

Paulo Martins Soares Filho

**DESEMPENHO DE MÉTODOS DIRETOS E INDIRETOS PARA O DIAGNÓSTICO  
DA TUBERCULOSE BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais  
como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em  
Ciência Animal.

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola  
de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
Março / 2017

S676d Soares Filho, Paulo Martins, 1974-  
Desempenho de métodos diretos e indiretos para o diagnóstico da tuberculose bovina /  
Paulo Martins Soares Filho. – 2017.  
74 p. : il.

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Tuberculose em bovino – Diagnóstico –  
Teses. 3. Mycobacterium bovis – Teses. 4. Sorologia veterinária – Teses. I. Leite, Rômulo  
Cerqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.


CDD – 636.089 699 5

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**PAULO MARTINS SOARES FILHO**

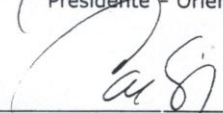
Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

Aprovada em 10 de Março de 2017, pela banca constituída pelos membros:




---

Prof. Rômulo Cerqueira Leite  
Presidente - Orientador




---

Dr. Jorge Caetano Júnior  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA



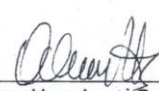
---

Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis  
Escola de Veterinária - UFMG



---

Dr. Leandro Barbieri de Carvalho  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA



---

Prof. Cairo Henrique Sousa de Oliveira  
Universidade Federal de Goiás - UFG



## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho ao Dr. Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota (LANAGRO - MG)  
e ao Dr. Antônio Cândido Cerqueira Leite Ribeiro (EMBRAPA – Juiz de Fora/MG)**

## AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho agradeço,

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, nas pessoas do Dr. José Alves – Chefe da ENAGRO/ MAPA/Brasília, Dr. Ricardo Aurélio Nascimento – coordenador do LANAGRO/MG, Dr. Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota – chefe da Divisão de Biossegurança do LANAGRO/MG, pela oportunidade e apoio.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG) pelo apoio à condução dos experimentos.

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade.

Ao Professor Rômulo Cerqueira Leite pela dedicada orientação, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade e respeito a mim dispensados.

Aos coorientadores, Professor Jenner Karlisson Pimenta dos Reis e Dr. Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota pela orientação e apoio.

Aos colegas de pós-graduação, especialmente a Marina de Azevedo Issa, Jamili Maria Suhett Mussi pela amizade e inestimável ajuda.

Aos colegas do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, em especial Alberto Knust Ramalho, Andre de Moura Silva, Mikael Arrais Hodon, Marina de Azevedo Issa, Antônio Augusto Fonseca Jr., Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota, Marcelo Fernandes Camargos, Patrícia Gomes de Souza, Leandro do Carmo Rezende, Gracielle Pereira, Lílian Cristian dos Santos pela amizade e dedicação e por propiciarem a execução do experimento.

Ao Serviço de Inspeção Federal, nas figuras dos colegas auditores federais agropecuários, por compreenderem a necessidade da avaliação dos métodos diagnósticos utilizados por eles e por se disporem a colaborar coletando e enviando amostras de material biológico indispensáveis à condução do experimento e avaliação dos testes *post-mortem*.

Aos proprietários das propriedades rurais, por permitirem a coleta do material, e aos colegas, veterinários habilitados, por realizarem e disponibilizarem dados de tuberculinizações para avaliação dos testes *ante-mortem*.

Ao Professor Fabiano Fonseca da Silva (Departamento de Zootecnia – UFV), Professor Carlos Henrique Osório Silva (Departamento de Estatística – UFV) e Márcio Rodrigues dos Santos Souza (Departamento de Estatística – UFV) pelos ensinamentos e apoio.

Ao Professor Lawrence Joseph pelos cálculos do número amostral.

À coordenação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), Gabriela Bicca da Silveira e Bárbara Medeiros Rosa, e seus representantes nos estados de Minas Gerais (Cristiane Moraes Alves - MAPA e Patrícia Prata Maluf – IMA), Mato Grosso (Janice Loris Barddal – MAPA) e Rondônia (Adelmar Bendler da Rocha – IDARON) pelo apoio e pelas informações fornecidas.

Ao Dr. Antônio Cândido Cerqueira Leite Ribeiro e ao Dr. Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota - minhas referências. Agradeço pela amizade, pelo apoio, pelos ensinamentos, pelo estímulo.

---

**SUMÁRIO**

---

	<b>RESUMO</b>	10
	<b>ABSTRACT</b>	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO 1 – LITERATURA CONSULTADA</b> .....	14
2.1	TUBERCULOSE BOVINA.....	14
2.2	TESTES DIAGNÓSTICOS.....	15
2.2.1	Diagnóstico <i>Post-mortem</i> .....	15
2.2.2	Diagnóstico <i>Ante-mortem</i> .....	18
2.3	METODOLOGIAS APLICADAS À AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS....	20
2.3.1	Índice Kappa e Qui-quadrado de McNemar.....	21
2.3.2	Sensibilidade e Especificidade.....	22
2.3.3	Curva ROC (Receiver Operating Characteristic Curve).....	23
2.3.4	Repetibilidade e Reprodutibilidade.....	24
2.3.5	Outras Metodologias de Avaliação.....	25
2.4	REFERÊNCIAS.....	27
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 2 – DESEMPENHO DE TRÊS TESTES <i>POST-MORTEM</i> PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA</b> .....	38
3.1	RESUMO.....	38
3.2	ABSTRAT.....	38
3.3	INTRODUÇÃO.....	40
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.4.1	Amostras.....	40
3.4.2	Isolamento e Identificação.....	41
3.4.3	PCR em tempo real (Qpcr) em tecidos.....	41
3.4.4	ELISA IDEXX®.....	42
3.4.5	Análises Estatísticas.....	42
3.5	RESULTADOS.....	43
3.6	DISCUSSÃO.....	46
3.7	CONFLITOS DE INTERESSE.....	49
3.8	REFERÊNCIAS.....	49
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DE UM TESTE ELISA COMERCIAL E DO TESTE DE TUBERCULINIZAÇÃO CERVICAL COMPARATIVA (TCC) PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA EM REBANHOS EM DIFERENTES FASES DO CONTROLE DA ENFERMIDADE E COM DIFERENTES PREVALÊNCIAS</b> .....	54
4.1	RESUMO.....	54
4.2	ABSTRACT.....	54
4.3	INTRODUÇÃO.....	55
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.4.1	Animais e rebanhos.....	56
4.4.2	Prova de tuberculinação cervical comparativa.....	57
4.4.3	ELISA IDEXX®.....	58
4.4.5	Análises estatísticas.....	58
4.4.6	Ética.....	59
4.5	RESULTADOS.....	59

4.6	DISCUSSÃO.....	62
4.7	REFERÊNCIAS.....	64
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>69</b>
6.1	Modelo para avaliação de dois testes diagnósticos da tuberculose bovina (Isolamento - DBac e ELISA) em amostras com lesão sugestiva de tuberculose - dados de 2010 e 2011.....	69
6.2	Modelos para avaliação de três testes diagnósticos para a tuberculose bovina (Isolamento - DBac, ELISA e PCR) em amostras com lesão sugestiva de tuberculose - dados de 2012 e 2013.....	69
6.2.1	Modelo 1 - sem correlação entre Isolamento (DBac), ELISA e PCR (três testes e uma população).....	69
6.2.2	Modelo 2 - correlação entre ELISA e PCR (três testes e uma população).....	70
6.2.3	Modelo 3 - correlação entre isolamento (DBac) e PCR (três testes e uma população).....	70
6.2.4	Modelo 4 - correlação entre isolamento (DBac) e ELISA (três testes e uma população).....	71
6.3	Modelos para avaliação dos testes diagnósticos ELISA e Tuberculinização Cervical Comparativa (TCC) em rebanhos com diferentes prevalências.....	72
6.3.1	Modelo Rebanho 1 (Inconclusivos no TCC = negativos).....	72
6.3.2	Modelo Rebanho 1 (Inconclusivos no TCC = positivos).....	72
6.3.3	Modelo Rebanho 2 (Inconclusivos no TCC = negativos).....	74
6.3.4	Modelo Rebanho 2 (Inconclusivos no TCC = positivos).....	74

---

#### LISTA DE TABELAS

---

<b>CAPÍTULO 1</b>		
Tabela 1	Sequências iniciadoras, concentrações, tamanhos dos fragmentos amplificados e alvos dos oligonucleotídeos utilizados nas PCR em tempo real.....	42
Tabela 2	Resultados do teste ELISA e do isolamento bacteriano em amostras com lesão sugestiva de tuberculose, encaminhadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) entre 2010 e 2011..	43
Tabela 3	Resultados do isolamento bacteriano, ELISA IDEXX™ e qPCR em amostras com lesão sugestiva de tuberculose, encaminhadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) entre 2012 e 2013.....	44
Tabela 4	Estimativas dos parâmetros de desempenho do isolamento bacteriano e do teste ELISA IDEXX™ em amostras com lesões sugestivas de tuberculose encaminhadas pelo Serviço de Inspeção Federal entre 2010 e 2011.....	44
Tabela 5	Estimativas dos parâmetros de desempenho de isolamento bacteriano, ELISA IDEXX®, qPCR, e prováveis correlações entre os testes em amostras com lesões sugestivas de tuberculose encaminhadas pelo Serviço de Inspeção Federal dentre 2012 e 2013.....	45
<b>CAPÍTULO 2</b>		
Tabela 1	Interpretação do teste cervical comparativo (TCC) em bovinos de acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT).....	58



Tabela 2	Informações <i>a priori</i> para parâmetros de validação dos testes tuberculização cervical comparativa (TCC) e ELISA para detecção de anticorpos contra <i>Mycobacterium bovis</i> ®, e para prevalência da tuberculose.....	59
Tabela 3	Resultados dos testes diagnósticos tuberculização cervical comparativa (TCC) e ELISA para detecção de anticorpos contra <i>Mycobacterium bovis</i> ® aplicados nos rebanhos 1, e 2, considerando-se os animais inconclusivos no TCC como negativos ou como positivos.....	59
Tabela 4	Valores <i>a posteriori</i> dos parâmetros de desempenho, do índice <i>kappa</i> e da prova binomial / $X^2$ McNemar dos testes de tuberculização cervical comparativa e ELISA para detecção de anticorpos contra <i>Mycobacterium bovis</i> ® nos rebanhos 1 e 2.....	60
Tabela 5	Valores <i>a posteriori</i> dos parâmetros de desempenho, do índice <i>kappa</i> e da prova binomial dos testes de tuberculização cervical comparativa (TCC) e ELISA para detecção de anticorpos contra <i>Mycobacterium bovis</i> ® no rebanho 1.....	61
Tabela 6	Valores <i>a posteriori</i> dos parâmetros de desempenho, do índice <i>kappa</i> e $X^2$ McNemar dos testes de tuberculização cervical comparativa (TCC) e ELISA para detecção de anticorpos contra <i>Mycobacterium bovis</i> ® no rebanho 2.....	61
Tabela 7	Valores estimados da sensibilidade e especificidade dos testes TCC e ELISA em paralelo..	62
Tabela 8	Valores estimados da sensibilidade e especificidade dos testes TCC e ELISA em série....	62

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localização dos rebanhos 1 (município de Machado) e 2 (município de Leopoldina).....	57
----------	--	----

## RESUMO

A tuberculose bovina é uma enfermidade infecto-contagiosa, causada pelo *M. bovis*, com reconhecido impacto negativo na produção pecuária e risco para a saúde pública. É uma doença crônica, debilitante e normalmente assintomática por isso seu diagnóstico dependente de provas complementares. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) prevê as tuberculinizações como únicos testes para o diagnóstico *ante-mortem*, além do isolamento e da identificação do agente como diagnóstico *post-mortem*. Segundo o PNCEBT, outros testes diagnósticos poderão ser adotados pelo programa desde que devidamente avaliados. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação do desempenho de três testes diagnósticos *post-mortem* aplicados em amostras com lesões sugestivas de tuberculose oriundas do Serviço de Inspeção Federal (SIF), além da avaliação do teste ELISA IDEXX e da tuberculinização cervical comparativa (TCC) em dois rebanhos sabidamente tuberculosos, que apresentavam diferentes prevalências e se encontravam em diferentes fases de controle da enfermidade, utilizando-se modelos Bayesianos de classe latente. Segundo os resultados obtidos, todos os testes avaliados apresentaram boa especificidade. O isolamento apresentou maior sensibilidade que os demais testes avaliados para diagnóstico *post-mortem* da tuberculose bovina. O teste ELISA IDEXX foi o menos sensível mas foi capaz de identificar animais reagentes que os demais testes não o fizeram, e a PCR em tempo real (qPCR), apresentou sensibilidade intermediária entre aquelas duas provas. Não foi encontrada correlação entre nenhum dos testes. A sensibilidade do teste ELISA IDEXX foi maior no rebanho de menor prevalência, que já se encontrava em fase de controle da enfermidade, em comparação com aquele onde não havia sido realizada nenhuma tuberculinização prévia e apresentava maior prevalência da enfermidade. O desempenho da TCC não variou entre os rebanhos avaliados. De acordo com os resultados obtidos, recomenda-se a utilização em série dos testes *ante-mortem* avaliados nesse estudo.

**Palavas-chave:** Tuberculose bovina, sorologia, validação, *Mycobacterium bovis*

## ABSTRACT

Bovine tuberculosis is an infectious and contagious disease caused by *M. bovis*, with recognized negative impact on livestock production and risks to public health. It is a chronic, debilitating and usually asymptomatic disease so its diagnosis depends on complementary evidence. The National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT) recommends the tuberculinizations as the only tests for the disease's *ante-mortem* diagnosis, besides the isolation and identification of the agent as a *post-mortem* diagnosis. According to the PNCEBT, other diagnostic tests may be adopted by the program provided that they are duly evaluated. The objective of the present study was to evaluate the performance of three *post-mortem* diagnostic tests applied in samples with suggestive lesions of tuberculosis from the Federal Inspection Service (SIF), as well as the ELISA IDEXX test and comparative cervical tuberculinization (CBT), as *ante-mortem* diagnostic tests, in two tuberculous herds, which presented different prevalences and were in different stages of disease control, using latent-class Bayesian models. According to the results obtained, all the tests evaluated presented good specificity. Isolation was more sensitive than the other tests evaluated for post-mortem diagnosis of bovine tuberculosis. The ELISA IDEXX test was the least sensitive but was able to identify reagent animals that the other tests did not, and real-time PCR (qPCR) showed intermediate sensitivity between the two tests. No correlation was found between any of the tests. The sensitivity of the IDEXX ELISA test was higher in the lower prevalence herd, which was already in the control phase of the disease, in comparison with that herd where no prior tuberculinization had been performed and showed a higher prevalence of the disease. The performance of CBT did not vary among the evaluated herds. According to the results obtained, it is recommended to use the tests evaluated *ante-mortem* in series.

**Keywords:** Bovine Tuberculosis, serology, validation, *Mycobacterium bovis*

## 1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é uma importante atividade econômica e social em todos os estados brasileiros. O rebanho bovino nacional é o segundo maior do mundo e o país é o maior exportador de carne bovina do mundo desde 2004. Segundo estimativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a expectativa é que, até 2020, o Brasil deva suprir 44,5% do mercado mundial de carnes. Atualmente, os maiores importadores da carne brasileira são Hong Kong e Rússia (União Aduaneira da Eurásia). Novos mercados vêm sendo abertos a esse produto e, recentemente, importante acordo comercial firmado entre o Brasil e os Estados Unidos da América permitiu abertura desse mercado consumidor para as carnes *in natura* brasileiras. Ainda assim, o mercado interno é o principal destino da carne brasileira. Além disso, o país é o sexto maior produtor de leite do mundo, figurando entre os dez maiores desde 2011. A quase totalidade da produção de leite nacional ainda é consumida internamente e o Brasil se caracteriza por ser um importador de lácteos, e por comercializar volumes insignificantes desses produtos no mercado externo. No entanto, o país MAPA tem procurado abertura de novos mercados, e o MAPA é partícipe no processo que envolve toda a cadeia produtiva. Atualmente, produtos lácteos brasileiros têm sido exportados para a Rússia e China, que abriram seus mercados para queijos, manteiga e leite em pó brasileiros, sendo que já existem 26 plantas industriais habilitadas a exportar para aquele país. No entanto, ainda há limitações impostas por potenciais compradores relacionadas a garantias sanitárias desses produtos, inclusive com relação à tuberculose bovina.

Cabe ao MAPA promover e atestar a qualidade e a segurança dos alimentos de origem animal consumidos no mercado interno e externo. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) foi instituído em 2001 com o objetivo de reduzir a prevalência e a incidência de novos focos de brucelose e tuberculose no país e de criar um significativo número de propriedades livres dessas enfermidades que oferecessem produtos de origem animal de baixo risco, contribuindo para diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal e promover a competitividade da pecuária nacional.

A tuberculose bovina é uma grave zoonose, disseminada em todo o território nacional, com reconhecidos impactos na saúde pública, além de estar associada a perdas econômicas diretas e indiretas, decorrentes da redução da produção de carne e leite, e limitação na comercialização de animais e seus produtos. É uma enfermidade infecciosa, crônico-debilitante, frequentemente assintomática, causada pelo *Mycobacterium bovis*, que leva à formação de lesões nodulares, granulomas, em quaisquer órgãos ou tecidos, mas principalmente em linfonodos e nos pulmões, que se assemelham a tubérculos, o que dá origem ao nome da doença.

O controle da tuberculose bovina baseia-se na correta identificação de animais infectados e sua tempestiva eliminação, uma vez que não existem vacinas comerciais disponíveis e o tratamento é desaconselhado. O emprego de testes diagnósticos auxiliares e a vigilância em frigoríficos são medidas fundamentais no sentido de atingir os objetivos do PNCEBT.

Inúmeros testes têm sido propostos a fim de diagnosticar a tuberculose bovina, mas nenhum deles alia alta sensibilidade e alta especificidade diagnósticas, comprometendo a capacidade de se identificar corretamente animais saudáveis e enfermos, elevando custos de saneamento dos rebanhos e levando a questionamentos quanto à eficácia dos procedimentos de saneamento adotados.

O PNCEBT recomenda as tuberculinizações como provas diagnósticas para rebanhos e o diagnóstico anátomo-patológico, associado a outras técnicas como o isolamento e a identificação e a reação em cadeia da polimerase (PCR), para vigilância em frigoríficos. Entretanto, o programa reconhece que nenhum novo método avaliado apresentou desempenho que justificasse a

substituição dos testes tuberculínicos padrões. Por outro lado, o emprego de dois ou mais métodos poderia melhorar o diagnóstico da enfermidade e substanciar as ações do PNCEBT, desde que avaliados em condições de uso e objetivos definidos.

A identificação de lesões sugestivas de tuberculose em carcaças de animais abatidos e o rastreamento ao foco são medidas adotadas por países que já obtiveram sucesso no controle da doença. Entretanto, os custos relativos a estas atividades podem se tornar altos se um grande número de animais saudáveis for classificado como enfermos e, por outro lado, essas medidas podem ser ineficazes se houver um número significativo de falsos-negativos. O isolamento e a identificação do agente causal ou a demonstração de partes do seu DNA, pelas técnicas de PCR, em amostras clínicas com lesões sugestivas, bem como o uso de provas sorológicas são medidas que podem ser empregadas na vigilância ativa em frigoríficos.

Da mesma forma, o emprego de outros métodos diagnósticos poderia melhorar o diagnóstico da tuberculose em nível de rebanho, principalmente se tais métodos forem capazes de contribuir para aumentar a capacidade de identificar animais que normalmente não são detectados na tuberculinização e, além disso, evitar o sacrifício e eliminação de um grande número de animais sadios. Destacam-se nesse aspecto as provas indiretas de detecção de interferon gama e as provas sorológicas tais, como os ELISAs.

Dentro desse contexto, a confirmação de suspeitas de tuberculose em lesões sugestivas da enfermidade a partir de carcaças de animais abatidos em frigoríficos sob inspeção e o saneamento de rebanhos sabidamente tuberculosos são duas linhas de abordagem para as provas mencionadas que podem ser elencadas. No primeiro caso, ressalta-se não só a inegável importância para saúde pública, mas também o caráter econômico do diagnóstico, tomando-se como exemplo o acordo comercial bilateral firmado entre o Brasil e a União Aduaneira da Eurásia, onde os compradores exigem certificação sanitária da carne *in natura* brasileira para as enfermidades brucelose, tuberculose e leucose bovina enzoótica. No segundo caso, a importância é relacionada à indicação das estratégias de uso dos testes disponíveis para o diagnóstico da tuberculose em rebanhos sabidamente infectados visando o saneamento eficaz, a custos menores e com maior rapidez.

Para que estes objetivos sejam alcançados é necessário conhecer o desempenho dos testes diagnósticos, isto é, sua sensibilidade e sua especificidade, nas condições onde serão empregados. Neste trabalho avaliou-se o desempenho de testes diretos e indiretos para o diagnóstico da tuberculose bovina, aplicados às duas situações elencadas, para as quais o Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG) tem sido demandado, na qualidade de laboratório de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os objetivos específicos deste trabalho foram avaliar o desempenho de três testes *post-mortem* para o diagnóstico da tuberculose bovina: isolamento e identificação do agente, uma PCR em tempo real desenvolvida no LANAGRO-MG e um teste ELISA comercial (Mycobacterium Bovis Antibody Test Kit IDEXX®), todos empregados em amostras com lesões sugestivas da enfermidade, identificadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), utilizando modelo Bayesiano de classe latente (Capítulo 2). Também foi avaliado o desempenho diagnóstico do teste ELISA IDEXX para detecção de anticorpos contra Mycobacterium bovis em rebanhos leiteiros sabidamente tuberculosos, em diferentes fases de controle da enfermidade, frente à tuberculinização cervical comparativa (Capítulo 3).

## 2. CAPÍTULO 1 - LITERATURA CONSULTADA

A presente revisão visa levantar dados e informações, a partir da literatura consultada, considerados relevantes para o entendimento e compreensão do problema abordado, bem como embasar a metodologia analítica e a discussão dos resultados obtidos a partir da avaliação dos três testes diagnósticos aplicados *post-mortem* para a tuberculose bovina e dos dois testes aplicados *ante-mortem* para a enfermidade em condições encontradas no Brasil.

### 2.1. TUBERCULOSE BOVINA

A tuberculose bovina é uma zoonose de evolução crônica e debilitante causada pelo *Mycobacterium bovis* (BOVINE..., 2013). É uma enfermidade de distribuição mundial que oferece considerável risco à saúde pública e provoca reconhecido impacto econômico negativo na atividade pecuária (BOVINE..., 2013; ZISSTAG et al, 2006; LoBUE et al., 2006; SCHILLER et al., 2010).

