a priori*

As tabelas 2, 3 e 4 mostram os resultados dos testes sorológicos obtidos pelo IDGA e ELISA com cut off 0,220, 0,228 e 0,232 constituindo dados de entrada para a

construção das densidades beta a priori. Na tabela 5 observa-se as faixas e as densidades beta a priori ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) assumidas para os parâmetros do teste no diagnóstico da AIE para cada situação em estudo. O ponto de corte 0,228 apresenta uma faixa menor tanto para a sensibilidade quanto para a especificidade quando comparado aos pontos 0,220 e 0,232.

Tabela 2. Resultados do ELISA rgp90 (cut off 0,220) e IDGA

|             |   | IDGA |     |       |
|-------------|---|------|-----|-------|
|             |   | +    | -   | Total |
| ELISA rgp90 | + | 92   | 33  | 125   |
|             | - | 3    | 878 | 881   |
| Total       |   | 95   | 911 | 1006  |

Tabela 3. Resultados do ELISA rgp90 (cut off 0,228) e IDGA

|             |   | IDGA |     |       |
|-------------|---|------|-----|-------|
|             |   | +    | -   | Total |
| ELISA rgp90 | + | 91   | 30  | 121   |
|             | - | 4    | 881 | 885   |
| Total       |   | 95   | 911 | 1006  |

Tabela 4. Resultados do ELISA rgp90 (cut off 0,232) e IDGA

|             |   | IDGA |     |       |
|-------------|---|------|-----|-------|
|             |   | +    | -   | Total |
| ELISA rgp90 | + | 90   | 29  | 119   |
|             | - | 5    | 882 | 887   |
| Total       |   | 95   | 911 | 1006  |

Tabela 5. Densidades beta *a priori* para o IDGA e ELISA rgp90

| Teste                        | Sensibilidade |                  |         | Especificidade |                  |         |
|------------------------------|---------------|------------------|---------|----------------|------------------|---------|
|                              | Faixa (%)     | Coeficiente Beta |         | Faixa (%)      | Coeficiente Beta |         |
|                              |               | $\alpha$         | $\beta$ |                | $\alpha$         | $\beta$ |
| IDGA                         | 0-100         | 1                | 1       | 0-100          | 1                | 1       |
| ELISA (Ponto de corte 0,220) | 94-100        | 119,25           | 3,89    | 95-98          | 935,49           | 35,23   |
| ELISA (Ponto de corte 0,228) | 93-98         | 93,71            | 4,11    | 96-97          | 916,33           | 35,23   |
| ELISA (Ponto de corte 0,232) | 90-99         | 93,30            | 5,19    | 96-98          | 919,23           | 30,28   |

#### 4.3.2 Cenários

Os resultados obtidos por meio do algoritmo de amostradores Gibbs são mostrados nas tabelas 6, 7 e 8 em que aparecem as medianas *a posteriori* para os parâmetros, sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo

(VPP) e valor preditivo negativo (VPN) com seus respectivos intervalos de credibilidade (IC) 95%. Os limites inferior e superior desses intervalos de credibilidade são dados respectivamente pelos percentis 2,5% e 97,5%.

Tabela 6- Parâmetros *a posteriori* do ELISA rgp90 (cut off 0,220) e IDGA

|                        |       | IDGA    |             | ELISA   |             | Testes combinados |             |
|------------------------|-------|---------|-------------|---------|-------------|-------------------|-------------|
|                        |       | Mediana | 95% IC      | Mediana | 95% IC      | Mediana           | 95% IC      |
|                        | $\pi$ | 0,498   | 0,015-0,98  | 0,095   | 0,070-0,120 | 0,099             | 0,080-0,121 |
| <b>IDGA</b>            | S1    | 0,096   | 0,007-0,851 |         |             | 0,942             | 0,827-0,997 |
|                        | E1    | 0,902   | 0,142-0,993 |         |             | 0,997             | 0,991-1,0   |
|                        | VPP1  | 0,499   | 0,017-0,983 |         |             | 0,978             | 0,924-0,998 |
|                        | VPN1  | 0,502   | 0,003-0,996 |         |             | 0,993             | 0,979-1,0   |
| <b>ELISA<br/>0,220</b> | S2    |         |             | 0,970   | 0,930-0,991 | 0,976             | 0,947-0,992 |
|                        | E2    |         |             | 0,964   | 0,951-0,974 | 0,966             | 0,957-0,97  |
|                        | VPP2  |         |             | 0,739   | 0,619-0,824 | 0,762             | 0,689-0,832 |
|                        | VPN2  |         |             | 0,996   | 0,991-0,999 | 0,997             | 0,993-0,999 |

S: sensibilidade, E: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo,  $\pi$ : prevalência, IC: intervalo de credibilidade a 95%.

Tabela 7- Parâmetros *a posteriori* do ELISA rgp90 (cut off 0,228) e IDGA

|                              |      | IDGA    |             | ELISA   |             | Testes combinados |             |
|------------------------------|------|---------|-------------|---------|-------------|-------------------|-------------|
|                              |      | Mediana | 95% IC      | Mediana | 95% IC      | Mediana           | 95% IC      |
| $\pi$                        |      | 0,498   | 0,015-0,98  | 0,095   | 0,070-0,121 | 0,098             | 0,079-0,120 |
| <b>IDGA</b>                  | S1   | 0,096   | 0,007-0,851 |         |             | 0,943             | 0,831-0,997 |
|                              | E1   | 0,902   | 0,142-0,993 |         |             | 0,997             | 0,991-0,999 |
|                              | VPP1 | 0,499   | 0,017-0,983 |         |             | 0,975             | 0,913-0,998 |
|                              | VPN1 | 0,502   | 0,003-0,996 |         |             | 0,994             | 0,979-0,999 |
| <b>ELISA</b><br><b>0,228</b> | S2   |         |             | 0,960   | 0,908-0,988 | 0,968             | 0,937-0,989 |
|                              | E2   |         |             | 0,967   | 0,954-0,977 | 0,969             | 0,960-0,978 |
|                              | VPP2 |         |             | 0,755   | 0,63-0,839  | 0,778             | 0,705-0,846 |
|                              | VPN2 |         |             | 0,995   | 0,989-0,998 | 0,996             | 0,992-0,998 |

S: sensibilidade, E: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo,  $\pi$ : prevalência, IC: intervalo de credibilidade a 95%.

Tabela 8- Parâmetros *a posteriori* do ELISA rgp90 (cut off 0,232) e IDGA

|                              |      | IDGA    |             | ELISA   |             | Testes combinados |             |
|------------------------------|------|---------|-------------|---------|-------------|-------------------|-------------|
|                              |      | Mediana | 95% IC      | Mediana | 95% IC      | Mediana           | 95% IC      |
| $\pi$                        |      | 0,498   | 0,015-0,98  | 0,095   | 0,070-0,121 | 0,098             | 0,079-0,120 |
| <b>IDGA</b>                  | S1   | 0,096   | 0,007-0,851 |         |             | 0,944             | 0,83-0,997  |
|                              | E1   | 0,902   | 0,142-0,993 |         |             | 0,997             | 0,990-0,999 |
|                              | VPP1 | 0,499   | 0,017-0,983 |         |             | 0,972             | 0,911-0,998 |
|                              | VPN1 | 0,502   | 0,003-0,996 |         |             | 0,994             | 0,979-0,999 |
| <b>ELISA</b><br><b>0,232</b> | S2   |         |             | 0,949   | 0,894-0,981 | 0,958             | 0,911-0,984 |
|                              | E2   |         |             | 0,968   | 0,956-0,978 | 0,971             | 0,961-0,979 |
|                              | VPP2 |         |             | 0,759   | 0,642-0,843 | 0,781             | 0,708-0,849 |
|                              | VPN2 |         |             | 0,994   | 0,987-0,998 | 0,995             | 0,990-0,998 |

S: sensibilidade, E: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo,  $\pi$ : prevalência, IC: intervalo de credibilidade a 95%.

## 5. DISCUSSÃO

Esse trabalho descreve a aplicação de ferramenta estatística avançada na avaliação e comparação dos resultados dos testes diagnósticos ELISA rgp90 desenvolvido no Brasil e teste clássico IDGA que detecta anticorpos contra a proteína 26 (p26) teste considerado como oficial no Brasil e em outros países.