A característica zoonótica da tuberculose bovina é amplamente reconhecida desde o início do século XX (PALMER & WATERS, 2011). Internacionalmente, a necessidade de controle obrigatório dessa enfermidade é devido ao seu potencial zoonótico (KIERK, 2006). O leite é considerado a principal fonte de contaminação para os seres humanos, apesar da transmissão via aerossóis e ferimentos serem possíveis (GRANGE & YATES, 1994). Como consequência, as principais formas de apresentação da enfermidade nos seres humanos são a escrófula, a tuberculose abdominal e outras manifestações extrapulmonares da doença (GRANGE & YATES, 1994). A adoção do tratamento térmico do leite e dos programas de controle sanitário em bovinos reduziu drasticamente a prevalência da tuberculose humana de origem bovina em alguns países, no entanto, a doença ainda é considerada grave problema de saúde pública na África e em algumas regiões da Ásia e da América Latina (de la RUA-DOMENECH, 2006; MICHEL et al., 2010; PALMER & WATERS, 2011; MÜLLER et al., 2013). A tuberculose zoonótica no Brasil parece ser de importância marginal (ROCHA et al., 2011; SOBRAL et al., 2011), apesar de alguns pesquisadores alertarem para o perigo da enfermidade (SILVA et al., 2013). Diferentemente de outras enfermidades negligenciadas, não foram encontrados na literatura consultada relatos de casos de infecção humana por *M. bovis* nos últimos 10 anos no Brasil, ao contrário do que ocorreu, por exemplo, com a brucelose (RAMOS et al., 2008; ANGEL et al., 2013).

Do ponto de vista financeiro, estima-se que animais infectados percam 10% a 25% da sua eficiência produtiva (BRASIL, 2006). As principais perdas estão relacionadas à redução da produção de leite e carne (LoBUE, 2006; BOLAND et al, 2010). Além disso, há restrições quanto à comercialização de animais e de produtos de origem animal oriundos de regiões ou rebanhos onde a tuberculose bovina é prevalente (de la RUA-DOMENECH, 2006; BRASIL, 2006; BRASIL, 2012). No curto prazo, entretanto, são relatadas perdas marginais na produção de leite e na eficiência reprodutiva de rebanhos leiteiros infectados, o que pode contribuir para que o produtor relute em combater a enfermidade (MELLADO et al., 2015).

Considerando os aspectos relacionados à saúde pública e à economia, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) foi instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento com o objetivo de reduzir a prevalência e a incidência de novos focos de brucelose e tuberculose no país e de criar um significativo número de propriedades livres dessas enfermidades, de modo que pudessem oferecer produtos de origem animal de baixo risco, contribuindo para diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal e promover a competitividade da pecuária nacional (BRASIL, 2006).

Segundo o PNCEBT, o controle da tuberculose bovina se baseia na identificação de animais infectados e sua tempestiva eliminação do rebanho, além da restrição da movimentação de animais e vigilância passiva em frigoríficos (BRASIL, 2006), procedimentos adotados por países que obtiveram sucesso no controle da enfermidade (KOLLER-JONES et al., 2006; WEISS, 2006; PALMER & WATERS, 2011).

## 2.2. TESTES DIAGNÓSTICOS

### 2.2.1. Diagnóstico *post-mortem*

A vigilância em frigoríficos consiste na identificação de lesões sugestivas de tuberculose em carcaças de bovinos abatidos e o rastreamento aos rebanhos de origem. É uma prática adotada principalmente nas fases finais de erradicação da enfermidade devido ao melhor custo-benefício deste tipo de ação em relação à vigilância ativa por meio de teste e sacrifício de animais (KOLLER-JONES et al., 2006). A inspeção sanitária, é capaz de detectar aproximadamente 47% das lesões tuberculosas se comparada à necropsia (CORNER, 1994). De qualquer forma, as lesões sugestivas da doença devem ser confirmadas por histopatologia, biologia molecular ou por isolamento e identificação do agente com o principal objetivo de evitar reações falso-positivas e falso-negativas que implicam ações de controle desnecessárias em rebanhos saudáveis e, por outro lado, na manutenção de rebanhos infectados que não detectados (TAMMEMAGI et al., 1973; MEDEIROS et al., 2010; CORNER et al., 2012; COURCOUL et al., 2014; HUMPHREY et al., 2014).

A histopatologia é um diagnóstico presuntivo, realizado normalmente a partir de lesões sugestivas de tuberculose encontradas em necropsias ou na inspeção sanitária (BOVINE..., 2013, COURCOUL et al., 2014). O método baseia-se na visualização de lesões microscópicas, obtidas normalmente a partir de fragmentos de lesões sugestivas de tuberculose fixados pelo formol, coradas por hematoxilina e eosina, e caracterizadas por necrose de caseificação central, com ou sem mineralização, circundada por células gigantes de Langhans, células epitelióides, macrófagos, linfócitos. Em alguns casos, também podem estar presentes neutrófilos e tecido conjuntivo (CASUWELL & WILLIAMS, 2007; VARELLO et al., 2008; MENDES et al., 2013). O diagnóstico histopatológico tem boa sensibilidade, além de ser mais barato, mais rápido, mais seguro e mais simples de ser executado que o isolamento bacteriano e as reações em cadeia da polimerase (PCRs) (VARELLO et al., 2008; MENDES et al., 2013; COURCOUL et al., 2014). Entretanto, as lesões granulomatosas não são patognomônicas de tuberculose, o que reduz a especificidade do teste, e suscita a utilização de outros métodos histológicos para confirmação do diagnóstico presuntivo (WATRELOT-VIRIEUX et al., 2006; VARELLO et al., 2008; COURCOUL et al., 2014). Colorações especiais, técnicas histoquímicas ou imunohistoquímicas como Ziehl-Neelsen, rodamina/auramina são utilizadas com esse objetivo (WATRELOT-VIRIEUX et al., 2006). Devido ao fato de as lesões granulomatosas causadas pelo *M. bovis* serem paucibacilares (BOVINE..., 2013; TAYLOR et al., 2007), os métodos que buscam a demonstração do agente causal em cortes histológicos carecem de sensibilidade, apesar da sua alta especificidade (WATRELOT-VIRIEUX et al., 2006; VARELLO et al., 2008).

Técnicas moleculares são aplicadas como ferramentas de epidemiologia molecular, para identificação e genotipagem de isolados bacterianos (ZANINI et al., 2001; HARRIS, 2006; SALES et al., 2014a, SALES et al., 2014b; RAMOS et al., 2014) e para diagnóstico *post mortem* da tuberculose bovina a partir de tecidos com e sem lesões visíveis (SHILLER et al., 2010; COURCOUL et al., 2014). As reações em cadeia da polimerase (PCR) são as técnicas moleculares mais utilizadas no diagnóstico *post mortem* da tuberculose bovina (SCHILLER et al., 2010; COURCOUL et al., 2014). O seu uso tornou-se mais frequente a partir da metade da década de 1990 (LIÉBANA et al., 1995; WARDS et al., 1995; COURCOUL et al., 2014; CARVALHO et

al., 2015). As principais vantagens do diagnóstico molecular são a rapidez na obtenção de resultados, a detecção de material genético do *M. bovis* em amostras contaminadas e amostras autolisadas, de onde não seria possível recuperar o microrganismo, a possibilidade de automação, o menor risco biológico e o menor custo (SCHILLER et al., 2010; BERMUDEZ et al., 2010; BOVINE..., 2013; ISSA et al., 2016).

Uma variada gama de técnicas de PCR é descrita para essa finalidade, as quais baseiam-se na obtenção e separação de material genético do *M. bovis* a partir das amostras de tecidos, amplificação de sequências específicas do genoma microbiano e revelação das provas (SCHILLER et al., 2010; BOVINE..., 2013). No entanto, a comparação de resultados obtidos entre os diferentes estudos é bastante complexa, devido às diferentes técnicas de PCR empregadas pelos autores, as modificações pontuais em técnicas semelhantes, o material biológico utilizado no estudo, os critérios de avaliação de resultados e o uso de padrões de referência ou padrão-ouro, dentre outros (WARDS et al., 1995; LIÉBANA et al., 1995; RORING et al., 2000; TAYLOR et al., 2007; PARRA et al., 2008; BERMUDEZ et al., 2010; COURCOUL et al., 2014; ARAÚJO et al., 2014b; COSTA et al., 2013). A definição de padrões para avaliação dos testes é um fator que varia muito entre os autores, o que torna a comparação entre resultados de diferentes trabalhos muito difícil. (TAYLOR et al., 2007; COURCOUL et al., 2014).

A extração do material genético microbiano é o fator crítico mais relevante no que diz respeito à sensibilidade das PCRs, notadamente em amostras com lesões visíveis (WARDS et al., 1995; TAYLOR et al., 2007; COSTA et al., 2013), sendo que alguns kits e protocolos de extração, como a lise mecânica dos tecidos, são mais adequados que outros (COSTA et al., 2013; MOURA et al., 2016). Ao que tudo indica, as *nested* PCRs são mais sensíveis que as PCRs em tempo real e as tradicionais, apesar do maior risco de contaminação cruzada, especialmente quando há necessidade de processamento de muitas amostras (LIEBANA et al., 1995; TAYLOR et al., 2001; TAYLOR et al., 2007; ARAÚJO et al., 2014a; ARAÚJO et al., 2014b). Além disso, a sensibilidade da prova é maior em amostras com lesões sugestivas de tuberculose do que em amostras sem lesão (PARRA et al., 2008).

É consenso entre os autores que as PCRs são bastante específicas, com valores muito próximos a 100% para este parâmetro. A sensibilidade diagnóstica da PCR, por outro lado varia entre 65% e 75%, podendo chegar a valores mais elevados em alguns casos, sendo que alguns trabalhos nem se quer informam claramente valores para este parâmetro testes (LIÉBANA et al., 1995; WARDS et al., 1995; TAYLOR et al., 2001; TAYLOR et al., 2007; ARAÚJO et al., 2014a; CORCOUL et al., 2014; CARVALHO et al., 2015). Algumas PCRs são capazes de detectar como positivas amostras não detectadas no diagnóstico bacteriológico (LIÉBANA et al., 2010; ARAÚJO et al., 2014a, ARAÚJO et al., 2014b).

O isolamento do agente etiológico é considerado o padrão-ouro e o diagnóstico definitivo da tuberculose bovina (BOVINE..., 2013; ARAÚJO et al., 2014a; ISSA et al., 2016). A técnica é baseada na recuperação de células viáveis de *M. bovis* a partir de tecidos ou secreções e na sua identificação a partir de provas bioquímicas ou de biologia molecular (CORNER et al., 2012; BOVINE..., 2013; SALES et al., 2014b). O isolamento apresenta especificidade de 100% uma vez que o microrganismo isolado é identificado, permitindo definir com certeza se se trata de *M. bovis* ou não (SCHILLER et al., 2010; COURCOUL et al., 2014). Algumas desvantagens que limitam seu emprego são o alto custo, o risco biológico e, principalmente, a demora na obtenção de resultados (MENDES et al., 2013; BOVINE..., 2013; ARAÚJO et al., 2014a). A sensibilidade clínica da técnica não é relatada normalmente por ser um método primário que serve de referência para avaliação de desempenho de outras técnicas diagnósticas (VARELLO et al., 2008; CORNER



et al., 2012; ARAÚJO et al., 2014a; ARAÚJO et al., 2014b; COURCOUL et al., 2014). Ao invés disso, normalmente é relatada a taxa de recuperação de microrganismos (HINES et al., 2006; SCHILLER et al., 2010; CORNER et al., 2012; ROBBE-AUSTERMAN et al., 2013).

Comparando-se as taxas de recuperação de *M. bovis*, há grande variabilidade entre técnicas e autores, destacando-se como extremos valores da ordem de 95% (ISSA et al., 2016) a 12% (PINTO et al., 2002). Outros autores obtiveram 47,5% (IKUTA et al., 2016), 40% (AMBRÓSIO et al., 2008), 51,8% (MEDEIROS et al., 2012), 62% (ARAÚJO et al., 2014a), 61,8% (ARAÚJO et al., 2014b), 14% (ALZAMORA FILHO et al., 2014).

O isolamento primário de *M. bovis* a partir de amostras clínicas é particularmente dependente dos meios de cultura utilizados, dos processos de descontaminação das amostras, e das condições de incubação (CORNER, 1994).

A descontaminação é uma etapa fundamental no processo de isolamento bacteriano (CORNER et al., 1995; MEDEIROS et al., 2010; ISSA et al., 2016). Ela visa a eliminação de possíveis contaminantes, de crescimento rápido, que poderiam suplantam o crescimento da micobactéria nos meios de cultura normalmente utilizados para o isolamento primário, já que o *M. bovis* é uma bactéria fastidiosa de crescimento lento, que demanda meios de cultura ricos em nutrientes para se desenvolver (CORNER & TRAJSTMAN, 1988; CORNER et al., 1995; MEDEIROS et al., 2010). Por outro lado, os descontaminantes não devem ser tóxicos ou, quando muito, devem apresentar toxidez mínima para o *M. bovis* (CORNER et al., 1995; CORNER et al., 2012).

Os agentes descontaminantes mais usados são detergentes, como o hexadecilpiridínio 0,375% a 0,75%, álcalis, como o hidróxido de sódio 2% a 4%, e ácidos, como o ácido sulfúrico 4% a 6% ou ácido oxálico a 5% (BOVINE..., 2013; COURCOUL et al., 2014; ISSA et al., 2016). A definição de qual descontaminante é o mais indicado é particularmente difícil devido à falta de padronização de metodologias utilizadas na avaliação desses produtos (CORNER & TRAJSTMAN, 1988; CORNER et al., 1995; HOLANDA et al., 2002; AMBRÓSIO et al., 2008; ISSA et al., 2016). Ademais, o grau de contaminação e os contaminantes encontrados em amostras clínicas encaminhadas rotineiramente ao diagnóstico bacteriológico variam consideravelmente de acordo com a localização anatômica do espécime, com a sua origem geográfica, e com a forma como foram coletadas e estocadas as amostras (CORNER et al., 1995). Deve-se considerar também o uso de mais de um meio de descontaminação de amostras (MEDEIROS et al., 2012).

Os meios de cultura utilizados no isolamento primário de *M. bovis* são à base de ovos - Colestos e Stonebrink, à base de ágar - 7H10 e 7H11, ou meios à base de sangue, como o B83, além de meios líquidos utilizados em sistemas automatizados de isolamento primário, como BACTEC 460 e BACTEC MGIT 960 (CORNER & NICOLACOPOULOS, 1988; BOVINE..., 2013; HINES et al., 2006). Meios à base de ágar e meios líquidos permitem o isolamento primário de *M. bovis* mais rapidamente que meios à base de ovos, no entanto, aqueles podem ser mais susceptíveis à contaminação (HINES et al., 2006; CORNER et al., 2012; ISSA et al., 2016). Por isso, é recomendável que se utilize dois ou mais tipos de meios para o isolamento primário, a fim de obter isolamentos mais rapidamente e aumentar a sensibilidade ou a taxa de isolamento do método (CORNER, 1994; CORNER et al., 2012).

Deve-se ressaltar que o tipo de descontaminante e os meios de cultura usados no isolamento primário devem ser avaliados sob condições rotineiras de submissão e processamento de espécimes veterinários nos laboratórios de referência (CORNER & NICOLACOPOULOS, 1988; CORNER et al., 1995; ROBBE-AUSTERMAN et al., 2013; ISSA et al., 2016). Nesse aspecto, para as condições Brasileiras, são recomendados descontaminação com NaOH a 2% ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a

5%-6% e uso de meios sólidos à base de ovos, suplementados com piruvato, Stotnebrink, e meios à base de ágar, suplementados com ácido oleico, albumina, dextrose e catalase, 7H11 com OADC (ISSA et al., 2016).

### 2.2.2. Diagnóstico *Ante-Mortem*

A tuberculização, juntamente com o diagnóstico clínico, a patologia e o isolamento, constituem os mais antigos testes diagnósticos da tuberculose, tendo sido utilizados há mais de cem anos (MONAGHAN et al., 1994; PALMER & WATERS, 2011). Inicialmente, a tuberculização foi utilizada, equivocadamente, por Robert Koch como terapia e prevenção à tuberculose humana, mas seu emprego como método diagnóstico foi feito por veterinários russos, ingleses e dinamarqueses no final do século XIX e início do século XX (GOOD & DUIGNAN, 2011; PALMER & WATTERS, 2011). Apesar de antiga, a tuberculização, não é um método desatualizado e é a prova diagnóstica indireta da tuberculose recomendada pela OIE (BOVINE..., 2013) e a base de vários programas sanitários de combate à tuberculose bovina (SCHILLER et al., 2010).

O diagnóstico é baseado na inoculação intradérmica de quantidades determinadas de tuberculoproteínas com conhecida atividade biológica e na observação ou quantificação da reação de hipersensibilidade tipo IV, aproximadamente três dias após a inoculação (BRASIL, 2006; OIE, 201a). Os antígenos utilizados nos testes são produzidos e padronizados internacionalmente do modo a garantir a adequada capacidade diagnóstica do método (BOVINE..., 2013). São proteínas, em sua maioria de baixo peso molecular, solúveis em água, secretadas por amostras AN5 de *M. bovis* e D4 de *M. avium* em meio de cultura líquido sintético (MONAGHAN et al., 1994). Um concentrado proteico é obtido após precipitação com ácido tricloroacético e padronizado de acordo com atividade biológica determinada por ensaio biológico em cobaios (*Cavea porcelus*) ou na espécie alvo, ao qual se nomeia derivado proteico purificado – PPD bovina e PPD aviária (GOOD & DUIGNAN, 2011). São recomendados pelo menos 2000 Unidades Internacionais por dose de PPD bovina e aviária (BOVINE..., 2013).

Atualmente, a tuberculização pode ser realizada de três formas diferentes: na prega caudal; tuberculização cervical simples (TCS); ou tuberculização cervical comparativa (TCC) (BRASIL, 2006). Todas são provas *in vivo*, que necessitam de pelo menos duas visitas à propriedade, uso de equipamentos específicos e treinamento do veterinário com vistas a sua habilitação para a realização e interpretação de seus resultados (BRASIL, 2006). No Brasil, a padronização dos testes foi realizada inicialmente por Langenegger et al (1976) e Langenegger et al., (1981). Com o advento do PNCEBT, os critérios de execução das provas e interpretação de resultados foram atualizados, permitindo maior padronização e aumento da especificidade das tuberculizações cervicais na medida em que o ponto-de-corte passou de 3mm para 4mm (BRASIL, 2006). Recentemente, esses critérios foram ratificados pelo próprio PNCEBT (BRASIL, 2016).

O desempenho diagnóstico da tuberculização varia conforme o local de inoculação, diferenças nas doses de tuberculinas, a preparação das PPDs, e os critérios de interpretação de resultados (SCHILLER et al., 2010; ALVAREZ et al., 2012). Reações falso-positivas podem ocorrer em decorrência de infecção e sensibilização dos animais por *M. tuberculosis* e micobactérias ambientais não tuberculosas, por *M. avium* subsp. *Paratuberculosis*, além de outras micobacteriáceas como *Nocardia* spp. Reações falso-negativas podem decorrer da fase pré-alérgica da enfermidade (três a seis semanas pós-infecção), anergia, imunodepressão causada por viroses concomitantes, uso de drogas ou período de transição, baixa potência da tuberculina bovina ou elevada potência da tuberculina aviária, erros de inoculação, localização de lesões

somente na glândula mamária etc. (FRANCIS et al., 1978; de la RUA-DOMENECH, 2006; HOULLIHAN et al., 2008).

Os valores reportados para a sensibilidade e a especificidade dos testes variam bastante. Nos Estados Unidos são citados valores médios de 85,9% de sensibilidade (80,4% – 93%) e 92,8% (89,2% - 96,2%) para especificidade do teste da prega caudal. Para o teste cervical comparativo, utilizado em série com o teste cervical simples, os valores encontrados foram 79,5%, variando entre 74,4% e 88,4%, para sensibilidade e 97,9%, variando entre 97,3% e 98,6% para especificidade (FARNHAM et al., 2012). Na Espanha, a sensibilidade do teste cervical simples foi de aproximadamente 55%, para um ponto-de-corte de 4,0mm e a especificidade foi maior que 99% (ALVAREZ et al., 2012). Na Inglaterra, a sensibilidade do teste cervical comparativo foi estimada em 81%, variando entre 70% e 89% (KAROLEMEAS et al., 2012) e a especificidade em 99,98%, variando entre 99,976% e 99,984% (GOODCHILD et al., 2015). A realização a campo de tais avaliações é bastante complexa, com metodologias de análise muito variáveis e dependentes de comparação de o com padrão-ouro, o que implica o abate e o exame post-mortem detalhado de todo o rebanho testado para confirmar o real estado de infecção dos animais ou utilizar análise de classe latente (MONAGHAN et al., 1994; FARNHAM et al., 2012; ALVAREZ et al., 2012). Dados brasileiros indicam sensibilidade igual a 79,4%, variando entre 60,9% e 93,8%, e especificidade de 97,7%, variando entre 95,5% e 98,9% (LOPES et al., 2012).

O uso de peptídeos sintéticos é uma alternativa à PPD bovina para aumentar a especificidade das tuberculinizações simples (MONAGHAN et al., 1994; XIN et al., 2013; MELO et al., 2015). Os mais utilizados são ESAT 6 e CFP10, ambos derivados da RD1 do *M. bovis*, além de outros que podem ser incorporados para formar um coquetel diagnóstico (XIN et al., 2013; MON et al., 2014; MELO et al., 2015). Comparando-se desempenho de tais produtos ao da PPD bovina e do teste cervical comparativo, não é possível verificar ganho significativo para o diagnóstico da tuberculose bovina. Além do mais, ao utilizar tais peptídeos ou uma mistura deles na tuberculinização há necessidade de padronização do teste, e, principalmente, da definição de novos pontos-de-corte, para cada tipo de antígeno utilizado (XIN et al., 2013; MON et al., 2014).

A partir da década de 1980 alguns testes baseados no ensaio imunoenzimático adsorvente (ELISA) foram desenvolvidos para o diagnóstico da tuberculose bovina, utilizando-se como antígeno a própria PPD ou células de *M. bovis* sonicadas. Os resultados obtidos apresentaram baixa sensibilidade e especificidade. Entretanto, ficou evidente a capacidade desse teste, baseado na resposta imunológica humoral, de detectar animais que a tuberculinização não detectava (AUER & SCHLEEHAUF, 1988; PLACKETT et al., 1989). Tal condição é explicada pela patogenia da tuberculose, onde há predomínio da resposta imune celular e uma baixa produção de anticorpos no início da enfermidade. Com a evolução da doença, há uma predominância da resposta imune humoral em detrimento da celular, chegando ao ponto de alguns animais não detectados na tuberculinização, anérgicos, o serem nos testes sorológicos (PLACKETT et al., 1989; NEILL et al., 1994; POLLOCK & NEILL, 2002; WELSH et al., 2005).

A purificação e a caracterização dos principais antígenos envolvidos na resposta humoral permitiram aumentar a especificidade da prova, com conseqüente comprometimento da sensibilidade (FIFIS et al., 1991; WOOD et al., 1992). Já foi demonstrada a capacidade de resposta de animais infectados experimentalmente e naturalmente a vários antígenos do complexo *M. tuberculosis*, com respostas bastante variadas (AMADORI et al., 2002). Dentre eles, a proteína MPB70 é bastante específica para o *M. bovis*, sendo produzida em pequena quantidade pelo *M. tuberculosis* (WIKER, 2009). Por este motivo, é o principal antígeno utilizado em provas sorológicas para o diagnóstico da tuberculose (HARBOE et al., 1990; SURUJBALLI et al., 2002;

JOLLEY et al., 2007). Além dela, o uso de outros antígenos, como a MPB83, ESAT 6, CFP10, PE 35, Rv1572c, PE5, PE13 e proteínas quimeras, se faz necessário para aumentar a sensibilidade do diagnóstico da tuberculose, (WHELAN et al., 2008; FARIAS et al., 2012; SOUZA et al., 2012).

Dentre os testes sorológicos para o diagnóstico da tuberculose bovina, os ELISAs parecem ter sido os mais adequados (BOVINE..., 2013). Dentre eles destacam-se ELISA multiplex baseado em quimioluminescência como sistema revelador (WHELAN et al., 2008), com proteínas recombinantes e quimeras (FARIAS et al., 2012; SOUZA et al., 2012; VIDAL, 2013) e com mistura de antígenos sintéticos (WATERS et al., 2011). As estimativas dos parâmetros de desempenho dos testes são, entretanto, bastante variáveis. O ELISA multiplex, baseado na quimioluminescência, apresentou sensibilidade dependente do ponto-de-corte adotado, sendo maior quanto a reação em somente um dos cinco antígenos utilizados no teste foi suficiente para declarar o animal positivo, e menor quando a reação nos cinco antígenos era necessária para considerar o animal positivo. O contrário ocorre com a especificidade (WHELAN et al., 2010; CLEGG et al., 2011). Os valores estimados para a sensibilidade foram da ordem de 77,1% a 86,5% (WHELAN et al., 2010) e de 37,1% a 68,4% (CLEGG et al., 2011). A especificidade variou de 77,6 a 100% (WHELAN et al., 2010). O ELISA tradicional apresentou especificidade próxima de 98%, entretanto, a sensibilidade parece ser dependente da região geográfica onde o teste é empregado e da presença ou não de lesão nas amostras estudadas (WATERS et al., 2011; TROST et al., 2016). Para esse parâmetro os valores encontrados variaram de 30% a 90% (WATTERS et al., 2011). Em um estudo realizado no Brasil os valores encontrados para sensibilidade e especificidade foram 9,32% e 86,38%, respectivamente, para um ELISA comercial (VIDAL, 2013). O ELISA utilizando proteína quimera formada por fragmentos hidrofóbicos derivados dos antígenos MPB-70, MPB-83 e ESAT-6 apresentou sensibilidade de 28,81% e especificidade de 82,59%, respectivamente (VIDAL, 2013).

Vale ressaltar que o desempenho diagnóstico dos testes sorológicos é susceptível à resposta anamnésica induzida por tuberculinizações prévias em animais infectados com pico aos quinze dias após as inoculações e predominância de IgG<sub>1</sub> (LIGHTBODY et al., 2000; LYASHCHENKO et al., 2004; CASAL et al., 2014). Em tais situações observa-se aumento considerável da sensibilidade do teste, podendo chegar até a 9,5 vezes mais que no dia da inoculação ou no dia da leitura da prova, com um aumento mínimo de aproximadamente 2,7 vezes (CASAL et al., 2014).

Outro aspecto relevante a respeito dos testes sorológicos é a constatação de que eles, especialmente o ELISA, são capazes de detectar animais que as tuberculinizações não detectam, o que foi evidenciado pelos achados de necropsia, isolamento e identificação do agente em animais identificados como positivos na sorologia e negativos na tuberculinização, e pelos baixos índices de concordância com esse teste, da ordem de -2,16% a 55% (REIS, 2004; NGANDLOLO et al., 2009; WHELAN et al., 2011; BOVINE..., 2013; VIDAL, 2013; HIRPA et al., 2014). Assim, fica evidente o potencial dos testes sorológicos, mesmo aqueles de baixa sensibilidade, no controle da tuberculose bovina em complemento à tuberculinização (SCHILLER et al., 2010; BOVINE..., 2013; HIRPA et al., 2014).

### 2.3. METODOLOGIAS APLICADAS À AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS

Os testes diagnósticos são importantes ferramentas, quando utilizados com objetivos específicos, e as informações obtidas a partir dos seus resultados devem permitir tomada de decisões que implicam a definição do estado de saúde de indivíduos e populações, adoção de medidas sanitárias para controlar enfermidades, avaliação de custos e financiamento de programas sanitários,

abertura ou fechamento de mercados etc. (TYLER et al., 1989, MACDIARMID, 1991, PRINCIPLES..., 2013).

Dada a importância de tais ações, o emprego das melhores e mais indicadas metodologias diagnósticas é de fundamental relevância. Para tanto, o conhecimento do desempenho e das limitações dos testes e a obtenção de resultados confiáveis, é fundamental para permitir tomadas de decisões mais acertadas, mesmo dentro do contexto de imperfeição que é inerente a praticamente todos eles. Tais objetivos só poderiam ser atingidos com o emprego de testes validados.

A validação de testes diagnósticos é um processo contínuo de obtenção e análise de dados relacionados ao estabelecimento de parâmetros de desempenho dos mesmos, levando-se em consideração os objetivos para os quais se propõem (CROWTHER, 2000; BANOÓ et al., 2010; PRINCIPLES..., 2013). Trata-se de um processo complexo, que envolve várias etapas a serem cumpridas, que ainda carecem de harmonização internacional (DINIZ, 2013). De qualquer forma, o uso dos testes diagnósticos deve ser definido a partir da comparação objetiva de parâmetros quantitativos, estatisticamente avaliados, que permitam ao usuário definir sua aplicabilidade (GERTSMAN & CAPPUCCI, 1986; JACBSON, 1988; CROWTHER, 2000).

Uma variedade de métodos estatísticos está disponível para avaliação de testes diagnósticos e a seleção de um método particular deve ser guiada pela natureza dos dados e pelas questões a serem respondidas, além da disponibilidade de equipe qualificada, material biológico, equipamentos e recursos financeiros (MARTIN, 1977).

Dentre as figuras de validação de métodos, destacam-se o índice Kappa, sensibilidade e especificidade, valores preditivos, razões de verossimilhança, probabilidade pós-teste, área sob a curva ROC (Receiver-Operator Characteristic Curve), índice de Youden, relação de chances (*odds ratio*) e risco relativo (GARDNER et al., 2000; DEEKS, 2001; GLAS et al., 2003; GARDNER & GREINER, 2006; PEREIRA, 2011, OKEH & OGBONNA, 2013). Outros, não menos importantes, mais relacionados à garantia da qualidade dos resultados analíticos e desempenho de laboratórios são a repetibilidade e a reprodutibilidade (WIGERS, 2003; PRINCIPLES..., 2013).

Diniz (2013) ainda relata que alguns autores brasileiros utilizam análise de variância, teste *t* de Student e coeficiente de correlação, menos comuns de serem encontrados na literatura especializada.

### 2.3.1 Índice Kappa e qui-quadrado de McNemar

O Kappa é um índice aplicado a dados binários correlacionados que indica o nível de concordância de resultados encontrados acima do que seria esperado devido ao acaso somente (MCGINN et al., 2004). É um índice bastante versátil podendo ser utilizado para comparar resultados entre diferentes analistas, testes diagnósticos e laboratórios (MARTIN, 1977; MCGINN et al., 2004; MASSART et al., 2009). Os cálculos envolvendo o índice Kappa são bastante simples e derivam, normalmente, de tabelas de contingência 2x2, de onde são obtidas as frequências observadas das concordâncias de resultados e as frequências esperadas, a partir das marginais.

As principais vantagens do Kappa são a facilidade de cálculos, a versatilidade de aplicações e a possibilidade de avaliar testes diagnósticos sem a necessidade de comparação com padrões (SIEGEL, 1975; MARTIN, 1977; MASSART et al., 2009). Quanto a sua interpretação, alguns autores consideram-no um índice de concordância entre testes (PAULIN et al., 2002; PINTO et al., 2005, SALES et al., 2014), outros advertem que o kappa é somente um índice da relação entre

a frequência de concordância de resultados observados em relação à frequência de concordâncias esperadas devido ao acaso (SIEGEL, 1975; MCGINN et al., 2004). Isso limitaria a abrangência e a generalização feitas a partir do índice, dificultando a comparação entre diferentes publicações.

MCGINN et al. (2004) informaram uma tabela de classificação qualitativa do Kappa de acordo com categorias pré-estabelecidas, variando de zero – nenhuma concordância além do acaso, a 1,0 – concordância perfeita. Valores negativos para este parâmetro também podem ser encontrados, o que significa discordância entre testes (MCHUGH, 2012).

Normalmente, associa-se a estatística do Kappa ao cálculo do qui-quadrado de McNemar com objetivo de se avaliar a independência entre resultados revelados pelas provas em comparação (MATHIAS et al., 1995; PAULIN et al., 2002). Nesse caso, o valor de qui-quadrado calculado deve ser menor que o de qui-quadrado tabelado para o grau de significância estabelecida e um grau-de-liberdade, para que a condição de dependência de resultados possa ser inferida (PINTO et al., 2005; MATHIAS et al., 2010).

### 2.3.2 Sensibilidade e Especificidade

Os termos sensibilidade e especificidade foram utilizados pela primeira vez em 1917. Na validação de métodos diagnósticos, pode-se distinguir o uso desses termos em duas etapas, nas quais assumem conotações diferentes.

Na primeira etapa de validação de um método, os termos sensibilidade e especificidade, características de desempenho analítico do teste, referem-se, respectivamente, ao limite de detecção do método e à capacidade de o método distinguir o analito que se deseja detectar de outros semelhantes, presentes nas matrizes estudadas (PRINCIPLES..., 2013).

Do ponto-de-vista clínico, essas características referem-se à capacidade de o teste detectar corretamente os indivíduos infectados ou doentes (sensibilidade) e à capacidade de o teste detectar corretamente os indivíduos saudáveis (especificidade) (PRINCIPLES..., 2013). Essas características intrínsecas dos testes diagnósticos é que permitem comparações objetivas entre eles e contribuem de maneira decisiva para a melhor indicação de uso, dados os objetivos a que se destinam.

Dispondo-se de padrão-ouro, esses parâmetros de desempenho são facilmente obtidos a partir de comparação direta de resultados entre testes, pelo emprego de operações matemáticas simples, a partir de tabelas de contigência 2x2 (NOORDHUIZEN et al., 2001).

As dificuldades de se obter um padrão-ouro para, virtualmente, quase todas as enfermidades dificultam estimar os parâmetros por comparação direta, dados os erros diagnósticos inerentes aos testes tidos como padrões e as dificuldades e restrições em aplicá-los (MARTIN, 1977; JOSEPH et al., 1995; BRASCUM et al., 2005; PEREIRA, 2011).

Alternativas a estes impedimentos são a utilização de amostras submetidas a testes múltiplos para definição do verdadeiro estado sanitário do indivíduo, utilização de critérios epidemiológicos e clínicos em conjunto com os testes tidos como padrões, uso de padrões de referência ao invés de padrões-ouro e uso de modelos bayesianos de classe-latente (ENØE et al., 2000; RUTJES et al., 2007; REITSMA et al., 2009; MATHIAS et al., 2010).

Dentre esses, os mais comumente utilizados são a construção de padrões a partir da combinação de testes diagnósticos e o uso de padrões de referência imperfeitos, dada a maior facilidade e simplicidade de aplicação dessas alternativas.

No primeiro caso, são aplicados dois ou mais testes em uma mesma amostra e só são considerados padrões para comparação com o teste sob avaliação aquelas que apresentarem resultados positivos ou negativos em todas elas (RUTJES et al., 2007).

Essa alternativa seria válida somente quando já houvesse dois ou mais testes para a enfermidade em questão e que pudessem ser aplicados a todas as amostras a serem submetidas ao teste em avaliação. Ressalta-se que o uso de testes correlacionados poderia imprimir viés ao estudo visto que o número de amostras com resultados discrepantes nos testes seria menor que o teoricamente esperado (GARDNER et al., 2000).

No segundo caso, o uso de padrões imperfeitos implica a estimação de valores dos parâmetros relativos ao padrão empregado (TYLER et al., 1989). Segundo esses autores, o emprego de amostras fortemente positivas ou fortemente negativas como padrões pode superestimar os valores da sensibilidade e da especificidade do teste sob avaliação.

O emprego de modelos bayesianos de classe latente é uma alternativa que pode contornar os problemas citados (ENØE et al., 2000). Os parâmetros de validação são obtidos após um número elevado de iterações onde são conjugadas informações *a priori* a respeito das estimativas dos parâmetros de desempenho dos testes diagnósticos e as informações fornecidas pelos dados (verossimilhança), utilizando-se simulação de Monte Carlo em Cadeias de Markov - MCMC (NITZOUFRAS, 2009). Esses modelos têm as vantagens adicionais de permitir comparação direta entre resultados de diferentes trabalhos, a versatilidade da formulação, e o fato de que resultados de trabalhos anteriores podem ser utilizados como informações *a priori* para trabalhos posteriores, permitindo atualização constante das estimativas dos parâmetros, e a disponibilidade de programas gratuitos para processar os modelos (NITZOUFRAS, 2009; DINIZ, 2010; LOPES et al., 2012; SOUZA, 2013). Como desvantagens, podem-se citar a necessidade de construção de modelos probabilísticos, a necessidade de atender às condições para identificabilidade dos modelos, as dificuldades de obtenção de informações *a priori*, e o cálculo da amostragem (DENDUKURI & JOSEPH, 2001).

Devido às imperfeições dos testes diagnósticos, existem taxas de erros intrínsecas inerentes ao ponto-de-corte utilizado, que fazem com que a sensibilidade e a especificidade sejam inversamente relacionadas. Como consequência, o aumento ou a redução do valor do ponto de corte implica, necessariamente, alterações semelhantes na sensibilidade e na especificidade para testes cujos resultados são expressos em escala contínua (MARTIN, 1977; TYLER et al., 1989).

### 2.3.3 Curva ROC (Receiver Operating Characteristic Curve)

A curva ROC é uma representação gráfica dos valores de sensibilidade e de falsos-positivos (1-especificidade), nas ordenadas e nas abscissas, respectivamente, para os possíveis pontos-de-corte que um teste diagnóstico pode apresentar ou que sejam determinados previamente (OKEH & OGBONNA, 2013). As coordenadas da curva são obtidas a partir da determinação da sensibilidade e da especificidade para cada valor de ponto-de-corte (GREINER et al., 2000).

Uma das utilidades da curva ROC é permitir avaliar o desempenho dos testes diagnósticos a partir de um único índice, a área sob a curva (AUC). O valor máximo da AUC é um e, quanto maior seu valor, melhor é o desempenho discriminatório do teste (GLAS et al., 2003). Mesmas áreas sob a curva podem corresponder a diferentes valores de sensibilidade e especificidade (OKEH & OGBONNA, 2013). Seu cálculo é laborioso e requer, normalmente, a utilização de recursos computacionais para tal (ZWEIG & CAMPBELL, 1993; GREINER et al., 2000).

A curva ROC também pode ser utilizada para determinar o ponto-de-corte adequado para um determinado teste. O ponto-de-corte ideal seria aquele que maximizasse a sensibilidade e a especificidade, minimizando-se, dessa forma, resultados falsos-positivos e falsos-negativos. Tal valor seria a coordenada mais próxima do quadrante superior esquerdo do gráfico. No entanto, diferentes binômios sensibilidades/especificidades podem ser necessárias de acordo com propósitos pré-definidos, aumentar a probabilidade de detecção de doentes ou infectados (maior sensibilidade) ou reduzir os riscos de falsos-positivos (maior especificidade), por exemplo. Nesses casos, também é possível chegar a esses valores pela análise dos pontos da curva (GREINER et al., 2000; MATHIAS et al., 2010).

#### 2.3.4 Repetibilidade e Reprodutibilidade

A repetibilidade e a reprodutibilidade servem para indicar a imprecisão de um método diagnóstico, no entanto, o conceito metrológico e o clínico/epidemiológico não são exatamente os mesmos, apesar de a OIE adotar oficialmente a ISO 17025 (NORMA..., 2008 ORIENTAÇÃO..., 2011; PRINCIPLES..., 2013). Ainda, o INMETRO considera o termo repetitividade e não repetibilidade (ORIENTAÇÃO..., 2011).

A repetibilidade deve ser avaliada com o mínimo de variações, permitindo determinar qual a imprecisão de resultados para uma mesma amostra analisada nas mesmas condições, isto é, replicatas da amostra analisada pelo mesmo método, mesmo analista, utilizando-se mesmos equipamentos, realizada em um curto intervalo de tempo (BANO et al., 2010; ORIENTAÇÃO..., 2011). Assim, é possível avaliar a variabilidade de resultados inerente ao teste somente.

Condições de análise onde são utilizadas mesmas amostras, mas há variação de analistas, tempo e equipamentos são classificadas como precisão intermediária (ORIENTAÇÃO..., 2011), repetibilidade (PRINCIPLES..., 2013) e reprodutibilidade (BANO et al., 2010).

Nessas condições, o objetivo é avaliar a variabilidade de resultados inerentes ao laboratório (ORIENTAÇÃO..., 2011). A forma mais simples de se calcular a repetibilidade é avaliar resultados de controles intra-placa, por exemplo, por meio de estatística descritiva (DINIZ, 2009).

A reprodutibilidade é obtida analisando-se uma amostra em diferentes laboratórios, por diferentes operadores, até mesmo, utilizando-se metodologia diferente. É importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos por meio de comparações interlaboratoriais (ORIENTAÇÃO..., 2011). Por outro lado, a OIE entende que a reprodutibilidade é a capacidade do método em teste produzir resultados consistentes quando aplicado a alíquotas da mesma amostra, analisadas em diferentes laboratórios, sendo esta uma etapa final do processo de validação de um método ou de avaliação contínua do seu desempenho (PRINCIPLES..., 2013). Devido ao maior número de variáveis envolvidas, o cálculo da reprodutibilidade é mais complexo, necessitando de metodologia mais elaborada que o cálculo da repetibilidade (BANO et al., 2010; ORIENTAÇÃO..., 2011; PRINCIPLES..., 2013). Segundo RMRS (2013), uma forma de calculá-la seria pela fórmula a seguir:

$$S_{i(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y})^2}$$

Onde:

$t$  – total de amostras ensaiadas

$n$  – total de ensaios efetuados por amostra



$j$  – n.º. da amostra,  $j = 1, t$   
 $k$  – n.º. do ensaio da amostra  $j$ ,  $k = 1, n$   
 $y_{jk}$  – valor do resultado  $k$  para a amostra  $j$

$\bar{Y}_j$  - média aritmética dos resultados da amostra  $j$

Alternativamente, pode-se utilizar a fórmula (RMRS, 2013), baseada na execução de  $n$  repetições, sendo  $n > 15$ , em condições pré-definidas, onde  $Si_{(j,k)}$  é o desvio-padrão da reprodutibilidade:

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

É consenso que a reprodutibilidade seja avaliada sob condições que imprimam maior variabilidade aos resultados, e a repetibilidade em condições mais controladas. Entretanto, não há consenso quanto às condições práticas de avaliação de cada uma delas nem com relação à metodologia empregada para calcular seus valores (DINIZ, 2009; BANOO et al., 2010; ORIENTAÇÃO..., 2011; PRINCIPLES..., 2013).

Do ponto-de-vista prático, esses parâmetros fornecem estimativa de variabilidade dos resultados. Isto é de relevante importância quando se trata de métodos diagnósticos utilizados em programas de controle de enfermidades onde se pratica sacrifício de animais positivos. Sendo que, ao apresentarem alta variabilidade de resultados, os testes possibilitam questionamentos e disputas entre proprietários e defesa sanitária, podendo comprometer a evolução dos programas.

### 2.3.5 Outras Metodologias de Avaliação

O diagnóstico é uma probabilidade de acerto, ou erro, e não uma certeza (BRASIL, 2006; DEEKS & ALTMAN, 2006). Do ponto-de-vista clínico, a utilização de parâmetros que indiquem com precisão a acurácia dos testes e permita decidir qual o mais indicado em situações particulares seria o mais desejável (GLASS et al., 2003; OKEH & OGBONNA, 2013). Dentre tais parâmetros podem-se citar o valor preditivo, a razão de verossimilhança, a razão de probabilidades e a probabilidade pós-teste e o risco relativo (ALTMAN & BLAND, 1994; GLASS et al., 2003; GORMLEY et al., 2006; OKEH & OGBONNA, 2013).

O valor preditivo é a probabilidade de se afirmar que um indivíduo está infectado/doente, ou saudável, dado resultado positivo ou negativo de um teste, aplicado dentro de um contexto epidemiológico definido (OKEH & OGBONNA, 2013). São parâmetros de validação de testes que relativizam as probabilidades de acerto diagnóstico à prevalência da enfermidade na população onde os testes forem aplicados (ALTMAN & BLAND, 1994).

Os valores preditivos (positivo e negativo) podem ser facilmente calculados a partir de tabelas de contingência 2x2. Em termos Bayesianos, o valor preditivo positivo (VPP) pode ser obtido da seguinte forma:  $P_{(D|+)} = P_{(+|D)} \times P_{(D)} / P_{(+)}$ ; onde  $P_{(+|D)}$  é a sensibilidade do teste,  $P_{(D)}$  é a prevalência da doença e  $P_{(+)}$  é a probabilidade de o teste dar resultados positivos (OKEH & OGBONNA, 2013). O valor preditivo negativo (VPN) utiliza, de forma semelhante, probabilidades de resultados negativos e de indivíduos saudáveis. Os valores preditivos podem ser fortemente influenciados pela prevalência e, quando essa não é levada em consideração, graves erros diagnósticos podem ser cometidos (CASSELS et al., 1978).

A razão de verossimilhança significa quantas vezes mais um resultado positivo, ou negativo pode estar presente em um indivíduo doente em relação aos indivíduos saudáveis (DEEKS & ALTMAN, 2006). É uma maneira mais prática de os clínicos acessarem e aplicarem os conceitos de acurácia dos testes diagnósticos por combinar em um índice a sensibilidade e a especificidade (BIANCHI & ALEXANDER, 2007). A interpretação da razão de verossimilhança positiva é diferente para a razão de verossimilhança negativa. Naquele caso, quanto maior o valor encontrado, maior a capacidade do teste de discriminar os doentes, sendo preferíveis valores maiores que dez. Nesse, valores próximos de zero são mais desejáveis para inferir sobre a ausência da enfermidade. Valores de razão de verossimilhança negativa abaixo de 0,1 são mais significativos (McGEE, 2002; BIANCHI & ALEXANDER, 2007, OKEH & OGBONNA, 2013). Valores iguais a um para razão de verossimilhança indicam que não há diferença de um doente apresentar resultado positivo ou negativo em relação aos indivíduos saudáveis (McGEE, 2002).

A razão de probabilidades do teste (*diagnostic odds ratio*) é um conceito de desempenho de testes diagnósticos introduzido por Glas et al. (2003) e indica quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo nos indivíduos doentes em relação aos saudáveis. Segundo esses autores, esse parâmetro de avaliação é preferível aos demais indicadores de desempenho porque define a acurácia dos testes diagnósticos em um único índice. É a metodologia mais indicada quando se pretende realizar metanálise em revisões bibliográficas sistemáticas, quando as variações observadas entre estudos são induzidas principalmente por variações no ponto-de-corte (GEEKS, 2001). É um conceito difícil de ser aplicado na prática clínica porque testes diagnósticos que apresentam mesmos valores de razão de probabilidades podem apresentar parâmetros de validação bem diferentes uns dos outros, podendo ter indicações de uso diferentes (OKEH & OGBONNA, 2013).