A avaliação da imprecisão total do teste rgp90 apresentou um coeficiente de variação de 22,37% para o controle negativo e 22,24% para o controle positivo sugerindo uma similaridade de imprecisão quando foram comparados esses resultados com os valores máximos de coeficientes de variação (CVs) de 29%, 33% e 36%,

encontrados no estudo realizado por Paré (2004) para quatro diferentes testes ELISA comercialmente disponíveis nos Estados Unidos no formato competitivo e indireto que utilizam como antígeno p26, gp45 e p26+gp45. Observa-se também essa analogia quando foi avaliada a variação intra-placa do teste, onde foram verificados CVs de 7,58% e 6,65% para os controles negativo e positivo respectivamente enquanto os valores de CVs individuais para os diversos ELISA em estudo por Paré (2004) foram de 1% a 23%.

O ELISA indireto rgp90 mostrou também uma performance adequada quando foi avaliada a área sob a curva ROC em comparação com o IDGA como referência demonstrando que o ponto de corte com DO de 0,220 estabelecido por Martins (2004),

utilizando a estatística convencional, conduz a um índice elevado de animais com resultados corretamente classificados (97,27%) como pode ser visto na tabela 1. Segundo Florkowski (2008) parâmetros do teste diagnóstico não são propriedades intrínsecas dos testes e são criticamente dependentes do contexto clínico dentro dos quais estão sendo empregados. Portanto, entendemos que o aprimoramento do estudo se faz necessário para ampliar o conhecimento sobre o diagnóstico da doença. Então, com esse objetivo foi utilizado o estudo do “trade-off” no qual os pontos de corte 0,228 e 0,232 apresentaram uma elevação da porcentagem de corretamente classificados para 97,49% e um aumento da especificidade para 97,89% e 98,00% respectivamente, associada a uma diminuição da sensibilidade de 80,00% (cut off 0,220) para 73,33% (cut off 0,228) e 66,67% (cut off 0,232). Embora o ganho de corretamente classificados e da especificidade do “cut off” 0,232 seja maior, a perda da sensibilidade favorece um aumento do número de falsos negativos. Em uma possível alteração do ponto de corte de 0,220 para 0,228 haveria um ganho na classificação dos resultados e na especificidade e a perda da sensibilidade seria menor, além de apresentar um aumento na chance de um animal doente ter a doença quando o teste é positivo indicado pelo valor de LR positivo igual a 34,73 o que não acontece com o cut off 0,220 e 0,232 que apresentam valores de LR positivo igual a 32,72 e 33,33 respectivamente.

Nas tabelas 2x2, construídas com os pontos de corte em discussão, o aumento do DO do ponto de corte aumenta também a concordância dos resultados negativos para os testes IDGA e ELISA rgp90 no valor de 878 para 881 ou 882 (tabelas 2, 3 e 4). Essa alteração pode ser explicada pela passagem de resultados de testes ELISA positivos para negativos e visualizada nas segundas colunas das tabelas 3 e 4. No caso da discordância dos resultados do IDGA positivo e ELISA negativo também ocorre um aumento de ocorrência de 3 para 5. Nessa situação verifica-se que as amostras apresentam DO próximas do

ponto de corte embora Martins (2004) cite a consideração sobre a possibilidade de reação cruzada com outros retrovírus equinos desconhecidos segundo Langemeier et al. (1996).

Nas análises realizadas com os cenários criados para estimar a incerteza utilizando os 3 pontos de corte em estudo, a especificidade do ELISA rgp90 isolado apresentou intervalos de credibilidade 95% semelhantes (0,95-0,97), enquanto o ponto de convergência da sensibilidade diminuiu de 0,93 para 0,90 e 0,89. Quando essa situação é avaliada com os dados dos testes combinados as medianas tanto da sensibilidade como da especificidade apresentaram-se iguais para os pontos 0,220 e 0,228 diminuindo em relação ao ponto 0,232. Mesmo considerando o IDGA como “perfeito” os resultados demonstram uma convergência da sensibilidade no valor 0,83 na análise dos testes combinados.

Relacionando os resultados obtidos na análise do “trade-off” com os obtidos utilizando o modelo Bayesiano podemos observar que os valores para especificidade estão próximos dos encontrados na análise Bayesiana, o que não acontece com os valores da sensibilidade. Essa diferença talvez possa ser explicada pelo fato de que como citado por Greiner (2000) é conhecido que por evidências empíricas a sensibilidade do teste diagnóstico varia entre animais e entre populações a serem testadas devido a fatores biológicos como o estado imune do hospedeiro ou com o estágio da infecção.

Diferentes laboratórios possuem diferentes testes com sensibilidades e especificidades que dependem da qualidade dos equipamentos e do nível de “expertise” (Florkowski, 2008) gerando impactos significantes nos estudos epidemiológicos e interferindo nas medidas de controle da doença.

Uma análise frequentista usando um teste referência imperfeito pode resultar em estimativa enviesada do erro relativo dos dois testes. Mesmo quando um “Gold standard” não se encontra disponível é

possível estimar a incerteza do teste diagnóstico utilizando o método Bayesiano.

Estimativa *a priori* deve ser obtida de publicações de estudos de avaliação de testes, estudos piloto com o teste ou opinião de especialista, como apropriado.

É importante ressaltar que inferências Bayesianas mais precisas poderiam ser obtidas considerando distribuições *a priori* informativas justificadas a partir de opiniões de especialistas ou publicações sobre o teste IDGA. Após buscas exaustivas na literatura nenhum dado foi encontrado. Na ausência desses dados foi utilizado a informação *a priori* considerando o referido teste como perfeito.

Trabalhos que descrevem outros ELISA para AIE fazem a análise da acurácia utilizando estatística frequentista. Martins (2004) utilizando a estatística clássica encontrou a sensibilidade comparada de 97,81% e a especificidade de 96,16% para o rgp90. Em estudo realizado por Paré (2004) foram encontrados para diferentes testes de ELISA especificidade com intervalos de confiança de 89,9% a 95,7%, 99,1% a 100%, 98,8% a 100%, 95,2% a 99,0% e sensibilidade com intervalos de confiança de 99% a 100%, 81,1% a 90,7% e 94,5% a 98,9%.

Na análise Bayesiana realizada no presente trabalho os dados apresentaram para especificidade um intervalo de credibilidade de 0,95 a 0,97 e de sensibilidade de 0,93 a 0,99 (cut-off 0,220) e 0,95-0,97 (cut-off 0,228). Como não foi encontrado outro trabalho que tenha aplicado o modelo Bayesiano em estudo do diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina, não foi possível realizar comparação entre dados obtidos através desse modelo estatístico avançado.

Apesar de que, em geral, os intervalos de credibilidade Bayesianos, os quais incorporam a informação contextual específica do problema da distribuição *a priori*, não coincidirem com os intervalos de confiança frequentistas que são baseados unicamente na média, em uma comparação dos resultados das análises estatísticas

convencional e Bayesiana podemos observar uma repetição dos valores elevados reportados para sensibilidade do ELISA. Portanto, reforçando as recomendações de utilização do ELISA como método de triagem por detectar anticorpos na fase inicial da infecção (Issel e Cook, 1993; Reis et al., 1994).

Estudos acerca do uso dos diagnósticos descritos nesse trabalho deverão ser realizados em outras espécies de eqüídeos, como por exemplo asininos e muares, principalmente em regiões como o nordeste brasileiro onde os asininos predominam.

## 6. CONCLUSÕES

- A análise da área sob a curva ROC e a análise Bayesiana evidenciaram uma melhor acurácia com o ponto de corte 0,228 possibilitando o aumento da discriminação entre infectado e não infectado.

- Através da análise estatística Bayesiana o ELISA rgp90 apresentou um intervalo de credibilidade 95% de 0,93-0,99 para sensibilidade conferindo ao teste uma confiabilidade como método de triagem.

- Os valores da especificidade do ELISA rgp90 mantiveram-se próximos nas análises estatísticas clássica e Bayesiana apresentando um desempenho robusto na identificação dos animais negativos entre os verdadeiramente não infectados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Glossário de termos para uso no laboratório clínico e no diagnóstico in vitro. NBR 14501. Rio de Janeiro. 2001.

ALMEIDA, V.M.A.; GONÇALVES, V.S.P.; MARTINS, M.F. et al. Anemia infecciosa equina: prevalência em eqüídeos de serviço das propriedades de pecuária em Minas Gerais. Arq. Bras. Med.Vet. Zootec., Belo Horizonte., v.58, n.2, p.141-148, 2006.