Estudos prospectivos longitudinais também podem ser utilizados para definição *a posteriori* da real condição de saúde dos indivíduos submetidos a um teste diagnóstico sob avaliação. Nesses casos, os animais submetidos aos testes são acompanhados por um período de tempo para que se possa verificar o desenvolvimento de sintomas clínicos ou de lesões características da enfermidade em questão (GORMLEY et al., 2006). O resultado é expresso na forma de risco relativo de animais positivos ou reagentes ao teste desenvolverem a enfermidade em relação àqueles não reagentes. Ressalta-se a aplicabilidade dessa metodologia no caso de enfermidades crônicas, assintomáticas (NOORDHUIZEN et al., 2001). Entretanto, há necessidade de isolamento dos animais reagentes devido ao risco de disseminação da enfermidade enquanto o estudo encontra-se em andamento.

Apesar das tentativas de padronização dos métodos de avaliação de testes diagnósticos e da forma como eles são reportados (WIGERS, 2003; RUTJES et al., 2006; PRINCIPLES..., 2013, DINIZ, 2013), o conceito de adequação ao propósito a que se destina parece prevalecer na Medicina Veterinária (PRINCIPLES..., 2013). Por isso, algumas figuras de validação podem ser mais comumente encontradas na literatura veterinária que na médica.

São várias as metodologias empregadas para a avaliação de testes diagnósticos. Aparentemente, não existe metodologia ideal para fazê-lo. Sua utilidade e aplicabilidade dependem da finalidade de uso dos testes e das condições para realizá-las, disponibilidade de material biológico, uso de padrões etc. A avaliação do desempenho dos testes é extremamente susceptível ao modelo de estudo utilizado (OKEH & OGBONNA, 2013), por isso, recomenda-se detalhamento da metodologia utilizada de tal forma que seja possível a análise dos resultados e sua comparação e de forma objetiva.

A despeito da facilidade de obtenção de resultados pela disponibilidade de uma infinidade de programas capazes de analisar dados a partir de ensaios médicos, o conhecimento dos princípios de cada metodologia é de fundamental importância para avaliação crítica dos resultados.

## 2.4 REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, J.; PEREZ, A.; BEZOS, A. *et al.*. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology*, v. 155, n. 1, p. 38 – 43, 2012.
- ALTMAN, D.G.; BLAND, J.M. Diagnostic tests 2: predictive values. *British Medical Journal*, v. 309, n. 6947, p. 102, 1994.
- ALZAMORA FILHO, F.; REIS, V.M.; FEHBERG, I. *et al.*. Identificação de *Mycobacterium bovis* em carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 5, p. 1585 – 1591, 2014.
- AMADORI, M.; LYASHCHENKO, K.P.; GENNARO, M.L. *et al.*. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v. 85, n. 4, p. 379 – 389, 2002.
- AMBRÓSIO, S.R.; OLIVEIRA, E.M.D.; RODRIGUEZ, C.A.R. *et al.*. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 241 – 244, 2008.
- ANGEL, M.O.; RISTOW, P.; KO, A.I.; Di-LORENZO, C. Serological trail of Brucella infection in an urban slum population in Brazil. *J Infect Dev Ctries.*, v. 6, n. 9, p. 675–679, 2013.
- ARAÚJO, C.P.; OSÓRIO, A.L.A.R.; JORGE, K.S.G. *et al.*. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. *PLOS One*, v. 9, n. 3, 2014a, e91023.
- ARAÚJO, C.P.; OSÓRIO, A.L.A.R.; JORGE, K.S.G. *et al.*. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues through nested-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 633 – 640, 2014b.
- AUER, L.A.; SCHLEEHAUF, S.M. Antibodies to mycobacteria in cattle not infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*, v. 18, n. 1, p. 51 – 61, 1988.
- BANOO, S.; BELL, D.; BOSSUYT, P. *et al.*. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nature Reviews in Microbiology*, v. 4, n. 12, S21–S31, 2010
- BERMUDEZ, H.R.; RENTERIA, E.T.; MEDINA, B.G. *et al.*. Correlation between histopathological, bacteriological and PCR diagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 9, n. 15, p. 2082 – 2084, 2010.
- BIANCHI, M.T.; ALEXANDER, B.M. Evidence based diagnosis: does the language reflect the theory? *BMJ*, v. 333, n. 26, p. 442 – 445, 2006.
- BOVINE tuberculosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: World Organization for Animal Health, 2013. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.07\\_BOVINE\\_TB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf)> Acessado em 21-09-2016.

BRASCUM, A.J.; GARDNER, I.A.; JOHNSON, W.O. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 68, n. 2-4, p. 145 – 163, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal*. 2006. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf)> Acessado em: 16/04/2012

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Norma Interna DAS Nº. 02, de 30 de abril de 2012. Disponível em: <[http://www.google.com.br/url?url=http://www.dda.agricultura.rs.gov.br/ajax/download.php%3FqArquivo%3D20130425112834norma\\_interna\\_02\\_sda\\_2012.pdf&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ved=0ahUKEwju\\_4Le6ZrMAhXITZAKHXHcDXsQFggUMAA&usq=AFQjCNHzbUfKUme-3PB9lqfItLnd6wrDNw.>](http://www.google.com.br/url?url=http://www.dda.agricultura.rs.gov.br/ajax/download.php%3FqArquivo%3D20130425112834norma_interna_02_sda_2012.pdf&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ved=0ahUKEwju_4Le6ZrMAhXITZAKHXHcDXsQFggUMAA&usq=AFQjCNHzbUfKUme-3PB9lqfItLnd6wrDNw.>)> Acessado em: 09/09/2014

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA Nº. 19, de 10 de outubro de 2016. *Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT*. 2016. Disponível em: <<http://crmvpb.org.br/alteracoes-no-regulamento-tecnico-do-pncebt/>> Acessado em: 21/11/2016

CARVALHO, R.C.T.; FURLANETO, L.V.; MARUYAMA, F.H. *et al.*. Evaluation of the efficiency of nested q-PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex directly from tuberculosis-suspected lesions in *post-mortem* macroscopic inspections of bovine carcasses slaughtered in the state of Mato Grosso, Brazil. *Meat Science*, v.106, p. 11 – 15, 2015.

CASAL, C.; DIÉZ-GUERRIER, A.; ÁLVAREZ, J. *et al.*. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Veterinary Microbiology*, v. 170, n. 3-4, p. 342 – 351, 2014.

CASSELS, W.; SCHOENBERGER, A.; GRABOYS, T. Interpretation by physicians of clinical laboratory results. *New England Journal of Medicine*, v. 2, n. 18, p. 999 – 1001, 1978.

CASWELL, J.L.; WILLIAMS, K.J. *Respiratory system*. In: MAXIE, M.G. (Ed.) *Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals*. Philadelphia, USA: Elsevier, 2008. p. 606 – 610.

CLEGG, T.A.; DUIGNAN, A.; WHELAN, C. *et al.*. Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the  $\gamma$ -interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Veterinary Microbiology*, v.151, n. 1-2, p. 68–76, 2011.

ORIENTAÇÃO sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro, Brasil: INMETRO, 2011. 19p. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf)>. Acesso em 17 de janeiro de 2015.

CORNER, L.A.; TRAJSTMAN, A.C. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Veterinary Microbiology*, v. 18, n. 2, p. 127 – 134, 1988.

CORNER, L.A.; NICOLACOPOULOS, C. Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. *Australian Veterinary Journal*, v. 65, n. 7, p. 202 – 205, 1988.

- CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 40, n. 1 – 2, p. 53 – 64, 1994.
- CORNER, L.A.; TRAJSTMAN, A.C.; LUND, K. Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 43, n. 4, p. 129 – 133, 1995.
- CORNER, L.A.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D.U. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximizing the number of positive cultures. *Veterinary Microbiology*, v. 156, n. 1-2, p. 162 – 171, 2012.
- COSTA, P.; FERREIRA, A.S.; AMARO, A. *et al.* Enhanced detection of tuberculous mycobacteria in animal tissues using a semi-nested probe-based real-time PCR. *PLOS One*, v. 8, n. 11, e81337, 2013.
- COURCOUL AL LOYEN J-L, BRUGÈRE L. *et al.* Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology, histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis using latent class analysis. *PLOS One*, v.9, n. 3, e90334, 2014.
- DEEKS, J.J. Systematic reviews of evaluation of diagnostic and screening tests. *BMJ*, v. 323, n. 21, p. 157 – 162, 2001.
- DEEKS, J.J.; ALTMAN, D.G. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *British Medical Journal*, v. 329, n. 17, p. 168 – 169, 2006.
- DENDUKURI, N.; JOSEPH, L. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics*, v.57, n. 1, p. 158–167, 2001.
- DINIZ, R.S. *Determinação do ponto de corte, sensibilidade e especificidade do ELISA rpg90 para o diagnóstico da anemia infecciosa equina utilizando o modelo bayesiano*. 2009. 27f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.
- DINZ, R.S. *Validação de métodos laboratoriais aplicados ao diagnóstico de doenças dos animais*. 2013. 83F. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- ENØE, C.; GEORGIADIS, M.P.; JOHNSON, W.O. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 45, N. 1-2, p. 61-81, 2000.
- FARIAS, T.A.; ARAÚJO, F.R.; OSÓRIO, A.L.A.R. *et al.* ELISA based recombinant MPB70 and P27 for detection of antibodies against *Mycobacterium bovis*. *Revista de Patologia Tropical*, v. 41, n. 2, p. 155 – 162, 2012.
- FARNHAM, M.W.; NORBY, B.; GOLDSMITH, T.; WELLS, S. Meta-analysis of field studies on bovine tuberculosis skin tests in United States cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 103, n. 2-3, p. 234 – 242, 2012.
- FIFIS, T.; COSTOPOULOS, C.; RADFORD, A.J. *et al.* Purification of major antigens from *Mycobacterium bovis* culture filtrate. *Infection and Immunity*, v. 59, n. 3, p. 800 – 807, 1991.

- FRANCIS, J.; SEILER, R.J.; WILKIE, I.W. *et al.*. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Veterinary Record*, v. 103, n. 9 p. 420 – 425, 1978.
- GARDNER, I.A.; STRYHN, H.; LIND, P.; COLLINS, M.T. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 45, n. 1-2, p. 107 – 122, 2000.
- GERSTMAN, B.B.; CAPPUCCI, D.T. Evaluating the reliability of diagnostic test results. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 188, n.3, p. 248 – 251, 1986.
- GLAS, A.S.; LIJMER, J.G.; PRINS, M.H.; *et al.*. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 56, n. 11, p. 1129 – 1135, 2003.
- GOOD, M.; DUIGNAN, A. Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication. *Veterinary Medicine International*, 2011, doi: 10.4061/2011/410470.
- GOODCHILD, A.V.; DOWNS, S.H.; UPTON, P. *et al.*. Specificity of the comparative skin test for bovine tuberculosis in Great Britain. *Veterinary Record*, v.177, n. 10, p. 258 – 268, 2015.
- GORMLEY, E.; DOULE, M.B.; FITZSIMONS, T. *et al.*. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Veterinary Microbiology*, v. 112, n. 2-4, p. 171 – 179, 2006.
- GRANGE, J.M.; YATES, M.D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Microbiology*, v. 40, n. 1-2, p. 137 – 151, 1994.
- GREINER, M.; PFEIFFER, D. SMITH, R.D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 45, n. 1-2, p. 23 – 41, 2000.
- HARBOE, M.; WIKER, H.G.; DUNCAN, J.R. *et al.*. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 5, p. 913 – 921, 1990.
- HARRIS, N.B. *Molecular techniques: applications in epidemiologic studies*. In: THOEN, C.O; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. (Ed.) *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Iowa, USA: Blackwell, 2006. p. 54-62.
- HINES, N.; PAYEUR, J.B.; HOFFMAN, L.J. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTECT 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 18, n. 3, p. 243 – 250, 2006.
- HIRPA, E.; AMENI, G.; LAWRENCE, J.C. *et al.*. Performance evaluation of *Mycobacterium bovis* antibody test for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. *Academic Journal of Animal Diseases*, v. 3, n. 3, p. 33-38, 2014.
- HOLLANDA, E.D.; LOBATO, F.C.F.; MOTA, P.M.P.C.; ABREU, V.L.V. Avaliação de métodos de descontaminação para isolamento de *Mycobacterium bovis*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 24, n. 2, p. 54 – 57, 2002.

- HOULLIHAN, M.G.; DIXON, F.W.; PAGE, N.A. Outbreak of bovine tuberculosis featuring anergy to the skin test, udder lesions and milkborne disease in young calves. *Veterinary Record*, v. 163, n. 12, p. 357 – 361, 2008.
- HUMPHREY HM, ORLOSKI KA, OLEA-PPELKA J. Bovine tuberculosis slaughter surveillance in the United States 2001-2010: assessment of its traceback investigation function. *BMC Veterinary Research*, v. 10, n. 1, p. 182 - 192 2014.
- ISSA, M.A.; SOARES FILHO, P.M.; FONSECA JÚNIOR, A.A. *et al.*. Comparative study of *Mycobacterium bovis* primary isolation methods. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 1, p. 139 – 144, 2016.
- JACOBSON, R.H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, v. 17, n.2, p. 469 – 486, 1988.
- JOLLEY, M.E.; NASIR, M.S.; SURUJBALLI, O.P. *et al.*. Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. *Veterinary Microbiology*, v. 120, n. 1-2, p. 113 – 121, 2007.
- 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. *American Journal of Epidemiology*, v. 141, n. 3, p. 263 – 272, 1995.
- KAROLEMEAS, K.; de la RUA-DOMENECH, R.; COOPER, R. *et al.*. Estimation of the relative sensitivity of the comparative tuberculin skin test in tuberculous cattle herds subjected to depopulation. *PLoS ONE* v. 7, n. 8, e43217, 2012.
- KIERK, N. Bovine tuberculosis program in South Africa: the impact of *M. bovis*-infected wild species. In: THOEN, C.O.; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. (Eds.) *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Iowa, USA: Blackwell, 2006. p. 238-243.
- KOLLER-JONES, M.A.; TURCOTTE, C.; LUTZE-WALLACE, C.; SURUJBALLI, O. Effect of bovine tuberculosis in wildlife on a national eradication program - Canada. In: THOEN, C.O.; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. (Ed.) *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Iowa, USA: Blackwell, 2006. p. 226-237.
- LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER; RAMOS, A.A. Reações alérgicas inespecíficas no diagnóstico da tuberculose bovina causadas por *Mycobacterium intracellulare*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 11, n. 9, p. 65 – 71, 1976.
- LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.H.; MOTA, P.M.P.C.; LEITE, R.C. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 1, n.4, p. 145 – 149, 1981.
- LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; MATEOS, A. *et al.*. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 1, p. 33 – 36, 1995.
- LIGHTBODY, K.A.; McNAIR, J.; NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M. IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunized and tuberculin skin test-reactor cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 75, n. 2, p. 177 – 188, 2000.

- LoBUE, P. Public health significance of *M. bovis*. In: THOEN, C.O; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. (Eds.) *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Iowa, USA: Blackwell, 2006. p. 6-12.
- LOPES, L.B.; ALVES, T.M.; STYNEN, A.P.R. *et al.*. Parameter estimation and use of gamma interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 4, p. 279 – 283, 2012.
- LYASHCHENKO, K. WHELAN, A.O.; GREENWALD, R. *et al.*. Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 5, p. 2462 – 2467, 2004.
- MAC DIARMID, S. Risk analysis and the importation of animals. *Surveillance*, v. 18, n. 5, p. 8 - 11, 1991.
- MARTIN, S.W. The evaluation of tests. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v. 41, n. 1, p. 19 – 25, 1977.
- MASSART, S.; BROSTAUX, Y.; BARBAROSSA, L. *et al.*. Interlaboratory evaluation of two reverse-transcriptase polymerase chain reaction-based methods for detection of four fruit tree viruses. *Annals of Applied Biology*, v. 154, n. 1, p. 133 – 141, 2009.
- MATHIAS, L.A.; CORBELLINI, L.G.; MAIA, L. *et al.*. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico de brucelose bovina. *Ciência Rural*, v. 40, n. 10, p. 2135 – 2140, 2010.
- McGEE, S. Simplifying likelihood ratios. *Journal of General Internal Medicine*, v. 17, n. 8, p. 647 – 650, 2002.
- McGINN, T.; WYER, P.C.; NEWMAN, T.B. *et al.*. Tips for teachers of evidence-based medicine: 3. Understanding and calculating kappa. *Canadian Medical Association Journal*, v. 17, n. 11, p. 1369 - 1373, 2004.
- McHUGH, M. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica*, v. 22, n. 3, p. 276 – 282, 2012.
- MENDES, R.E.; SCHNEIDER, A.F.; WERLICH, D.E. *et al.*. Estudo anatomopatológico em tecidos condenados pelo serviço de inspeção federal (SIF) por suspeita de tuberculose. *Ciência Animal Brasileira*, v. 14, n. 4, p. 448 – 453, 2013.
- MEDEIROS, L.S.; MARASSI, C.D.; FIGUEIREDO, E.E.; LILEMBAUN, W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 531 – 541, 2010.
- MEDEIROS, L.; MARASSI, C.D.; DUARTE, R.S. *et al.*. Comparison of decontamination methods for primary isolation of *Mycobacterium bovis* in paucibacillary bovine tissues. *Letters in Applied Microbiology*, v.54, n.3, p.182-6, 2012.
- MELO, E.S.P.; SOUZA, I.I.F.; RAMOS, C.A.N. *et al.*. Evaluation of the use of recombinant proteins of *Mycobacterium bovis* as antigens intradermal tests for diagnosis of bovine tuberculosis. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 47, n. 3, p. 273 – 280, 2015.



- MICHEL, A.L.; MÜLLER, B.; van HELDEN, P.D. *Mycobacterium bovis* at human-animal interface: a problem or not? *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 3-4, p. 371 – 381, 2010.
- MON, M.L.; MOYANO, R.D.; VIALE, M.N. *et al.*. Evaluation of cocktails with recombinant proteins of *Mycobacterium bovis* for a specific diagnosis of bovine tuberculosis. *BioMed Research International*, p. 1 – 12, 2014, doi: 10.1155/2014/140829.
- MOURA, A.; HODON, M.A.; SOARES FILHO, P.M. *et al.*. Comparison of nine DNA extraction methods for the diagnosis of bovine tuberculosis by real-time PCR. *Ciência Rural*, v. 46, n. 7, p. 1223 – 1228, 2016.
- MÜLLER, B.; DÜRR, S.; ALONSO, S. *et al.*. Zoonotic *Mycobacterium bovis* induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, p. 899 – 908, 2013.
- NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 40, n. 1-2, p. 41 – 52, 1994.
- NGANDOLO, B.N.R.; MÜLLER, B.; DIGUIMBAYE-DJAÏBE, C. *et al.*. Comparative assessment of fluorescence polarization and tuberculin skin testing for the diagnosis of bovine tuberculosis in Chadian cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 89, n. 1-2, p. 81 – 89, 2000.
- NOORDHUIZEN, J.P.T.M.; FRANKENA, K.; THRUSFIELD, M.V.; GRAAT, E.A.M. *Application of quantitative methods in veterinary epidemiology*. Wageningen – Holanda: Wageningen Press, 2001. 429p.
- NORMA de calidad y directrices de la OIE para los laboratorios veterinarios: enfermedades infecciosas. 2 ed. Paris – França: OIE, 2008. 73p.
- NTZOUFRAS, L. *Bayesian modeling using WinBUGS*. Athens, Greece: Willey, 2009. 492p.
- PRINCIPLES and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: MANUAL of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2013. Paris: World Organization for Animal Health, 2013. Cap. 1 .1 .5, p. 1 – 17. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/1.01.05\\_VALIDATION.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf). > Acessado em 21-09-2013.
- OKEH, U.M.; OGBONNA, L.N. Statistical evaluation of indicators of diagnostic test performance. *American Journal of BioScience*, v. 1, n. 4, p. 63-73, 2013.
- PALMER, M.V.; WATERS, W.R. Bovine tuberculosis and the establishment of an eradication program in the United States: role of veterinarians. *Veterinary Medicine International*, 2011, doi:10.4061/2011/816345.
- PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A. *et al.*. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v. 127, n. 3-4, p. 315 – 324, 2008.
- PAULIN, L.M.; PRADO, G.E.S.; FEDERSONI, I.S.P. *et al.*. 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
- PEREIRA, G.A. *Avaliação de testes diagnósticos na ausência de padrão ouro considerando relaxamento da suposição de independência condicional, covariáveis e estratificação da*

- população: uma abordagem bayesiana. 2011. 234f. Tese (Doutorado em Estatística) - Departamento de Estatística, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- PINTO, P. S. A.; FARIA, J. E.; VILORIA, M. I. V.; BEVILACQUA P.D. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção post-mortem de bovinos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 3, n. 1, p. 10 – 15, 2002.
- PINTO, M.R.A.; FAGLIARI, J.J.; MATHIAS, L.A. *et al.*. Avaliação da prova do antígeno acidificado tamponado, em comparação com a provas de fixação de complemento e 2-mercaptoetanol, para o diagnóstico sorológico da brucelose em um rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) infectado por *Brucella abortus*. *ARS Veterinária*, v. 21, n. 4, p. 147 – 154, 2005.
- PLACKETT, P.; RIPPER, J.; CORNER, L.A. *et al.*. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Australian Veterinary Journal*, v. 66, n. 1, p. 15 – 19, 1989.
- POLLOCK, J.M.; NEILL, S.D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Veterinary Journal*, v. 163, n. 2, p. 115 – 127, 2002.
- RAMOS, T.R.R.; PINHEIRO JÚNIOR, W.P.; SOBRINHO, P.A.M. *et al.*. Epidemiological aspects of an infection by brucella abortus in risk occupational groups in the microregion of Araguaína, Tocantins. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 12, n. 2, p. 133 – 138, 2008.
- RAMOS, D.F.; TAVARES, L.; SILVA, P.E.A.; DELLAGOSTIN, O.A. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 365 – 372, 2014.
- REIS, E.F. *Purificação de MPB70 recombinante e aplicação em testes de diagnóstico da tuberculose bovina*. 2004. 94f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- REITSMA, J.B.; RUJTES, A. W.S.; KHAN, K.S.; BOSSUYT, P.M. A review of solutions for diagnostic accuracy studies with an imperfect or missing reference standard. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 62, n. 8, p. 797-806, 2009.
- RM 68 Incerteza da medição: guia prático do avaliador de laboratórios. Porto Alegre: Rede Metrológica do Rio Grande do Sul, 2013. 32p. (Revisão 05).
- ROBBE-AUSTERMAN, S.; BRAVO, D.M.; HARRIS, B. Comparison of the MIGIT 960, BACTEC 460 TB and solid media for isolation of *Mycobacterium bovis* in United States veterinary specimens. *Veterinary Research*, v. 9, n. 74, 2013, doi:10.1186/1746-6148-9-74.
- ROCHA, A.; ELIAS, A.R.; SOBRAL, L.F. *et al.*. Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. *Tuberculosis*, v. 91, n. 1, p. 14 – 21, 2011.
- RORING, S.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R.A.; NEIL, S.D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. *Veterinary Microbiology*, v. 74, n. 3, p. 227 – 236, 2000.
- de La RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures, and review of zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 86, n. 2, p. 77 – 109, 2006.