- BURKI, F.; ROSSMANITH, W.; ROSSMANITH, E. Equine Lentivirus, compative studies on four serological teste for the diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet. Microbiol.*, v.33, p.353-360, 1992.
- Estudo do complexo do Agronegócio Cavalo. Disponível em <<http://www.cna.org/>>. Acesso em: 20 ago. 2009.
- COGGINS, L.; NORCROSS, N.L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Vet.*, v.60, p.330, 1970.
- COOK, R.F.; COOK, S.J.; Li, F. et al. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *J. Virol Meth.*, v.105, p.171-179, 2002.
- CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. Pathogen Safety: Equine Infectious Anemia, 2006. Disponível em <<http://www.inspection.gc.ca/anima/disemala/equiinfecste.shtml>>. Acesso em: 21 set. 2009.
- CUPP, E.W.; KEMEN, M.J. The role of stable flies and mosquitoes in the transmission of equine infectious anemia virus, *Proc. Annu. Meet. US Anim. Health Assoc.*, v.84, p.362–367, 1980.
- ENGVALL, E.; JONSSON, K.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunoabsorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labeled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim.Biophys. Acta.*, v.251, p.427-434, 1971.
- FLORKOWISK, C.M. Sensitivity, Specificity, Receiver-Operating Characteristic (ROC) Curves and Likelihood Ratios: Communicating the Performance of Diagnostic Tests. *Clin. Biochem. Rev.*; v.29, p.83-87, 2008.
- FOIL, L.D.; ADAMS W.V.; McMANUS J.M. et al. Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens. *J. Med. Entomol.*, v.24, p.613–616, 1987.
- GARDNER, IA. The utility of Bayes' theorem and Bayesian inference in veterinary clinical practice and research. *Aust. Vet. J.*, v.80, n.12, p.758-761, 2002.
- GREINER, M.; GARDNER, I.A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.*, v.45, p.3-22, 2000.
- GUERREIRO, M.G.; BAUER, A G.; GLOSS, R. M, et al. Simpósio sobre anemia infecciosa eqüina. Boletim do Instituto de Pesquisa Veterinária "Desidério Finamor", n.1/2, p.3-4, 1968.
- HAWKINS, J.A.; ADAMS, W.V.; COOK L. et al. Role of horse fly (*Tabanus fuscicostatus* Hine) and stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) in transmission of equine infectious anemia to ponies in Louisiana, *Am. J. Vet. Res.*, v.34, n.7, p.1583–1586, 1973.
- HUSSAIN, K.A.; ISSEL, C.J.; SCHNORR, K.L. et al. Antigenic analysis of equine infectious anemia virus (EIAV) variants using monoclonal antibodies: epitopes of glycoprotein 90 (gp90) of EIAV stimulate neutralizing antibodies. *J. Virol.*, v.61, p.2956-2961, 1987.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Rebanho nacional, 2007.
- ISSEL, C.J. Equine Infectious Anemia Program: Diagnosis and Control. Disponível em <<http://dept.ca.uky.edu/eia/>>. Acesso em: 21 set.2009.
- ISSEL, C.J.; ADAMS, W.V. Detection of Equine Infectious Anemia Virus in a horse with an equivocal agar gel immunodiffusion test reaction. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v.180, n.3, p.276-278, 1982.

- ISSEL, C.J.; COOK, R.F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet. Diagn.*, v.5, p.137-141, 1993.
- ISSEL, C.J.; FOIL, L.D. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v.184, p.293-297, 1984.
- ISSEL, C.J.; RUSHLOW, K.; FOIL, L.D.; MONTELARO, R.C. A perspective on Equine Infectious Anemia with an Emphasis on Vector Transmission and Genetic Analysis. *Vet. Microbiol.*, v.17, p.251-286, 1988.
- JOSEPH, L.; GYORKOS, T.W.; COUPAL, L. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am. J. Epidemiol.*, v.141, n.3 p.263-272, 1995.
- KONISHI, E.; YAMANISHI, H. Estimation of blood meal size of *Aedes albopictus* (Diptera culicidae) using enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Entomol.*, v.21, p.506-513, 1984.
- KONO U.; KOBAYASHI, K. Complement fixation of equine infectious anemia. Specificity of the test. *Nat. Inst. Anim. Health.*, v. 6, p.194–203, 1966.
- KONO Y.; KOBAYASHI, K.; FCUNAGA, Y. Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, v. 41, p.1–10, 1973.
- LEROUX, C.; CADORÉ, J.L.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia virus (EIAV): What has HIV's country cousin got to tell us?. *Vet. Res.*, v.35, p.1-19, 2004.
- LICHTENSTEIN, D.L.; RUSHLOW, K.E.; COOK, R.F. et al. Replication in vitro and in vivo of an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity. *J. Virol.*, v.69, p.2881-2888, 1995.
- MARTINS, M.F. *Comparação entre os testes IDGA (p26) e ELISA indireto (gp90) no diagnóstico da anemia infecciosa equina*. 2004.59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MCCONNICO, R.S. Predictive methods to define infection with equine infectious anemia virus infoals out of reator mares. *J. Eq. Vet. Sci.*, v.20, n.6 p.387-392, 2000.
- MONTELARO, R.C.; PAREKH, B.; ORREGO, A. et al. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. *J. Biol. Chem.*, v.259, p.10539–10544, 1984.
- MONTELARO, R.C.; BALL, J.M.; RUSHLOW, K.E. Equine retroviruses. In: LEVY (Ed.). *The retroviridae*. New York: Plenum Press, 1993. v.2, Cap.5, p.257-359.
- MORE, S.J.; AZNAR, I.; MYERS, T. et al. An outbreak of equine infectious anaemia in Ireland during 2006: The modes of transmission and spread in the Kildare cluster. *Equine. Vet. J.*, v.40, n.7, p.709-711, 2008.
- NOGUEIRA, D.A.; SÁFADI, T.; FERREIRA, D.F. Avaliação de critérios de convergência para o método de Monte Carlo via Cadeias de Markov. *R. Br. Est.*, IBGE, v.65, n.224, p.59-88, 2004.
- Manual Diagnostic Tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, 2005. Disponível em [http://www.oie.int/eng/normes/manual/A\\_00082.htm](http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_00082.htm). Acesso em: 16 abr. 2009.
- PARÉ, J.; SIMARD, C. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. *Can. J. Vet. Res.*, v.68, p.254-258, 2004.
- PEPE, M.S. (Ed.) *The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction*. New York: Oxford University Press, 2003.p.66-92.

- QUINLIVAN, M.; COOK, R.F.; CULLINANE, A. Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the gag gene. *Vet Rec.*, v.160, n.18, p.611-618, 2007.
- REIS, J.K.; MELO, LM.; REZENDE, M.R. et al. Use of an ELISA test in the eradication of equine infectious anaemia focus. *Trop. Animal. Health Prod.*, v.26, p.65-68, 1994.
- REIS, J.K.P. *Produção de antígenos recombinantes gp90 e p26 do vírus da Anemia infecciosa eqüina para uso em imunodiagnóstico*. UFMG, 1997. Tese (doutorado) Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ROSSMANITH, W.; HORVATH, E. Ein Western Blot test zur serologischen diagnose der Infekti sen Anämie der Pferde. *J. Vet. Med*, B36, p.49-56, 1989.
- SHEN, D.T.; GORHAN, J.R.; JONES, R.H. et al. Failure to propagate equine infectious anemia virus in mosquitos and *Culicoides variipennis*. *Am.J.Vet. Res.*, v.39, p.875-876, 1978.
- SELLON, D.C. Equine infectious anemia. *Vet. Clin. N. Am. Equine Practice.*, v.9, n.2, p.321-336, 1993.
- SENTSUI, H.; KONO, Y. Hemagglutination by several strains of equine infectious anemia virus. *Arch. Virol.*, v.67, p.75-84, 1981.
- TOMA, B.; ELOIT, M.; SAVEY, M. Las enfermedades animales por retrovirus: leucosis bovina enzoótica, anemia infecciosa de los équidos, artritis/ encefalitis caprina. *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.*, v.9, n.4, p.1077-1119, 1990.
- USHIMI, C.; NAKAJIMA, H.; TANAKA, S. Demonstration of equine infectious anemia viral antigen by immunofluorescence. *Nat. Inst. Anim. Health.*, v.10, p.90-91, 1970.
- VALLÉ, H.; CARRÉ, H. Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval, C. R. Acad. Sci., v.139, p.331-333, 1904.
- VOLLER, A.; HULDIT, G.; THORS, C. et al. New serological test for malaria antibodies. *Br. Med.J.*, v.1, p.659, 1975.