- RUTJES, A.W.S.; REITSMA, J.B.; COOMARASAMY, A.; BOSSUYT, P.M. Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard a review of methods. *Health Technology Assessment*, v. 11, n. 50, p. 1 – 69, 2007.
- SALES, M.L.; FONSECA JÚNIOR, A.A.; SALES, E.B. *et al.*. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. *Folia Microbiologica*, v. 59, n. 5, p. 433 – 438, 2014a.
- SALES, M.L.; FONSECA JÚNIOR, A.A.; ORZIL, L. *et al.*. Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, n. 2, p. 4607 – 4616, 2014b.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3ª ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2007. 264p.
- SCHILLER, I.; OESCH, B.; VORDERMEIER, H.M. *et al.*. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 57, n. 4, p. 205-220, 2010.
- SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento*. São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 350p.
- SILVA, M.R.; ROCHA, A.S.; COSTA, R.R. *et al.*. Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 3, p. 321 - 327, 2013.
- SOBRAL, L.F.; DUARTE, R.S.; VIEIRA, G.B.O. *et al.*. Identification of *Mycobacterium bovis* among mycobacterial isolates from human clinical specimens at university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 37, n. 5, p. 664 – 668, 2011.
- SOUZA, I.I.F.; MELO, E.S.P.; RAMOS, C.A.N. *et al.*. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. *SpringerPlus*, v. 1, n. 1, p. 77 - 83, 2012.
- SOUZA, M.R.S. *Estimação da sensibilidade e especificidade de testes diagnósticos da brucelose bovina via inferência bayesiana*. 2013. 63f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, MG.
- SURUJBALLI, O.P.; ROMANOWSKA, A.; SUGDEN, E.A. *et al.*. A fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in cattle sera. *Veterinary Microbiology*, v. 87, n. 2, p. 149 – 157, 2002.
- TAMMEMAGI, L.; SIMMONS, G.C.; KELMAN, R. *et al.*. A study of tuberculosis-like lesions in cattle slaughtered in Queensland meatworks. *Australian Veterinary Journal*, v. 49, n. 11, p. 507 – 511, 1973.
- TAYOR, M.G.; WORTH, D.R.; PALMER, S. *et al.*. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Veterinary Research*, v. 3, n. 12, 2007.
- TAYLOR, M.J.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance

energy transfer probe rapid-cycle PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 4, p. 1272 – 1278, 2001.

TAYLOR, G.M.; WORTH, D.R.; PALMER, S.; JAHANS, K.; HEWINSON, R.G. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *Veterinary Research*, v. 3, n. 12, 2007.

TRIPEPI, G.; JAGER, K.J.; DEKKER, F.W.; ZOCCALI, C. Diagnostic methods 2: receiver operating characteristic (ROC) curves. *Kidney International*, v. 76, n. 3, p. 252 – 256, 2009.

TROST, B.; STUBER, T.; SURUJBALLI, O. *et al.* Investigation of the cause of geographic disparities in IDEXX ELISA sensitivity in serum samples from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Scientific Reports*, v.6, 2016. 22763.

TYLLER J.W., CULLOR, J.S. Titers, tests and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 1, n. 11, p. 1550-1558, 1989.

VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASXARINO, D. *et al.* Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 20, n. 2, p. 164 – 169, 2008.

VERAS, C.M.T.; MARTINS, M.S. A confiabilidade dos dados nos formulários de autorização de internação hospitalar (AIH), Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 10, n. 3, 1994. Disponível em: <[http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S0102-311x1994000300014&script=sci\\_arttext](http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S0102-311x1994000300014&script=sci_arttext)>. Acessado em: 11 novembro 2008.

VIDAL, C.E.S. *Testes diagnósticos para detecção de bovinos infectados por Mycobacterium bovis*. 2013. 89f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

WARDS, B.J.; COLLINS, D.M.; LISLE, G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, v. 43, n. 2-3, p. 227 – 240, 1995.

WATERS, W.R.; BUDDLE, B.M.; VORDEMEIRE, H.M. *et al.* Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 18, n. 11, p. 1882 – 1888, 2011.

WATRELOT-VIRIEUX, D.; DREVON-GAILLOT, E.; TOUSSAINT, Y.; BELLI, P. Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in French cattle. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.53, n. 2, p. 321 – 325, 2006.

WEISS, R. *Mycobacterium bovis* infections in cattle in Germany. In: THOEN, C.O; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. (Eds.) *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Iowa, USA: Blackwell, 2006. p. 246-247.

WHELAN, C.; SHURALEV, E.; O'KEEFFE, G. *et al.* Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Clinical Vaccine Immunology*, v. 15, n. 12, p. 1834 – 1838, 2008.

WHELAN, C.; WHELAN, O.; SHURALEV, E. *et al.* Performance of the enferplex TB assay with cattle in Great Britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 17, n. 5, p. 813–817, 2010.

WHELAN, C.; SHURALEV, E.; KWOK, H.F. *et al.*. Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of *Mycobacterium bovis*-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 23, n. 3, p. 499 – 503, 2011.

WELSH, M.D.; CUNNINGHAM, R.T.; CORBETT, D.M. *et al.*. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, v. 114, n. 1, p. 101 – 111, 2005.

WIGERS, A. L. Valid methods: the quality assurance test method development, validation, approval and transfer for veterinary testing laboratories. *Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 15, n. 4, p. 303 – 310, 2003.

WIKER, H.G. MPB70 and MPB83 – major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 69, n. 6, p. 492 – 499, 2009.

WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S. *et al.*. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v. 31, n. 1, p. 71 – 79, 1992.

XIN, T.; JIA, H.; DING, J. *et al.*. Assessment of a protein cocktail-based skin test for bovine tuberculosis in a double-blind field test in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 20, n.4, p. 482 – 490, 2013.

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P. *et al.*. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 6, p. 129 – 133, 2001.

ZINSSTAG, J.; SCHELLING, E.; ROTH, F.; KAZWALA, R. Economics of bovine tuberculosis. In: THOEN, C.O; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. (Eds.) *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Iowa, USA: Blackwell, 2006. p. 84-88.

ZWEIG, M.H.; CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical Chemistry*, v. 39, n. 4, p. 561 – 577, 1993.

### 3 CAPÍTULO 2 - DESEMPENHO DE TRÊS TESTES *POST-MORTEM* PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA

#### 3.1. RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as técnicas de isolamento bacteriano, PCR em tempo real (qPCR) e ELISA IDEXX® para o diagnóstico *post-mortem* da tuberculose bovina em carcaças bovinas condenadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Brasil, utilizando-se modelo bayesiano de classe latente. Foram avaliadas 661 amostras oriundas de 11 estados brasileiros coletadas na rotina de inspeção sanitária do SIF. O isolamento foi a técnica mais sensível, com aproximadamente 96% de sensibilidade. A qPCR apresentou sensibilidade aproximada de 64% e o ELISA IDEXX®, 25 % de sensibilidade. Todas as técnicas apresentaram especificidade acima de 90%, sendo a menos específica delas a qPCR, e a mais específica, o isolamento (100% de especificidade). Apesar da baixa sensibilidade, o ELISA IDEXX® foi capaz de identificar amostras reagentes que não foram detectadas pelas outras duas técnicas. Não foi encontrada correlação entre nenhum dos testes avaliados. O conhecimento do desempenho possibilita o emprego estratégico dos testes diagnósticos de acordo com os objetivos definidos pelo usuário, serviços de inspeção sanitária oficiais, serviços oficiais de defesa sanitária animal e veterinários habilitados.

Palavras-chave: tuberculose bovina diagnóstico, *M. bovis* isolamento, teste diagnóstico avaliação

#### 3.2 ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the bacterial isolation, real-time PCR (qPCR) and IDEXX™ ELISA for post-mortem diagnosis of bovine tuberculosis in bovine carcasses condemned by the Brazilian Federal Inspection Service (SIF), applying Bayesian latent class models. A total of 661 samples from 11 Brazilian states collected in the sanitary inspection routine of SIF were evaluated. Isolation was the most sensitive technique, approximately 96% sensitivity. The qPCR presented approximate sensitivity of 64% and the IDEXX™ ELISA, 25% sensitivity. All techniques presented specificity above 90%, the least specific of which was qPCR, and the more specific was the isolation (100% specificity). Despite the low sensitivity, the IDEXX™ ELISA was able to identify positive samples that were not detected in the other techniques. No correlation was found between any of the evaluated tests. Knowledge of performance enables the strategic use of diagnostic tests according to the objectives defined by the user, official sanitary inspection services, official animal health defense services and authorized veterinarians.

Key-words: bovine tuberculosis diagnosis, *M. bovis* isolation, diagnostic tests evaluation

#### 3.3 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma zoonose de evolução crônica e debilitante causada pelo *Mycobacterium bovis* (BOVINE..., 2016). É uma enfermidade de distribuição mundial que oferece considerável risco à saúde pública e provoca reconhecido impacto econômico negativo na atividade pecuária (BOVINE..., 2016; ZISSTAG et al, 2006; LoBUE et al., 2006; SCHILLER et al., 2010).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal e promover a competitividade da pecuária nacional. Como medida complementar de controle e como forma de atender exigências sanitárias de mercados internos e externos (PROGRAMA..., 2006; BRASIL, 2012), o MAPA preconiza o monitoramento dos rebanhos pela

detecção de lesões tuberculosas realizado pelos serviços de inspeção sanitária animal e a realização de diagnóstico confirmatório em laboratório pertencente à rede oficial de laboratórios agropecuários (LANAGRO's).

A inspeção sanitária visa identificar animais que apresentem lesões sugestivas de tuberculose, considerados inapropriados para o consumo humano (CORNER, 1994; ARAÚJO et al., 2014), além disso é uma das formas recomendadas de vigilância epidemiológica da tuberculose (COUSINS, 2001; COSTA et al., 2013; CARVALHO, et al., 2015). As lesões sugestivas de tuberculose encontradas durante a inspeção sanitária devem ser submetidas a testes confirmatórios, uma vez que as mesmas não são patognomônicas (TAMMEMAGI et al., 1973; MENDES et al., 2013). Este procedimento pode minimizar diagnósticos falso-positivos, acarretando condenação desnecessária de carcaças, imposição de restrições comerciais a propriedades exportadoras, gastos desnecessários relativos a rastreabilidade ao foco e a realização de exames em rebanhos não infectados (TAMMEMAGI et al., 1973; KANEE et al., 2006; MENDES et al., 2013; HUMPHREY et al., 2014).

A confirmação do diagnóstico presuntivo de lesões sugestivas pelo isolamento e a identificação do agente é considerado “padrão-ouro” para o diagnóstico da tuberculose, sendo portanto, o diagnóstico definitivo da enfermidade realizado somente quando há isolamento do agente infeccioso (CORNER, 1994; COUSINS, 2001; CORNER et al., 2012). Devido à demora na obtenção dos resultados e aos altos custos e riscos inerentes à atividade, o isolamento tem sido substituído por técnicas mais rápidas, baratas e seguras, como as reações em cadeia da polimerase (PCR) e a histopatologia (MEDEIROS et al., 2010; SCHILLER et al., 2010; ARAÚJO et al., 2014), apesar de relatadas como sendo menos sensíveis ou menos específicas que o isolamento e a identificação (TAYLOR et al., 2007; COSTA et al., 2010;; THACMER et al., 2011; COURCOUL et al., 2014).

O emprego de outros métodos diagnósticos que apresentem alta especificidade e que sejam de fácil execução, baratos e seguros poderia melhorar o diagnóstico *post mortem* da tuberculose, desde que identificassem animais infectados, não identificados pelas demais técnicas. Os testes sorológicos, normalmente utilizados como diagnóstico *ante mortem* (WHELAN et al., 2008; NGANDOLO et al., 2009; WATTERS et al., 2011; CLEGG et al., 2011) seriam alternativas com potencial para utilização como diagnóstico *post mortem* por atenderem aos critérios descritos anteriormente.

O isolamento e a identificação do agente e a PCR em tempo real (qPCR), utilizados pelo Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais (MG), são metodologias acreditadas na ISO/IEC 17025, atualmente aceitas pelo PNCEBT como métodos confirmatórios (PROGRAMA..., 2006; ESCOPO..., 2016). O teste sorológico ELISA IDEXX™ é um teste já reconhecido pela OIE.<sup>1</sup> Mesmo assim, essas metodologias carecem de avaliação que permita determinar suas respectivas capacidades de detectar e confirmar infecção em lesões sugestivas de tuberculose em animais inspecionados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Brasil.

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda que os testes diagnósticos sejam avaliados quanto ao propósito a que se destinam no país ou região onde serão utilizados (PRINCIPLES..., 2016). A inexistência de padrão-ouro e a carência de soros de referência dificultam a validação clínica de métodos diagnósticos laboratoriais para a tuberculose bovina, já que nenhum teste é 100% sensível e/ou específico (MEDEIROS et al., 2010; COURCOUL et al., 2014).

A melhor alternativa nestes casos é utilizar metodologia baseada em modelos bayesianos de classe latente, partindo-se de informações prévias sobre os testes, conjugadas com informações geradas pelos dados coletados, que permitem estimar as probabilidades *a posteriori* dos parâmetros de interesse, quais sejam: sensibilidade e especificidade (ENØE et al., 2000; REITSMA et al., 2009; LIMMATHUROTSAKUL et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de três testes diagnósticos da tuberculose bovina, o isolamento e identificação do agente, a qPCR e o ELISA IDEXX®, em amostras de animais com lesões sugestivas de tuberculose coletadas pelo serviço federal de inspeção sanitária – Serviço de Inspeção Federal (SIF).

### 3.4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1. Amostras

Um total de 661 amostras, oriundas dos estados do Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Paraná, Rondônia, Rio Grande do Sul, São Paulo e Tocantins, coletadas na rotina de inspeção sanitária do SIF, foram analisadas neste trabalho, sendo 527 amostras coletadas entre 2010 e 2011 e as 134 restantes coletadas entre 2012 e 2013.

As amostras de tecidos e órgãos foram obtidas a partir de animais com de lesões sugestivas de tuberculose, encontradas em linfonodos retrofaríngeo, mediastínico e mesentéricos, no fígado, no pulmão, na pleura, no diafragma e no mesentério. Fragmentos representativos dessas lesões, que variaram de 20g a 200g, foram acondicionados em frascos plásticos de boca larga, devidamente identificados e congelados a -20°C até o momento do envio ao laboratório.

Uma vez encontrada lesão sugestiva de tuberculose a carcaça era desviada para o Departamento de Inspeção Final (DIF). Uma vez no DIF, o sangue total, contido na veia braquial, foi coletado em frasco de vidro limpo e seco, sem anticoagulante pela flexão do membro torácico da meia carcaça onde foi encontrada respectiva lesão sugestiva de tuberculose.

Alíquotas de soro foram obtidas a partir do sangue venoso coletado na veia braquial da meia carcaça de onde foram obtidas as respectivas amostras de tecidos e órgãos com lesões sugestivas. O soro foi obtido após coagulação do sangue, transferido para frasco apropriado, identificado e congelado nas mesmas condições das amostras de tecido.

As amostras foram encaminhadas sob refrigeração ao LANAGRO-MG, em embalagem tríplice, de modo a garantir a segurança do transporte e integridade das mesmas. Todas as amostras foram recebidas no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG) congeladas ou refrigeradas, até o máximo de oito graus Celsius. Uma vez no LANAGRO-MG, as amostras de órgãos, tecidos e soro receberam identificação individual unívoca e foram mantidas congeladas a -20°C até o momento da análise laboratorial.

#### 3.4.2. Isolamento e Identificação

Amostras compostas, de três a cinco gramas de fragmentos de tecidos, constituídas de partes com lesão e interface com tecido sadio foram maceradas em almofariz e pistilo com pequena quantidade de areia estéril. O tecido macerado foi descontaminado com 40 mL de solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 6% por 15 a 30 minutos, no máximo. Após descontaminação, o material foi centrifugado a 3000xg, sob refrigeração, por quinze minutos. O sobrenadante foi descartado e o depósito foi neutralizado com 40 mL de solução de fosfato de sódio dibásico pH 7,2 – 7,4 por dez minutos. O pH foi verificado após esse período, e caso estivesse entre seis e sete, duzentos microlitros da interface entre o depósito e o sobrenadante foram retirados e inoculados em tubos contendo meios Middlebrook 7H11 com aditivos OADC e Stonebrink. Os tubos foram incubados a 36°C ± 1°C por até dez semanas, sendo que na primeira semana foram mantidos deitados até que todo o líquido inoculado fosse absorvido pela superfície do meio. A partir da segunda semana, foram mantidos de pé até o fim dos testes. Foram realizadas leituras semanais de cada tubo inoculado e caso fossem encontradas culturas típicas de *M. bovis*, os tubos eram retirados da incubação e as culturas submetidas a identificação por uma qPCR específica para identificação de *M. bovis* a partir das colônias isoladas (SALES et al., 2014a; SALES et al., 2014b). Amostras contaminadas foram descartadas tão logo identificado crescimento bacteriano atípico em



intensidade que se julgou que pudesse inibir o crescimento de *M. bovis*. Apesar da contaminação, tais amostras foram submetidas a qPCR em tecidos e ao ELISA IDEXX®.

#### 3.4.3. PCR em tempo real (qPCR) em tecidos

Uma pequena alíquota de cada tecido foi acondicionada em microtubos de dois mililitros contendo quinhentos microlitros de tampão ATL (Qiagen, Alemanha). A digestão enzimática foi realizada, adicionando-se cinquenta microlitros de proteinase K, em cada um dos tubos, os quais foram incubados *overnight* a 56°C. Após este período, foi realizada inativação das amostras a 87,5°C ± 1°C por uma hora. Duzentos microlitros de amostra inativada foram submetidos à extração do DNA bacteriano utilizando-se kit de extração de DNA Blood & Tissue kit (Qiagen, Alemanha), seguindo-se instruções do fabricante.

O DNA extraído foi submetido à qPCR no equipamento QuantStudio 7 Flex™ Real-Time PCR System (Life Technologies, EUA).

O protocolo realizado envolveu duas reações de qPCR, uma com iniciadores específicos para o genoma de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, região da sequência de inserção (IS)1081, que amplificam um fragmento de 124 pares de base, e outra com iniciadores específicos para o genoma de *M. bovis*, região de diferença (RD) 4, que amplificam um fragmento de 88 pares de base (Mb88). Ambas foram realizadas em um volume final de reação correspondente a 25µL. Desses, a PCR para complexo *M. tuberculosis* continha três µL de DNA, 12,5µL de RealQ PCR 2x Master Mix (Amplicon, Dinamarca), 7,5µL de iniciadores e 2µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM).

A segunda reação, Mb88, foi executada apenas nas amostras que não tiveram amplificação em 1081 e era composta de 12,5µL de RealQ PCR 2x Master Mix (Amplicon, Dinamarca), 5µL de iniciadores 2µL de MgCl<sub>2</sub> (25nM) e 2,5µL de água. As sequências iniciadoras e as sondas utilizadas na qPCR estão descritas na tabela 1.

Os ciclos da PCR foram compostos de aquecimento a 50°C durante dois minutos, seguido 95°C por 10 minutos, 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto.

Foram consideradas positivas amostras que apresentaram amplificação em CT menor ou igual a 42 em pelo menos uma das reações. A amostra de referência *M. bovis* AN5 (CASTELÃO et al., 2014) foi utilizada em todas as reações como controle positivo. Além disso, controle do processo de extração de DNA, composto apenas dos reagentes utilizados na extração do DNA também foi utilizado em todas as reações, com o objetivo de demonstrar não ter ocorrido contaminação cruzada durante o processo de extração de DNA das amostras clínicas.

Tabela 1: Sequências iniciadoras, concentrações, tamanhos dos fragmentos amplificados e alvos dos oligonucleotídeos utilizados nas PCR em tempo real.

Oligonucleotídeos	Sequências iniciadoras	Concentrações (nM)	Tamanho dos fragmentos (bp)	Alvos
Mbo.IS1081.124.F	5'AGGAACGCCTCAACCGAGAAG3'	600		
Mbo.IS1081.124.R	5'CCTTCGATCCATTCGTCGTG3'	600	124	<i>IS1081</i>
Mbo.IS1081.124.S	5'FAM-CGACGCCGAACCGACGTCGTC-IowaBlack1.3'	300		
Mbo.RD4.88.F	5'CGCCTTCCTAACCAGAATTG3'	600		
Mbo.RD4.88.R	5'GGAGAGCGCCGTTGTAGG3'	600	88	Region of Difference (RD) 4
Mbo.RD4.88.S	5'FAM-AGCCGTAGTCGTGCAGAAGCGCA-IowaBlack1.3'	300		

#### 3.4.4. ELISA IDEXX®

Os testes sorológicos ELISA IDEXX®, aplicados em todos os soros correspondentes às carcaças de onde se obtiveram amostras para PCR e isolamento, foram realizados conforme recomendações do fabricante (Mycobacterium Bovis Antibody Test Kit IDEXX™, Estados Unidos). Todas as etapas da prova foram realizadas em temperatura ambiente, variando de 18°C a 26°C.

#### 3.4.5. Análises Estatísticas

Para avaliar o desempenho dos testes diagnósticos foram, estimadas a sensibilidade e a especificidade clínicas e prováveis correlações entre os testes por meio de modelo Bayesiano de classe latente, utilizando-se o programa WinBUGS versão 1.4 (DENDUKURI & JOSEPH, 2001; BRASCUM et al., 2005; MENTEN et al; 2008).

Para as amostras obtidas entre 2010 e 2011, foi utilizado o modelo com dois testes e uma população. Nesta análise, foram realizadas 100000 iterações, com aquecimento de 5000, sendo duas cadeias, uma com valores iniciais informados pelo modelo e outra com valores iniciais gerados pelo programa. Foram tomadas iterações a cada dez valores gerados pelo modelo a fim de evitar correlação entre os mesmos.

Para as amostras de 2012 a 2013, foi utilizado o modelo para uma população e três testes diagnósticos (modelo 1).

A correlação entre os testes foi analisada pelo modelo de efeitos fixos, com testes tomados aos pares (DENDUKURI & JOSEPH, 2001; MENTEN et al; 2008), sendo ELISA e qPCR (modelo 2), qPCR e isolamento (modelo 3) e isolamento e ELISA (modelo 4). *Prioris* não-informativas [modelo (Beta 1,1)] foram utilizadas para todos os parâmetros analisados, em todos os modelos, exceto para a especificidade do isolamento bacteriano, para o qual foi informado valores correspondentes a 100% (CORNER, 1994; THACKER et al, 2011).

Optou-se pelos modelos com distribuições *a priori* não-informativas por considerar-se que os dados poderiam fornecer informações suficientes para estimar os parâmetros de interesse satisfatoriamente e que havia escasso conhecimento prévio a respeito do desempenho dos testes em questão que pudessem ser utilizados como *prioris* informativas.

A avaliação dos modelos foi realizada pelo *Deviance Information Criterion* (DIC) (SPIEGELHALTER et al., 2002).

### 3.5. RESULTADOS

Um total de 527 amostras encaminhadas entre os anos de 2010 e 2011 foram submetidas somente ao isolamento bacteriano e ao ELISA. Não foi possível obter isolamento em 89 dessas amostras, consideradas impróprias devido ao alto grau de contaminação. Não obstante do total de amostras sem isolamento, das quais 78 resultaram negativas e 11 positivas no teste ELISA IDEXX®. Das 438 amostras não contaminadas, foi possível isolar o *M. bovis* em 328 delas (74,88%). Nesse grupo de amostras 88 foram positivas no ELISA. Das 110 amostras de onde não se recuperou *M. bovis*, seis foram positivas no ELISA. As demais, 104, foram negativas em ambas as provas (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados do teste ELISA e do isolamento bacteriano em amostras com lesão sugestiva de tuberculose, encaminhadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) entre 2010 e 2011.

		Isolamento		
		POS	NEG	
ELISA	POS	88	06	94
	NEG	240	104	344
TOTAL		328	110	438

Cento e trinta e quatro amostras, encaminhadas entre 2012 e 2013, foram submetidas aos testes de isolamento e identificação, ELISA IDEXX® e PCR em tempo real. daquelas, oito apresentaram contaminação e foram consideradas impróprias para o isolamento. Obteve-se resultado negativo para qPCR em todas elas e apenas uma apresentou resultado positivo no ELISA IDEXX®.

Os resultados de outras 126 amostras não contaminadas são apresentados na tabela 3. *M. bovis* foi isolado de 89 amostras. Vinte e quatro amostras apresentaram resultado positivo no ELISA, e 62 amostras foram positivas na qPCR.

Todos os quatro modelos utilizados para avaliar três testes diagnósticos apresentaram valores de DIC muito próximos entre si (Tabela 5).

Estimativas dos parâmetros de validação, com respectivos intervalos de credibilidade de 95%, são apresentados nas tabelas 4 e 5. Estimativas de sensibilidade do isolamento e identificação mostraram-se muito próximas para todos os modelos utilizados, aproximadamente 96%. O teste ELISA IDEXX™ apresentou sensibilidade e especificidade de aproximadamente 25% e 93% respectivamente.

A estimativa da sensibilidade da qPCR foi de aproximadamente 64% e especificidade de 91%, exceto para o modelo 2, no qual se obteve estimativa de sensibilidade de 88%.

Tabela 3 – Resultados do isolamento bacteriano, ELISA IDEXX™ e qPCR em amostras com lesão sugestiva de tuberculose, encaminhadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) entre 2012 e 2013.

Teste	Isolamento	ELISA IDEXX™	qPCR	Nº. de observações
Resultado	POS	POS	POS	18
	POS	POS	NEG	04
	POS	NEG	POS	40
	POS	NEG	NEG	27
	NEG	POS	POS	0
	NEG	POS	NEG	02
	NEG	NEG	POS	04
	NEG	NEG	NEG	31
Total				126

POS – positivo, NEG – negativo

Tabela 4 – Estimativas dos parâmetros de desempenho do isolamento bacteriano e do teste ELISA IDEXX™ em amostras com lesões sugestivas de tuberculose encaminhadas pelo Serviço de Inspeção Federal entre 2010 e 2011.

Parâmetros	Estimativas a <i>posteriori</i>	IC 95%	DIC
SE isolamento	95,87%	88,60% - 99,78%	21,617
SP isolamento	100,0%	99,67% - 100,0%	
SE ELISA	26,66%	22,07% - 31,59%	
SP ELISA	96,50%	90,28% - 100,0%	
Freq. infectados	80,0%	72,52% - 84,51%	

DIC – *deviance information criterion*, IC – intervalo de credibilidade para 95%, SE – sensibilidade, SP - especificidade

Tabela 5 – Estimativas dos parâmetros de desempenho de isolamento bacteriano, ELISA IDEXX®, qPCR, e prováveis correlações entre os testes em amostras com lesões sugestivas de tuberculose encaminhadas pelo Serviço de Inspeção Federal dentre 2012 e 2013.

Parâmetros	Modelo 1		Modelo 2 (cov. ELISA x qPCR)		Modelo 3 (cov. qPCR x isolamento)		Modelo 4 (cov. Isolamento x ELISA)	
	mediana	IC 95%	mediana	IC 95%	mediana	IC 95%	mediana	IC 95%
SE isolamento	96,18%	87,42% – 99,84%	95,88%	86,66% - 99,82%	93,63%	71,58% – 99,69%	96,97%	87,94% – 99,9%
SP isolamento	100,0%		100,0%		100,0%		100,0%	
SE ELISA	24,71%	16,53% – 34,10%	25,15%	17,12% - 34,66%	23,98%	16,14% – 33,85%	25,17%	17,19% – 34,54%
SP ELISA	93,40%	81,74% – 99,14%	93,05%	80,12% - 99,26% %	94,02%	72,95% – 99,62%	93,37%	81,41% – 99,14%
SE qPCR	64,46%	54,26% – 73,80%	64,69%	54,70% - 73,98%	61,71%	47,59% – 72,13%	64,55%	54,59% – 74,09%
SP qPCR	91,71%	77,92% – 99,49%	91,43%	76,41% - 99,68%	88,82%	50,17% – 99,03%	90,78%	77,1% – 99,31%
rho.D*	---	---	0,1729	-0,02583 – 0,3368	0,1732	-0,09932 – 0,5295	-0,00845	-0,2467 – 0,1542
rho.Dc*	---	---	0,05189	-0,1256 – 0,4836	0,02492	-0,00975 – 0,1318	0,03464	-0,0043 – 0,1579
Freq. infectados	72,93%	63,92% – 81,27%	73,36%	64,04% - 83,03%	75,32%	65,14% – 97,29%	72,64%	63,61% – 80,88%
DIC	37,788		36,836		38,354		37,83	

DIC – *deviance information criterion*, IC – intervalo de credibilidade para 95% de confiança, rho.D/rho.Dc – proporção do máximo valor do limite superior da covariância condicional, SE – sensibilidade, SP – especificidade.

Em nenhum dos modelos analisados (modelo 2, modelo 3 e modelo 4) foi evidenciada dependência condicional entre os três testes avaliados, visto que o valor zero estava incluído no intervalo de credibilidade de 95% (Tabela 5).

A frequência de infectados, estimada a partir das amostras analisadas, foi maior nas amostras de 2010 a 2011, que variaram de 72,5% a 84,5%. Nas amostras de 2012 a 2013, essa frequência foi ligeiramente inferior, estimada em aproximadamente 73%.

Os parâmetros de desempenho estimados pelos diferentes modelos foram muito próximos, confirmando haver informações suficientes somente nos dados para estimar os parâmetros de desempenho dos testes satisfatoriamente, apesar dos intervalos de credibilidade relativamente amplos. Analisando-se os valores de DIC, observou-se que não houve nenhuma diferença maior que dois, demonstrando que os modelos 1, 2, 3 e 4 são igualmente adequados aos dados. Após análise de sensibilidade dos modelos, utilizando-se *prioris* informativas e não-informativas, obtiveram-se estimativas qualitativamente bastante próximas para todos os parâmetros avaliados.

### 3.6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram analisadas 661 amostras de lesões sugestivas de tuberculose bovina e correspondentes soros sanguíneos, obtidos a partir da rotina de inspeção sanitária do SIF de onze estados brasileiros. Ressalta-se a diversidade de origem das mesmas, de praticamente todas as regiões brasileiras, e a forma de obtenção.

Esse tipo de amostragem tem a vantagem de possibilitar a ocorrência de resultados variados e de contornar a dificuldade de se obter amostras com lesão sugestiva de tuberculose, oriundas de animais não infectados, necessárias à determinação mais acurada da estimativa da especificidade das provas (AUER & SCHLEEHAUF, 1988). A inobservância deste aspecto pode levar a estimativas superestimadas da especificidade, principalmente quando se utilizam amostras sem lesão como padrão negativo.

O isolamento e a identificação têm sido utilizados como provas confirmatórias para o diagnóstico da tuberculose, desde 1985, no LANAGRO-MG (MOTA, 1985), com otimizações pontuais que objetivaram maior rapidez e confiabilidade dos resultados (SALES et al., 2014a, SALES et al., 2014b). Contudo, o seu desempenho diagnóstico ainda não havia sido avaliado objetivamente em amostras com lesão oriundas do SIF. O ELISA IDEXX™, inicialmente utilizado como teste *ante-mortem* (WATTERS et al., 2011; ISSA et al., 2016), foi avaliado pela primeira vez em amostras de soros de bovinos abatidos, coletadas pelo SIF, neste trabalho.

A partir de 2012, foi introduzida na rotina de diagnóstica do LANAGRO-MG uma qPCR, desenvolvida *in house*, a qual tornou-se objeto de avaliação juntamente com os demais testes a partir daquele ano. Por este motivo, foram utilizados dois conjuntos de amostras visto que a técnica de qPCR ainda não se encontrava disponível para uso na rotina diagnóstica até o ano de 2012 e não havia amostras de anos anteriores armazenadas que pudessem ser utilizadas retroativamente para essa avaliação.

O crescimento de microrganismos em decorrência de contaminação de amostras contaminadas é uma desvantagem do diagnóstico bacteriológico, podendo inviabilizá-lo (CORNER et al., 2012). Das 661 amostras submetidas ao isolamento e identificação, não foi possível obter resultados de 97 (14,67%) delas devido a sua contaminação. Entretanto, 12 dessas amostras foram positivas ao teste sorológico e 86, negativas.

Devido à alta especificidade dessa prova, é possível que aquelas amostras sejam oriundas de animais realmente infectados por *M. bovis*. A baixa sensibilidade, por outro lado, não permite descartar a infecção nas amostras negativas. Essa situação demonstra aplicabilidade de testes complementares, baseados em princípios diferentes, para contornar situações nas quais não é possível obtenção de resultados em um dos testes devido, a fatores extrínsecos a ele.

A comparação de testes confirmatórios para a tuberculose bovina é feita de forma direta, normalmente, utilizando-se o isolamento e a identificação como “padrão-ouro”. Entretanto, as limitações relativas à sensibilidade do teste e o uso inapropriado de padrões negativos podem levar a interpretações equivocadas dos resultados (AUER & SCHLEEHAUF, 1988; MEDEIROS et al., 2010; CORNER et al., 2012). Porcentagens de isolamento em relação ao total de amostras, com ou sem lesão, utilizadas nos estudos de validação são reportadas por alguns autores (ARAÚJO et al., 2014a; ARAÚJO et al., 2014b; CARVALHO et al., 2015). Utilizando-se a metodologia do LANAGRO-MG, foi possível isolar *M. bovis* de 74% das amostras encaminhadas, em relação ao total de amostras que não foram descartadas por excesso de contaminação, valor consideravelmente superior aos relatados em outros estudos que utilizaram amostras semelhantes e procedimentos diferentes de conservação, transporte, descontaminação de amostras e diferentes metodologias de recuperação de bactérias viáveis (TABOSA et al., 2000; ARAÚJO et al., 2014a; ARAÚJO et al., 2014b; ALZAMORA FILHO et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

Diante da inexistência de padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose, optou-se pela análise Bayesiana com modelo de classe latente, por permitir avaliação de testes diagnósticos comparando-se, inclusive, o desempenho de testes primários como o isolamento e a identificação do agente (REITSMA et al., 2009; COURCOUL et al., 2014). Apesar de recomendada pela OIE, esta metodologia ainda é pouco empregada na avaliação de métodos confirmatórios de diagnóstico da tuberculose (COURCOUL et al., 2014; PRINCIPLES..., 2016), sendo entretanto, utilizada para outras enfermidades infecciosas (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2010; MATOPE et al., 2011; VERDUGO et al., 2014).

De acordo com os modelos utilizados, o isolamento e a identificação do agente mostraram-se mais sensíveis e específicos quando comparados ao ELISA IDEXX™ e à qPCR, cuja maior sensibilidade, encontrada nesse estudo, pode se dever à presença de lesão sugestiva de tuberculose e frequência de animais infectados, à qualidade das amostras encaminhadas para análise, ao encaminhamento congelado ou refrigerado das mesmas sem o uso de conservantes como borato de sódio, à seleção de porções da amostra onde seria mais provável de encontrar microrganismos viáveis, à quantidade de amostra processada (3 a 5 gramas), à utilização de solução com forte atividade tamponante como neutralizador do descontaminante, ao uso de meios de cultura de bases diferentes e à temperatura de incubação (MOTA, 1985; CORNER, 1994; ISSA et al., 2016). Outros trabalhos já haviam relatado maior sensibilidade do isolamento em relação à PCR, à exceção da *nested* PCR, que se mostrou mais sensível, apesar do maior risco de ocorrência de contaminação cruzada (LIEBANA et al., 1995; PARRA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2014a; ARAÚJO et al., 2014b; CARVALHO et al., 2015).

Ressalta-se maior sensibilidade da qPCR em relação ao isolamento e identificação (COURCOUL et al., 2014). Entretanto, esses autores utilizaram lise mecânica dos tecidos e separação magnética do DNA microbiano, fatores aparentemente relevantes para a diferença observada entre os estudos, dado que a extração do DNA bacteriano das lesões é ponto crítico para a sensibilidade da PCR em amostras clínicas (LIEBANA et al., 1995; TAYLOR et al., 2007; COURCOUL et al., 2014).

O maior número de cópias da sequência de inserção (IS) 1081 no DNA do *M. bovis* em relação ao número de cópias de outras ISs, também utilizadas com essa finalidade como IS 6110, poderia ser um fator que favorecesse a sensibilidade da qPCR em estudo, mas a provável presença de inibidores de PCR presentes nas amostras e a grande quantidade de DNA eucarioto podem ter contribuído negativamente para reduzir, tanto a sensibilidade quanto a especificidade da prova. Os testes sorológicos para a tuberculose têm baixa sensibilidade ou sensibilidade variável quando utilizados como provas *ante-mortem* (SCHILLER et al., 2010; WATTERS et al., 2011; VIDAL, 2013; CASAL et al., 2014).

A sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos para a tuberculose são dependentes do tipo de antígeno utilizado, da fase em que se encontra a enfermidade, do tipo de resposta imune predominante montada pelo animal e da exposição prévia à PPD (HARBOE et al., 1990; SILVA, 2001; LYASHCHENKO et al., 2004).

A utilização do teste como diagnóstico *post mortem*, em amostras oriundas de animais com lesões sugestivas de tuberculose, demonstrou baixa sensibilidade e especificidade elevada. Animais previamente tuberculinizados apresentam resposta sorológica anamnésica detectável no teste (HARBOE et al., 1990; CASAL et al., 2014), entretanto, isto não seria esperado para animais de abate uma vez que a grande maioria deles não deve ser previamente tuberculinizada, a não ser nos casos de abate sanitário. O estágio mais avançado da enfermidade, ao ponto de serem encontradas lesões, é correlacionado a resposta imune humoral (POLLOCK & NIELL, 2002), mas este fato também parece não ter influenciado positivamente a sensibilidade do teste ELISA.

A alta especificidade do teste pode ser explicada pela composição de antígenos presentes no ELISA IDEXX™, principalmente a proteína MPB70, predominantemente de *M. bovis* (WIKER, 2009).

Não seria esperado encontrar covariância entre o teste sorológico e os demais testes avaliados uma vez que são baseados em princípios biológicos diferentes (GARDNER et al., 2000). Por outro lado, tanto a qPCR quanto o isolamento e a identificação buscam demonstrar a presença do material genético do *M. bovis* ou os próprios microrganismos viáveis, respectivamente, nas lesões sugestivas (COURCOUL et al., 2014). A correlação entre os dois testes já foi relatada previamente (COURCOUL et al., 2014), mas não foi confirmada neste trabalho. Essa diferença pode ser devida à forma como foram obtidas amostras para os testes de qPCR e isolamento.

No primeiro caso, as amostras foram coletadas do centro da lesão caseosa, onde se espera existir maior quantidade de material genético bacteriano e poucas bactérias viáveis (LANAGRO-MG, dados não publicados). Para o isolamento, por outro lado, as amostras foram coletadas da interface entre o tecido sadio e a lesão, onde se espera existir maior quantidade de bactérias viáveis, contudo, com menor quantidade de material genético bacteriano para PCR (MOTA, informação pessoal).

De acordo com os critérios adotados, os modelos mostraram-se igualmente adequados aos dados utilizados nas análises (SPIEGELHALTER et al., 2002). As análises de sensibilidade do modelo para dois testes e do modelo 1 para três testes sem correlação foram realizadas utilizando-se *prioris* informativas para todos os parâmetros (GARDNER et al., 2000). As estimativas obtidas para cada parâmetro foram qualitativamente muito semelhantes entre si (LANAGRO-MG, dados não-apresentados), demonstrando robustez dos modelos.

O conhecimento dos parâmetros de desempenho dos testes diagnósticos é essencial para o seu uso, de acordo com a finalidade a que se destinam, de forma que se possa obter resultados confiáveis (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2010; PRINCIPLES..., 2016). Deve-se considerar também a facilidade de execução, os custos e os riscos relacionados ao uso de cada um deles. A técnica de isolamento e identificação, apesar de mais sensível e específica que as demais, é a mais trabalhosa, demorada, cara e a que apresenta maior risco para o operador. Em contrapartida, o material isolado pode ser utilizado como matéria-prima para estudos epidemiológicos, desenvolvimento e produção de antígenos e testes diagnósticos indiretos, desenvolvimento e produção de imunógenos.

Por esta razão, o isolamento e identificação deveria ser utilizado em situações bem definidas como em achados de lesões sugestivas de tuberculose em rebanhos livres ou provenientes de áreas de baixa prevalência da doença.



A baixa sensibilidade apresentada pela qPCR é um fator limitante ao seu emprego. Entretanto, por se tratar de uma técnica rápida, relativamente barata e que apresenta baixo risco de contaminação dos operadores e do ambiente, poderia ser recomendada em situações de prevalência mais alta ou ser utilizada em paralelo com outras provas como a sorologia.

O teste ELISA IDEXX™ foi capaz de detectar oito amostras positivas, não detectadas nos demais testes, apesar da sua baixa sensibilidade. A capacidade de identificar esse tipo de amostra pode ser relevante em situações de baixa prevalência da enfermidade quando a detecção de animais infectados torna-se mais difícil e onerosa, mas necessária para que haja o avanço das ações sanitárias no sentido da erradicação da enfermidade.

### 3.7. CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### 3.8. REFERÊNCIAS

ALZAMORA FILHO, F.; REIS, V.M.; FEHLBERG, I.; *et al.*. Identificação de *Mycobacterium bovis* em carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.66, n. 5, p. 1585 – 1591, 2014.

ARAÚJO, C.P.; OSÓRIO, A.L.A.R.; JORGE, K.S.G. *et al.*. Direct detection of *Mycobacterium bovis* complex in bovine and bubaline tissues through nested-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 633 – 640, 2014a.

ARAÚJO, C.P.; OSÓRIO, A.L.A.R.; JORGE, K.S.G. *et al.*. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. *PLOS ONE*, v. 9, n. 3, e91023, 2014.

AUER, L.A; SCHLEEHAUF, S.M. Antibodies to Mycobacteria in cattle not infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*, v. 18, n. 1, p. 51-61, 1988.

BOVINE tuberculosis. 2016. In: MANUAL of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: World Organization for Animal Health, 2016. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.07\\_BOVINE\\_TB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf)> Acessado em 21-09-2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Norma Interna SDA Nº. 02, de 30 de abril de 2012.* Disponível em <[http://www.google.com.br/url?url=http://www.dda.agricultura.rs.gov.br/ajax/download.php%3FqArquivo%3D20130425112834norma\\_interna\\_02\\_sda\\_2012.pdf&ret=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ved=0ahUKEwju\\_4Le6ZrMAhXITZAKHXHcDXsQFggUMAA&usg=AFQjCNHzbUfKUme-3PB9lqfItLnd6wrDNw](http://www.google.com.br/url?url=http://www.dda.agricultura.rs.gov.br/ajax/download.php%3FqArquivo%3D20130425112834norma_interna_02_sda_2012.pdf&ret=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ved=0ahUKEwju_4Le6ZrMAhXITZAKHXHcDXsQFggUMAA&usg=AFQjCNHzbUfKUme-3PB9lqfItLnd6wrDNw)>. Acessado em: 19/04/2016.

BRASCUM, A.J.; GARDNER, I.A.; JOHNSON, W.O. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 68, n. 2-4, p. 145 – 163, 2005.

CARVALHO, R.C.T.; FURLANETO, L.V.; MARUYAMA, F.H. *et al.*. Evaluation of the efficiency of nested q-PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex directly from tuberculosis-suspected lesions in *post-mortem* macroscopic inspections of bovine carcasses slaughtered in the state of Mato Grosso, Brasil. *Meat Science*, v. 106, p. 11 – 15, 2015.

- CASAL, C.; DÍEZ-GUERRIER, A.; ÁLVAREZ, J. *et al.*. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Veterinary Microbiology*, v. 170, n. 3-4, p. 342 – 351, 2014.
- CASTELÃO, A.B.C.; NISHIBE, C.; MOURA, A. *et al.*. Draft genome sequence of *Mycobacterium bovis* strain AN5, used for production of purified protein derivative. *Genome*, v.2, n.2, e00277-14, 2014.
- CLEGG, T.A.; DUIGNAN, A.; WHELAN, C. *et al.*. Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the  $\gamma$ -interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Veterinary Microbiology*, v. 151, n. 1-2, p. 68 – 75, 2011.
- CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 40, n. 1-2, p. 53-63, 1994.
- CORNER, L.A.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D.U. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* in tissues: conditions for maximizing the number of positive cultures. *Veterinary Microbiology*, v. 156, n. 1 -2, p. 162 – 171, 2012.
- COURCOUL, AL; LOYEN, J-L.; BRUGÈRE, L. *et al.*. Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology, histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis using latent class analysis. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, e90334, 2014.
- COUSINS, D.V. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Reveu Scientifique et Technique de l'Office International des. Epizooties*. v. 20, n. 1, p. 71 – 85, 2001.
- COSTA, P.; FERREIRA, A.S.; AMARO, A. *et al.*. Enhanced detection of tuberculous mycobacteria in animal tissues using a semi-nested probe-based real-time PCR. *Plos 1.*, v. 8, n. 11, e81337, 2013.
- DENDUKURI, N.; JOSEPH, L. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics*, v.57, n. 1, p. 158–167, 2001.
- ENØE, C.; GEORGIADIS, M.P.; JOHNSON, W.O. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 45, n. 1-2p. 61-81, 2000.
- ESCOPO da acreditação - ABNT NBR ISO/IEC 17025 – ensaio. 2016. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rble/docs/CRL0350.pdf>> Acessado em: 10/12/2016
- GARDNER, I.A.; STYHN, H.; LIND, P.; COLLINS, M.T. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 45, n. 1-2, p. 107 – 122, 2000.
- HARBOE, M.; WIKER, H.G.; DUNCAN, R. *et al.*. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 25, n. 5, p. 913 – 921, 1990.
- HUMPHREY, H.M.; ORLOSKI, K.A.; OLEA-PPELKA, J. Bovine tuberculosis slaughter surveillance in the United States 2001-2010: assessment of its traceback investigation function. *BMC Veterinary Research*, v. 10, n. 1, p. 1 - 10, 2014.

- ISSA, M.A.; SOARES FILHO, P.M.; FONSECA JÚNIOR, A.A.; HODON, M.A.; SANTOS, L.C.; REIS, J.K.P.; LEITE, R.C.L. Comparative study of mycobacterium bovis primary isolation methods. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 1, p. 139 – 144, 2016.
- KANEENE, J.B.; MILLER, R.A.; MEYER, R.M. Abattoir surveillance: the U.S. experience. *Veterinary Microbiology*, v. 112, n. 2-4, p. 273 – 282, 2006.
- LIEBANA, E.; ARANAZ, A.; MATEOS, A. *et al.*. Simple and rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 1, p. 33 – 36, 1995.
- LIMMATHUROTSAKUL, D.; JANSEN, K.; ARAYAWICHANONT, A. *et al.*. Defining the true sensitivity of culture for the diagnosis of melioidosis using Bayesian latent class models. *PLOS ONE*, v. 5, n. 8, e12485, 2010.
- LoBUE, P. Public health significance of M. bovis. In: THOEN, C.O; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. (Eds.) *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Iowa, USA: Blackwell, 2006. p. 6-12.
- LYASHCHENKO, K.; WHELAN, A.O.; GREEWALD, R. *et al.*. Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 5, p. 2462 – 2467, 2004.
- MATOPE, G.; MUMA, J.B.; TOFT, N. *et al.*. Evaluation of sensitivity and specificity of RBT, c-ELISA and fluorescence polarization assay for diagnosis of brucellosis in cattle using latent class analysis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 14, n. 1-2, p. 58 – 63, 2011.
- MEDEIROS, L. S.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E. E. S. *et al.* Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brasil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822010000300002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822010000300002)>. Acessado em: 01/08/2013.
- MENDES, R.E.; SCHNEIDER, A.F.; WERLICH, D.E. *et al.*. Estudo anatomopatológico em tecidos condenados pelo serviço de inspeção federal (SIF) por suspeita de tuberculose. *Ciência Animal Brasileira*, v. 14, n. 4, p. 448 – 453, 2013.
- MENTEN, J.; BOELART, M.; LESAFFRE, E. Bayesian latent class models with conditionally dependent diagnostic tests: a case study. *Statistics in Medicine*, v. 27, n. 22, p. 4469 – 4488, 2008.
- MOTA, P.M.P.C. *Estudo da esofagostomose como fator predisponente de reações alérgicas inespecíficas no diagnóstico da tuberculose bovina*. 1985. 70f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gérias, Belo Horizonte, MG.
- NGANDOLO, B.N.R.; MÜLLER, B.; DIGIMBAYE-DJAÏBR, C. *et al.*. Comparative assessment of fluorescence polarization and tuberculin skin testing for the diagnosis of bovine tuberculosis in Chadian cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 89, n. 1-2, p. 81 – 89, 2009.
- NTZOUFRAS, L. *Bayesian modeling using WinBUGS*. Athens. Greece: Willey, 2009, 492p.

PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A. *et al.*. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v. 127, n. 3-4, p. 315 – 324, 2008.

POLLOCK, J.M.; NIELL, D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*, v. 160, n. 2, p. 115 – 127, 2002.

PRINCIPLES and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: MANUAL of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: World Organization for Animal Health, 2016. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/1.01.05\\_VALIDATION.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf)> Acessado em 21-09-2016.

PROGRAMA nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal. 2006, 188p. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Animal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Animal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf)> Acessado em: 19/04/2016.

REITSMA, J.B.; RUJTES, A. W.S.; KHAN, K.S. *et al.* A review of solutions for diagnostic accuracy studies with an imperfect or missing reference standard. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 62, n. 8, p. 797-806, 2009.

SALES, M.L.; FONSECA JUNIOR, A. A.; ORZIL, L. *et al.*. Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, n. 2, p. 4607-4616, 2014a.

SALES, M.L.; FONSECA JUNIOR, A.A.; SALES, E.B.; COTORELLO, A.C.P.; ISSA, M.A.; HODON, M.A.; SOARES FILHO, P.M.; RAMALHO, A.K.; SILVA, M.R.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. *Folia Microbiologica*, v. 59, n. 5, p. 433-438, 2014.

SCHILLER, I.; OESCH, B.; VORDERMEIER, H.M. *et al.* Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 57, n. 4, p. 205-220, 2010.

SILVA, E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v. 78, n. 2, p. 117 – 117, 2001.

SPIEGELHALTER, D.J.; BEST, N.G.; CARLIN, B.P.; van der LINDE, A. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistic Society B.*, v. 64, n. 4, p. 583 – 639, 2002.

SOUZA, M.R.S. *Estimação da sensibilidade e especificidade de testes diagnósticos da brucelose bovina via inferência bayesiana*. 2013. 63f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, MG.

SOUZA, I.I.F.; MELO, E.S.P.; RAMOS, C.A.N. *et al.*. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA of bovine tuberculosis. *SpringerPlus*, v. 1, n.1, p. 77-83, 2012.

TABOSA, I.M.; TRINDADE, V.M.; VALE, G.M.G. *et al.*. Ocorrência de tuberculose em bovinos abatidos no matadouro municipal de Patos – PB – Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 7, n. 1, p. 61 – 62, 2000.

TAMMEMAGI, L.; SIMMONS, G.C.; KELMAN, R.; HALL, W.T.K. A study of tuberculosis-like lesions in cattle slaughtered in Queensland meatworks. *Australina Veterinary Journal*, v. 49, n. 11, p. 507 – 511, 1973.

THACKER, T.C.; HARRIS, B.; PALMER, M.; WATTERS, W.R. Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissue using IS6110 real-time PCR. *BMC Veterinary Research*, v.7, n. 50, p. 2 – 5, 2011. doi: 10.1186/1746-6148-7-50

TAYOR, M.G.; WORTH, D.R.; PALMER, S. *et al.*. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Veterinary Research*, v. 3, n. 12, 2007.

VERDUGO, C.; JONES, G.; JOHNSON, W. *et al.*. Estimation flock/herd-level true *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prevalence on sheep, beef cattle and deer farms in New Zealand using a novel Bayesian model. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 117, n. p. 447 – 455, 2014.

VIDAL CES *Testes diagnósticos para detecção de bovinos infectados por Mycobacterium bovis*. 2013. 89f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal de Santa Maria, RS.

WATTERS, W.R.; BUDDLE, B.M.; WORDERMEIER, H.M. *et al.*. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 18, p. 1882-1888, 2011.

WHELAN, C.; SHURALEV, E.; O'KEEFE, G. *et al.*. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 15, n. 12, p. 1834 – 1838, 2008.

WIKER, H.G. MPB70 and MPB83 – major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 69, n. 6, p. 492 – 499, 2009.

ZINSSTAG, J.; SCHELLING, E.; ROTH, F.; KAZWALA, R. *Economics of bovine tuberculosis*. In: THOEN, C.O; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. (Eds.) *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Iowa, USA: Blackwell, 2006, p. 84-88.

#### **4 CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DE UM TESTE ELISA COMERCIAL E DO TESTE DE TUBERCULINIZAÇÃO CERVICAL COMPARATIVA (TCC) PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA EM REBANHOS EM DIFERENTES FASES DO CONTROLE DA ENFERMIDADE E DIFERENTES PREVALÊNCIAS**

##### **4.1. RESUMO**

O diagnóstico da tuberculose bovina é baseado principalmente na resposta imune celular, sendo a tuberculinização o teste mais utilizado em todo o mundo. A resposta imune humoral é bastante variável e os testes sorológicos apresentam desempenho diagnóstico inferior ao dos testes de base celular. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho diagnóstico do teste de tuberculinização cervical comparativa e do teste ELISA para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*® - IDEXX em rebanhos leiteiros sabidamente tuberculosos em diferentes fases de controle da enfermidade. Cento e vinte animais de dois rebanhos leiteiros de Minas Gerais foram utilizados. Todos os animais foram submetidos aos dois testes e a análise de dados baseou-se em modelo Bayesiano de classe latente devido à falta de padrão-ouro. O teste ELISA apresentou menor sensibilidade que a tuberculinização cervical comparativa em ambos os rebanhos. A especificidade dos testes foi maior ou igual a 94% em ambos os rebanhos. Os baixos valores encontrados para o índice Kappa indicam haver baixa concordância entre os testes ou mesmo discordância entre eles, corroborando a informação de que esses testes identificam animais em fases distintas da doença. No rebanho onde o processo de saneamento já havia sido iniciado e apresentava menor prevalência de tuberculose, o teste ELISA identificou mesmo número de animais positivos que a tuberculinização cervical comparativa ( $p>0,05$ ), fato não reproduzido no rebanho de maior prevalência, onde aquele teste identificou menor número de animais positivos que a tuberculinização ( $p<0,05$ ), reforçando a maior sensibilidade do teste encontra naquele rebanho. De acordo com os resultados, o teste ELISA não deve ser utilizado em substituição à tuberculinização cervical comparativa, tampouco associados em série com ela. O teste ELISA apresentou melhor desempenho em rebanhos que já se encontravam em saneamento, onde ele deve ser utilizado em paralelo com a tuberculinização cervical comparativa. Em rebanhos nunca tuberculinizados seu uso fica pendente de análise de custo-benefício devido ao pior desempenho nessa condição. Nesse caso, a tuberculinização seria o teste de eleição.

Palavras-chave: tuberculose bovina diagnóstico, tuberculose bovina sorologia, tuberculinização cervical comparativa, teste diagnóstico avaliação

##### **4.2. ABSTRAT**

The diagnosis of bovine tuberculosis is mainly based on the cellular immune response, with tuberculinization being the most widely used test in the world. The humoral immune response is quite variable and the serological tests have lower diagnostic performance than the cellular based diagnostic tests. The objective of the present study was to evaluate the diagnostic performance of the comparative cervical tuberculin test and the ELISA test for the detection of antibodies against *Mycobacterium bovis*™ - IDEXX in *M. bovis* infected dairy herds known to be in different stages of disease control. One hundred and twenty animals from two dairy herds of Minas Gerais were used. All animals were submitted to both tests and data analysis was based on Bayesian latent class model due to the lack of a diagnostic test gold standard. The ELISA test presented lower sensitivity than comparative cervical tuberculinization in both herds. The specificity of the tests was greater than or equal to 94% in both herds. The low values found for the Kappa index indicate that there is low concordance between the tests or even disagreement between them, corroborating the information that these tests identify animals at distinct phases of the disease. In the herd with

lower prevalence, where the tuberculosis control had already started, the ELISA test identified the same number of positive animals as the comparative cervical tuberculinization ( $p > 0.05$ ), a fact not reproduced in the herd with higher prevalence, where that test identified fewer positive animals than tuberculinization ( $p < 0.05$ ), reinforcing the greater sensitivity of the test found in that herd. According to the results, the ELISA test should not be used in substitution for comparative cervical tuberculinization, nor should it be associated in series. The ELISA test presented better performance in herds already in sanitation, where it should be used in parallel with comparative cervical tuberculinization. The use of the ELISA test in herds where tuberculinization has never been performed is dependent on cost-benefit analysis because of its poorer performance in this condition. In these cases, tuberculinization would be the test of choice.

Keywords: bovine tuberculosis diagnosis, bovine tuberculosis serology, comparative cervical tuberculinization, diagnostic test evaluation

### 4.3. INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma zoonose causada pelo *Mycobacterium bovis* com distribuição mundial que oferece considerável risco à saúde pública e provoca reconhecido impacto econômico negativo na atividade pecuária (ZINSSTAG et al., 2006; LoBUE, 2006; SCHILLER et al., 2010; BOVINE..., 2016). Apresenta-se como uma enfermidade crônica de rebanho, com quadros clínicos inespecíficos, e, frequentemente, tem curso assintomático. Por se tratar de uma doença para a qual não se recomenda o tratamento nem existem vacinas comerciais eficazes, seu controle baseia-se na identificação de animais infectados e na sua tempestiva eliminação do rebanho (BRASIL, 2006; de La RUA DOMENECH et al., 2006; BOVINE..., 2016). A correta identificação desses animais é de fundamental importância devido às consequências de resultados falsos positivos, com abate de animais saudáveis, ou de falsos negativos, com a manutenção de animais infectados no rebanho.

De acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), instituído no Brasil em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os testes *in vivo* preconizados para o diagnóstico da tuberculose bovina no país são as tuberculinizações, na prega caudal e as cervicais simples ou comparativa (BRASIL, 2006). Esses testes, baseados na resposta imune celular do indivíduo frente a tubérculo-proteínas presentes no alérgeno, são amplamente utilizados no diagnóstico da tuberculose há mais de 100 anos (MONAGHAN et al., 1994; BOVINE..., 2016). Apesar disso, há imperfeições diagnósticas devido a características de desempenho intrínsecas a eles, o que compromete o saneamento de rebanhos (de la RUA-DOMENECH et al., 2006; LOPES et al., 2012; CASAL et al., 2014). Nesses casos, faz-se necessário o emprego de testes diagnósticos complementares à tuberculinização para identificar corretamente o maior número de animais infectados, sem contudo, eliminar número significativo de animais saudáveis, concorrendo para um processo de saneamento mais rápido, barato e seguro. Destacam-se, nesse aspecto, testes sorológicos (ensaios imunoenzimáticos adsorventes – ELISAs e polarização fluorescente – FPA) e testes baseados na detecção e quantificação *in vitro* de interferon gama (JOLLEY et al., 2007; MEDEIROS et al., 2010; SCHILLER et al., 2010).

Os testes baseados na detecção de interferon gama apresentam boa sensibilidade e têm a capacidade de detectar animais em fase inicial da enfermidade, quando ainda não é possível fazê-lo pela tuberculinização. No entanto, a especificidade do teste e o intervalo entre a coleta das amostras e o seu processamento podem limitar seu uso na rotina diagnóstica (GORMLEY et al., 2006).

Os ELISAs também têm a capacidade de identificar animais em fases distintas da enfermidade, dependendo, principalmente, dos antígenos utilizados na prova (SILVA, 2001; SOUZA et al.,

2012). O kit para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis* (IDEXX®) é um ELISA recomendado pela OIE, que utiliza como antígenos adsorvidos na fase sólida as proteínas MPB70 e MPB83 (WATERS et al., 2011; SOUZA et al., 2012). Por se tratar de um teste sorológico, não apresenta os mesmos inconvenientes logísticos dos testes baseados na detecção do interferon gama, além de serem mais simples de serem executados. Apesar dessas vantagens, são relatadas disparidades na sensibilidade clínica do teste (WATERS et al., 2011; TROST et al., 2016), necessitando, portanto, ser avaliado nas condições de uso e finalidades pretendidas. Sob esse aspecto, a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) recomenda que os testes diagnósticos sejam avaliados quanto ao propósito a que se destinam no país ou região onde serão utilizados (PRINCIPLES..., 2016). Para isso, devem ser empregadas metodologias adequadas de modo que sejam gerados parâmetros de validação confiáveis (REITSMA et al., 2009, SCHILLER et al., 2010).

A inexistência de padrão-ouro dificulta a validação clínica de métodos diagnósticos para a tuberculose bovina, já que nenhum teste é 100% sensível ou específico (CLEGG et al., 2011; ÁLVAREZ et al., 2012; LOPES et al., 2012). A melhor alternativa nestes casos é utilizar metodologia baseada em modelos bayesianos de classe latente, partindo-se de informações prévias sobre os testes, conjugadas com informações geradas pelos dados coletados (ENØE et al., 2000; REITSMA et al., 2009), que permitem estimar as probabilidades *a posteriori* dos parâmetros de interesse, quais sejam: sensibilidade e especificidade.

Além disso, abordagens frequentistas, como o índice *kappa*, o teste binomial ou o qui-quadrado de McNemar, podem complementar a análise Bayesiana fornecendo informações adicionais a serem incorporadas na análise dos dados.

O presente trabalho visou avaliar o desempenho diagnóstico do teste de tuberculinização cervical comparativa e do teste ELISA para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*® - IDEXX em rebanhos leiteiros sabidamente infectados em diferentes fases de controle da enfermidade.

#### 4.4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.4.1. Animais e rebanhos

Foram utilizados animais de dois rebanhos leiteiros localizados nas cidades de Machado (região Sul do estado de Minas Gerais), rebanho 1, e Leopoldina (Zona da Mata mineira), rebanho 2 (Fig. 1), compreendendo um total de 120 animais.

Ambos os rebanhos nunca tinham sido tuberculinizados previamente ou se suspeitava da existência de tuberculose. Após a venda de animais, sem exames prévios nos respectivos rebanhos de origem, foram identificados animais reagentes à PPD nos rebanhos de destino, para onde tinham sido comercializados.

A partir daí o rebanho 1 iniciou os procedimentos de controle da enfermidade. À época da coleta de sangue para a realização desse experimento. O rebanho era constituído de 79 animais da raça holandesa e se encontrava em processo de saneamento há mais de um ano, tendo sido submetido a pelo menos duas tuberculinizações cervicais comparativas prévias, com intervalos de 60 a 90 dias entre cada uma delas, seguidas de remoção de animais positivos, que apresentaram lesões sugestivas de tuberculose ao abate, em ambas ocasiões.

O rebanho 2 era constituído por 41 animais mestiços holandês-zebu (gir) em diferentes graus de sangue. Este rebanho não havia sido submetido a nenhuma tuberculinização prévia e ainda não havia entrado em processo de saneamento até a data de coleta de sangue para realização deste experimento.





Figura 1- Localização dos rebanhos 1 (município de Machado) e 2 (município de Leopoldina).

#### 4.4.2. Prova de tuberculização cervical comparativa (TCC)

As tuberculizações cervicais comparativas foram realizadas por médicos veterinários habilitados pelo serviço oficial de defesa sanitária animal, de acordo com o PNCEBT, utilizando-se lotes de tuberculinas (PPD) aviária e bovina devidamente aprovados pelo MAPA (BRASIL, 2006).

Resumidamente, os locais de inoculação das PPDs foram previamente demarcados por tricotomia, os animais foram inoculados com 0,1mL de PPD aviária e 0,1 mL de PPD bovina no terço médio do pescoço ou na região da espinha da escápula, após mensuração da dobra de pele no local de inoculação utilizando-se cutímetro de mola com escala em décimo de milímetro. Setenta e duas horas após a inoculação das PPDs nova mensuração da dobra de pele foi realizada com o objetivo de averiguar aumento na espessura no local inoculado. Os resultados foram interpretados de acordo com a tabela 1 (BRASIL, 2006; BRASIL, 2016). O critério de interpretação empregado prevê a ocorrência de resultados inconclusivos. Para fins de comparação de testes diagnósticos, utilizando-se tabelas de contingência, é recomendado que animais que apresentem esse tipo de resultado tenham seu real estado sanitário confirmado por outras provas diagnósticas, ou que sejam realizadas análises de dados incluindo-os ora no grupo de animais negativos, ora no grupo de animais positivos, para o teste em questão (SIMEL et al., 1987). Como foi impossível confirmar o real estado sanitário dos animais desse experimento, foram realizadas duas análises distintas devido aos animais inconclusivos encontrados na TCC. Em uma delas eles foram considerados como sendo negativos, e na outra, considerados como sendo positivos na TCC (SIMEL et al., 1987).

Tabela 1 – Interpretação do teste cervical comparativo (TCC) em bovinos de acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT).

	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Interpretação
$\Delta B < 2,0\text{mm}$	-	Negativo
$\Delta B < \Delta A$	$< 0$	Negativo
$\Delta B \geq \Delta A$	0,0 a 1,9	Negativo
$\Delta B \geq \Delta A$	2,0 a 3,9	Inconclusivo
$\Delta B \geq \Delta A$	$\geq 4,0$	Positivo

$\Delta B$  = dobra de pele 72h após inoculação da PPD bovina - dobra de pele antes da inoculação da PPD bovina,  $\Delta A$  = dobra de pele 72h após inoculação da PPD aviária - dobra de pele antes da inoculação da PPD aviária (Fonte: Brasil, 2006; Brasil, 2016).

#### 4.4.3. ELISA IDEXX®

Amostras de sangue total de todos os animais foram coletadas em sistema fechado de coleta de sangue a vácuo, sem anticoagulante, quando da última tuberculinização realizada no rebanho, no momento da inoculação da tuberculina ou três dias após, no momento da leitura da prova. O soro, obtido após coagulação do sangue, foi aliquoteado, identificado univocamente e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das provas sorológicas. A coleta de sangue do rebanho 1 ocorreu de 60 a 90 dias após a penúltima tuberculinização.

Os testes sorológicos ELISA IDEXX® para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*, aplicados em todas as amostras de soros correspondentes aos animais tuberculinizados (TCC), foram realizados conforme recomendações do fabricante (Mycobacterium Bovis Antibody Test Kit IDEXX™). Todas as etapas da prova foram realizadas em temperatura ambiente variando de  $18^{\circ}\text{C}$  a  $26^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar o desempenho dos testes diagnósticos foram estimadas a sensibilidade e a especificidade clínicas por meio de modelo Bayesiano de classe latente, inicialmente com dois testes e dois rebanhos e, posteriormente, com dois testes e um rebanho, utilizando-se programa WinBUGS versão 1.4 (DENDUKURI & JOSEPH, 2001; BRASCUM et al., 2005; NTZOUFRAS, 2009).

Nesta análise, foram realizadas 100.000 iterações, descartando-se as primeiras 5000 na fase de aquecimento. Foram geradas duas cadeias, uma com valores iniciais gerados pelo programa, e outra a partir dos dados coletados. A convergência das cadeias de Markov foi averiguada por inspeção visual do histórico das mesmas e verificação do erro de Monte-Carlo (NITZOUFRAS, 2009). Um a cada 10 valores gerados foi tomado para análise a fim de evitar correlação entre os mesmos.

Utilizou-se modelo Beta ( $\alpha, \beta$ ) como distribuição *a priori* para os parâmetros sensibilidade, especificidade e prevalência (Tabela 2) (JOSEPH et al., 1995). A variabilidade relatada para a sensibilidade do teste ELISA IDEXX® (WATERS et al., 2011; TROST et al., 2016), associada à pouca informação a respeito do teste em rebanhos brasileiros (VIDAL, 2013) levaram ao uso de *prioris* com intervalos mais amplos para esse parâmetro.

Foram consideradas opiniões de especialistas e informações obtidas a partir da anamnese dos rebanhos, acompanhamento das tuberculinizações e do abate sanitário de alguns animais para definição das probabilidades *a priori* das prevalências. Por se tratar de testes baseados em princípios diferentes, considerou-se não haver necessidade de incluir correlação entre eles no modelo.

Tabela 2 – Informações *a priori* para parâmetros de validação dos testes tuberculização cervical comparativa (TCC) e ELISA para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*®, e para prevalência da tuberculose.

Rebanho	Teste	Parâmetro	Informações <i>a priori</i>	Fonte da informação
1		Prevalência	05,0% (0,5% - 10,0%)	Paulo M. S. Filho
2		Prevalência	45,0% (30,0% - 60,0%)	Paulo M. S. Filho
1 e 2	TCC	Sensibilidade	79,4% (60,9% - 93,8%)	LOPES et al., 2012
		Especificidade	97,7% (95,8% - 98,9%)	LOPES et al., 2012
1 e 2	ELISA	Sensibilidade	63,0% (30,0% - 91,0%)	WATERS et al., 2011
		Especificidade	95,0% (93,23% - 100,0%)	WATERS et al., 2011

A avaliação dos modelos foi feita pelo *Deviance Information Criterion* (DIC) (SPIEGELHALTER et al., 2002).

A concordância e a discordância entre testes foram avaliadas pelo teste *kappa* (NOORDEHUIZEN et al., 2001) e pelo qui-quadrado de McNemar ou teste binomial, de acordo com critérios pré-estabelecidos para aplicação de cada um deles (SIEGEL, 1975). Os parâmetros de desempenho dos testes em série e em paralelo também foram calculados (NOORDEHUIZEN et al., 2001).

#### 4.4.6. Ética

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - protocolo 77/2016.

### 4.5. RESULTADOS

Os resultados dos diagnósticos do teste ELISA e do TCC são apresentados na tabela 3. De um total de 79 animais do rebanho 1, oito foram identificados como positivos. Desses, sete animais foram detectados somente no teste ELISA, e 1 animal somente no TCC, quando os animais inconclusivos no TCC foram incluídos no grupo dos animais negativos. Já, quando os inconclusivos no TCC foram considerados positivos, observou-se um resultado positivo em ambos os testes, 5 positivos somente no ELISA e 2 positivos somente no TCC.

No rebanho 2, foram identificados 20 animais positivos, 4 no teste ELISA e 16 no TCC quando os inconclusivos no TCC foram considerados negativos. Quando os inconclusivos no TCC foram considerados positivos, foram detectados 30 animais positivos, 2 animais em ambos os testes, 2 somente no ELISA e 26 somente no TCC.

Tabela 3 – Resultados dos testes diagnósticos tuberculização cervical comparativa (TCC) e ELISA para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*® aplicados nos rebanhos 1, e 2, considerando-se os animais inconclusivos no TCC como negativos ou como positivos.

Inconclusivo TCC = Negativo				Inconclusivo TCC = Positivo			
		ELISA				ELISA	
Rebanho 1		+	-	Rebanho 1		+	-
TCC	+	00	01	TCC	+	01	02
	-	07	71		-	05	71
		ELISA				ELISA	
Rebanho 2		+	-	Rebanho 2		+	-
TCC	+	00	16	TCC	+	02	26
	-	04	21		-	02	11

De acordo com os resultados apresentados nas tabelas 5 e 6, a especificidade de ambos os testes foi maior que as respectivas sensibilidades, com estimativas próximas a 96% para o teste ELISA e a 97% para o TCC. O TCC foi mais sensível que o ELISA em ambos os rebanhos, não

importando a classificação dos animais inconclusivos, como positivos ou negativos, com estimativas de sensibilidade próximas a 76% para aquele teste. Um valor próximo a 85% foi encontrado no rebanho 2, somente quando os animais inconclusivos foram considerados positivos.

Estimativas da sensibilidade do teste ELISA variaram mais entre rebanhos que dentro de um mesmo rebanho. As medianas encontradas foram mais elevadas para o rebanho 1, próximas a 60%, que o para o rebanho 2, 21% a 25% a depender da classificação dos animais inconclusivos no TCC (Tabelas 5 e 6).

O teste ELISA foi capaz de identificar animais positivos, que não reagiram ao TCC, no rebanho 1. Alguns desses animais apresentaram lesões sugestivas de tuberculose, das quais foi possível isolar *M. bovis* (dados não publicados).

Ao se utilizar modelo para dois testes e dois rebanhos (Tabela 4), obtiveram-se estimativas *a posteriori* da sensibilidade dos testes ELISA e TCC enviesadas no sentido do rebanho 2, e não um valor intermediário entre as estimativas das sensibilidades isoladas dos dois rebanhos. Não se observou esse comportamento em relação à especificidade dos testes.

Os valores de DIC foram mais elevados para o modelo de dois testes e dois rebanhos em comparação aos valores dos modelos para dois testes e um rebanho (Tabelas 4, 5 e 6).

Tomando-se os rebanhos isoladamente, as diferenças entre DICs para os respectivos modelos de animais inconclusivos no TCC (positivos/negativos) foram iguais a 1,787 para o rebanho 1 e 1,264 para o rebanho 2, o que permitiu considera-los igualmente adequados aos dados.

Tabela 4 – Valores *a posteriori* dos parâmetros de desempenho, do índice *kappa* e da prova binomial /  $X^2$  McNemar dos testes de tuberculização cervical comparativa e ELISA para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*® nos rebanhos 1 e 2.

	Inconclusivo TCC = Negativo		Inconclusivo TCC = Positivo	
	ELISA	TCC	ELISA	TCC
Sensibilidade	24,55%	75,94%	22,36%	84,98%
	(10,44 – 43,15)	(59,35 – 89,15)	(11,12 – 37,12)	(72,36 – 93,83)
Especificidade	94,02%	97,67%	94,64%	97,52%
	(90,06 – 96,83)	(96,09 – 98,80)	(90,78 – 97,34)	(95,87 – 98,69)
Prevalência rebanho 1	3,31%		4,05%	
	(1,11 – 7,18)		(1,52 – 8,22)	
Prevalência rebanho 2	47,24%		58,84%	
	(35,17 – 60,02)		(47,22 – 70,07)	
DIC	30,688		33,329	

TCC – Teste cervical comparativo, DIC - *Deviance Information Criterion*, valores entre parênteses – intervalo de credibilidade ou intervalo de confiança para 95% de confiabilidade.

Tabela 5 – Valores *a posteriori* dos parâmetros de desempenho, do índice *kappa* e da prova binomial dos testes de tuberculização cervical comparativa (TCC) e ELISA para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*® no rebanho 1.

	Inconclusivo TCC = Negativo		Inconclusivo TCC = Positivo	
	ELISA	TCC	ELISA	TCC
Sensibilidade	60,22% (28,63 – 86,71)	75,49% (55,87 - 89,88)	61,79% (31,88 – 86,95)	76,40% (57,65 – 90,35)
Especificidade	94,78% (90,79 – 97,54)	97,69% (96,14 – 98,77)	95,77% (92,15– 98,21)	97,55% (95,93 – 98,70)
<i>Kappa</i>	-2,3% (-6,2 – 1,7)		18,8% (-18,8 – 55,0)	
Binomial	p=0,0820 <sup>ns</sup>		p=0,453 <sup>ns</sup>	
Prevalência	3,32% (1,10 – 7,33)		4,17% (1,56 – 8,54)	
DIC	12,247		10,46	

DIC - *Deviance Information Criterion*, <sup>ns</sup> – não significativo a 5% de significância, prova bicaudal, valores entre parênteses – intervalo de credibilidade ou intervalo de confiança para 95% de confiabilidade.

Tabela 6 – Valores *a posteriori* dos parâmetros de desempenho, do índice *kappa* e X<sup>2</sup> McNemar dos testes de tuberculização cervical comparativa (TCC) e ELISA para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis*® no rebanho 2.

	Inconclusivo TCC = Negativo		Inconclusivo TCC = Positivo	
	ELISA	TCC	ELISA	TCC
Sensibilidade	25,87% (11,26 – 44,94)	76,30% (59,97 – 89,25)	21,63% (10,45 – 36,52)	85,16% (73,12 – 93,89)
Especificidade	96,02% (91,35 – 98,78)	97,36% (95,53 – 98,63)	96,32% (95,47 – 98,61)	97,33% (91,78 – 98,93)
<i>Kappa</i>	-18,5% (-34,5% - -0,25%)		-5,5% (-20,4% – 9,4%)	
X <sup>2</sup> McNemar	6,05* (p=0,0139)		18,893** (p=0,0001)	
Prevalência	47,45% (35,35 – 60,15)		58,97% (47,78 – 69,95)	
DIC	20,103		21,367	

DIC - *Deviance Information Criterion*, \*teste significativo (5% de significância), \*\*teste significativo (1% de significância), valores entre parênteses – intervalo de credibilidade ou intervalo de confiança para 95% de confiabilidade.

Os resultados dos testes em paralelo e em série são apresentados nas tabelas 7 e 8. O emprego dos testes em paralelo elevou a sensibilidade para próximo de 90%, com pequena redução da especificidade no rebanho 1. No rebanho 2, a sensibilidade dos testes em paralelo foi de 82% quando os animais inconclusivos foram considerados negativos e 88% quando considerados positivos.

O emprego dos testes em série reduziu a sensibilidade para menos de 50% em ambos os rebanhos. No rebanho de maior prevalência, esses valores foram tão baixos quanto 19,77% e 18,42%.

Tabela 7 – Valores estimados da sensibilidade e especificidade dos testes TCC e ELISA em paralelo.

Rebanho	Parâmetro	Inconclusivo TCC = Negativo	Inconclusivo TCC = Positivo
1	Sensibilidade	90,25%	90,98%
	Especificidade	92,59%	93,42%
2	Sensibilidade	82,43%	88,34%
	Especificidade	93,48%	93,74%

TCC – Teste Cervical Comparativo; Sensibilidade paralelo =  $1 - (1 - \text{Sensibilidade TCC}) * (1 - \text{Sensibilidade ELISA})$ ; Especificidade paralelo =  $\text{Especificidade TCC} * \text{Especificidade ELISA}$

Tabela 8 – Valores estimados da sensibilidade e especificidade dos testes TCC e ELISA em série.

Rebanho	Parâmetro	Inconclusivo TCC = Negativo	Inconclusivo TCC = Positivo
1	Sensibilidade	45,46%	47,20%
	Especificidade	99,88%	99,89%
2	Sensibilidade	19,77%	18,42%
	Especificidade	99,89%	99,90%

TCC – Teste Cervical Comparativo; Sensibilidade série =  $\text{Sensibilidade TCC} * \text{Sensibilidade ELISA}$ ; Especificidade série =  $1 - (1 - \text{Especificidade TCC}) * 1 - (1 - \text{Especificidade ELISA})$ .

Resultados positivos em ambos os testes foram observados em poucos animais. Eles ocorreram somente quando os resultados inconclusivos no TCC foram considerados positivos (Tabela 3). Valores muito baixos ou negativos foram encontrados para o índice *kappa*, reforçando os dados apresentados na tabela 3, além de corroborarem achados anteriores (VIDAL, 2013). Houve um maior número de animais positivos no rebanho 2 que no rebanho 1 e as prevalências estimadas para o rebanho 1 foram menores que para o rebanho 2. Para um mesmo rebanho, as prevalências foram maiores quando os animais inconclusivos no TCC foram considerados positivos. Essa diferença foi mais acentuada no rebanho 2.

#### 4.6. DISCUSSÃO

A avaliação de testes diagnósticos é um procedimento necessário para garantir o seu melhor uso e a adequada interpretação dos resultados produzidos por eles. Várias abordagens podem ser adotadas para esta finalidade, entretanto, a falta de padrão-ouro é um limitador aos modelos tradicionais de avaliação de testes diagnósticos para a tuberculose animal (REISTMA et al., 2009; BOVINE..., 2016; CLEGG et al, 2011). Modelos Bayesianos de classe latente já foram empregados para avaliar testes diagnósticos para a tuberculose no Brasil (LOPES et al., 2012). No entanto, ainda não o foram para avaliar o desempenho do teste comercial ELISA IDEXX® (VIDAL, 2013).

A violação dos pressupostos de Hui-Walter para modelos de classe latente pode ter consequências para as estimativas *a posteriori* dos parâmetros (JOHNSON et al., 2009; TOFT et al., 2005). Apesar de inicialmente não-identificáveis, por apresentarem maior número de parâmetros a serem estimados que o número de graus de liberdade, a utilização de *prioris* informativas contribuiu para restabelecer a condição de identificabilidade dos modelos de uma população (rebanho) e dois testes diagnósticos (JOSEPH et al., 1995; PEREIRA, 2011). Os menores valores de DIC encontrados para esses modelos indicaram também que eles foram mais adequados aos dados em relação os modelos de dois rebanhos e dois testes, que apresentaram valores mais elevados para

este critério de comparação entre modelos (SPIEGELHALTER et al., 2002; NTZOUFRAS, 2009).

Ambos os testes mostraram-se bastante específicos, com pequenas variações entre rebanhos e dentro de um mesmo rebanho e estimativas próximas às já relatadas na literatura (de la RUA DOMENECH et al., 2006; WATTERS et al., 2011). Essa é uma característica dos testes utilizados para o diagnóstico da tuberculose bovina, que normalmente, têm boa especificidade e baixa sensibilidade.

Um dos problemas para o controle da tuberculose é a baixa sensibilidade dos testes diagnósticos (SCHILLER et al., 2011). As estimativas de sensibilidade encontradas neste estudo para o TCC estão de acordo com aquelas relatadas na literatura (de la RUA DOMENECH et al., 2006).

Apesar de o teste ELISA ter apresentado menor sensibilidade que a do TCC, esse teste foi capaz de identificar animais reagentes, possivelmente anérgicos ou que se encontravam em fase inicial da enfermidade, normalmente, não detectados no TCC (HARBOE et al., 1990; LIGHTBODY et al., 1998; SILVA, 2000; WATTERS et al., 2006). Especificamente, com relação ao teste ELISA IDEXX®, esta capacidade é conferida pelos antígenos adsorvidos MPB 83, proteína constitutiva do *M. bovis* que induz produção de anticorpos no início da enfermidade, e MPB 70, proteína secretada pela bactéria em fase mais avançada da doença (WATERS et al., 2006; WIKER, 2009; WATTERS et al., 2011).

Esta capacidade de identificar animais em fases distintas da enfermidade é corroborada pelos valores muito baixos ou negativos para o índice *kappa*, que indicam baixa concordância entre resultados dos dois testes ou mesmo discordância entre eles.

Diante disso, o emprego dos testes ELISA e TCC em paralelo seria uma alternativa viável para aumentar a sensibilidade do diagnóstico da tuberculose. Essa medida concorreria para acelerar o processo de saneamento e erradicação da enfermidade à medida que reduz a possibilidade de animais infectados, não detectados pelo TCC, permanecerem no rebanho com consequências para o controle da enfermidade (HOULIHAN et al., 2008).

Por outro lado, a baixíssima sensibilidade dos testes em série desabona seu uso como estratégia diagnóstica, apesar da especificidade, quando utilizados dessa forma, ser muito próxima de 100%. Ao se utilizar modelo de dois testes e dois rebanhos, houve um desvio da probabilidade *a posteriori* da sensibilidade do teste ELISA em direção à aquela apresentada pelo rebanho de maior prevalência, o que indica fortemente que o parâmetro varia entre populações de prevalências diferentes (TOFT et al., 2005; JOHNSON et al., 2009). Desvio semelhante também foi observado com relação à sensibilidade do TCC, mas somente quando os animais inconclusivos nesse teste foram considerados positivos e a prevalência no rebanho 2 chegou próxima a 60%, considerada uma situação rara de ser encontrada por ser demasiado elevada.

Tais diferenças podem estar relacionadas às diferentes fases da enfermidade em que os animais dos dois rebanhos se encontravam. Como o rebanho 1 já se encontrava em processo de saneamento, a maioria dos animais infectados foi eliminada do plantel em tuberculinizações anteriores. Diferentemente do rebanho 2, que não havia iniciado o processo de saneamento, mantendo ainda um grande número de animais infectados, com baixos níveis de anticorpos específicos circulantes, não responsivos ao teste ELISA. É sabido também que a tuberculinização de animais infectados induz resposta imune anamnésica humoral, mediada predominantemente pela IgG<sub>1</sub>. Em animais infectados nunca tuberculinizados, como os do rebanho 2, predomina IgG<sub>2</sub> (LIGHTBODY et al., 1998; WATTERS et al., 2011). Esse poderia ser outro fator a contribuir para a menor sensibilidade do teste no rebanho 2 em relação ao rebanho 1, levando-se em consideração a capacidade do teste ELISA em detectar as duas subclasses de imunoglobulinas.

Ao contrário do que ocorreu no rebanho de menor prevalência, no rebanho 2 houve mais resultados positivos no TCC que no ELISA ( $p < 0,05$ ), o que também pode ser interpretado como

indicativo de desempenho diferente do ELISA nesse rebanho, visto que a sensibilidade do TCC nos dois rebanhos é praticamente a mesma.

A coleta de sangue para o ELISA, 15 dias após a tuberculinização, pode melhorar substancialmente a sensibilidade do teste, provavelmente devido a resposta anamnésica dos animais infectados frente ao estímulo da PPD (LIGHTBODY et al., 1998; CASAL et al., 2014). Entretanto, esse procedimento leva a mais uma visita à propriedade, além das duas para a realização do TCC, altera o manejo do rebanho, eleva os custos do diagnóstico e pode ser refutada pelos proprietários, principalmente em grandes rebanhos manejados extensivamente. Por isto optou-se pela coleta de sangue no dia da inoculação da tuberculina ou no dia da leitura dos testes, o que não altera a rotina diagnóstica nem o manejo dos animais, uma vez que, normalmente, se coleta sangue para diagnóstico de brucelose nessas ocasiões.

As estimativas da sensibilidade do teste ELISA encontradas para o rebanho 1 foram próximas àquelas já relatadas quando o sangue foi coletado quinze dias após a tuberculinização. No rebanho 2, por outro lado, os valores, mais baixos, foram próximos àqueles relatados quando o sangue para o teste ELISA foi coletado no dia da tuberculinização (CASAL et al., 2014).

Disparidades na sensibilidade do teste ELISA devido a diferenças geográficas também são relatadas (WATTERS et al., 2011; TROST et al., 2016). No entanto, esta não parece ser a causa das diferenças observadas nesse estudo porque os rebanhos 1 e 2 são oriundos de regiões muito próximas dentro do mesmo estado, Minas Gerais, no Brasil.

O emprego do teste ELISA seria, portanto, mais indicado em rebanhos já em processo de saneamento, como o rebanho 1. Por outro lado, o seu emprego já no primeiro exame a ser realizado em rebanho no início do processo de saneamento, deve ser avaliado considerando-se o seu provável desempenho inferior nessa situação e os custos de realização desse teste sorológico. De acordo com os dados encontrados neste estudo, não seria recomendável a substituição do TCC pelo teste ELISA IDEXX®, conforme já recomendado anteriormente (VIDAL, 2013). Uma vez confirmada a presença da enfermidade no rebanho, principalmente naqueles que ainda não entraram em saneamento, como o rebanho 2, seria recomendável considerar os animais inconclusivos no TCC como positivos. Essa providência não só aumentaria a sensibilidade do diagnóstico, sem prejuízo da especificidade da prova, como também reduziria o risco de manter no rebanho animais, cuja probabilidade de estarem infectados em relação aos demais negativos animais do rebanho, é cerca de cem vezes maior (CELGG et al., 2011).

#### 4.7. REFERÊNCIAS

ALVAREZ, J.; PEREZ, A.; BEZOS, J. *et al.*. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology*, v. 155, n. 1, p. 38 – 43, 2012.

BOVINE tuberculosis. 2016. In: MANUAL of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: World Organization for Animal Health, 2016. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.07\\_BOVINE\\_TB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf)> Acessado em 21-09-2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal*. 2006. 188p. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf)> Acessado em: 19/04/2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa SDA Nº. 19, de 10 de outubro de 2016*. Disponível em: <http://crmvpb.org.br/alteracoes-no-regulamento->



[tecnico-do-pncebt/](#) Acessado em: 21/11/2016.

BRASCUM, A.J.; GARDNER, I.A.; JOHNSON, W.O. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 68, n. 2 - 4, p. 145 – 163, 2005.

CASAL, C.; DÍEZ-GUERRIER, A.; ÁLVAREZ, J. *et al.*. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Veterinary Microbiology*, v. 170, n. 3 – 4, p. 342 – 351, 2014.

CLEGG, T.A.; DUIGNAN, A.; WHELAN, C. *et al.*. Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the  $\gamma$ -interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Veterinary Microbiology*, v. 151, n. 1 – 2, p. 68 – 75, 2011a.

CLEGG, T.A.; GOOD, M.; DUIGNAN, A.; DOYLE, R.; MORE, S.J. Shorter-term risk of *Mycobacterium bovis* in Irish cattle following an inconclusive diagnosis to the single intradermal comparative tuberculin test. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 102, n. 4, p. 155 – 264, 2011b.

de La RUA-DOMMENECH, R.; GOODCHILD, A.T.; VORDEMEIER, H.M. *et al.*. Ante-mortem diagnosis in cattle: A review of the tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, v. 81, n. 2, p. 190-2010, 2006.

DENDUKURI, N.; JOSEPH, L. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics*, v.57, n. 1, p. 158–167, 2001.

ENØE, C.; GEORGIADIS, M.P.; JOHNSON, W.O. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 45, n. 1 – 2, p. 61-81, 2000.

GORMLEY, E.; DOYLE, M.B.; FITZSIMONS, T.; MCGILL, K.; COLLIN, J.D. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigan®) assay. *Veterinary Microbiology*, v. 112, n. 2 – 4, p. 171 – 179, 2006

HARBOE, M.; WIKER, H.G.; DUNCAN, R.; *et al.*. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 25, n. 5, p. 913 – 921, 1990.

HOULIHAN, M.G.; DIXON, F.W.; PAGE, A.A. Outbreak of bovine tuberculosis featuring anergy to the skin test, udder lesions and milkborne disease in young calves. *Veterinary Record*, v. 20, n. 12, p. 357 – 361, 2008.

JOHNSON, W.O.; GARDNER, I.A.; METOYER, C.N.; BRANCUM, A.J. On the interpretation of test sensitivity in the two-test two-population problem: assumptions matter. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 91, n. 2 – 4, p. 116 – 121, 2009.

JOLLEY, M.E.; NASSIR, M.S.; SURUJBALLI, O. P. *et al.*. Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. *Veterinary Microbiology*, v. 120, n. 1 – 2, p. 113-121, 2007.

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. *American Journal of Epidemiology*, v. 141, n. 3, p. 263 – 272, 1995.

LIGHTBODY, K.A.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M. Mycobacterial antigen-specific responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. *Veterinary Record*, v. 142, n. 12, p. 295 – 300, 1988.

LoBUE, P. Public health significance of *M. bovis*. In: THOEN, C.O; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. (Eds.) *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Iowa, USA: Blackwell, 2006. p. 6-12.

LOPES, L.B.; ALVES, T.M; STYNEN, A.P.R. *et al.*. Parameter estimation and use of gamma interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 32, n. 4, p. 279-283, 2012.

MEDEIROS, L. S.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E. E. S.; LILENBAUM, W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brasil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822010000300002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822010000300002)> Acessado em 01/08/2013.

MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D. *et al.*. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, v. 40, n. 1 – 2, p. 111 – 124, 1994.

NOORDHUIZEN, J.P.T.M.; FRANKENA, K.; THRUSFIELD, M.V. *et al.*. *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology*. Wageningen – Holanda: Wageningen Press, 2001. 429p.

NTZOUFRAS, L. *Bayesian modeling using WinBUGS*. Athens, Greece: Willey, 2009. 492p.

PEREIRA, G.A. *Avaliação de testes diagnósticos na ausência de padrão ouro considerando relaxamento da suposição de independência condicional, covariáveis e estratificação da população: uma abordagem bayesiana*. 2011. 234f. Tese (Doutorado em Estatística) – Universidade Federal de São Carlos, SP.

PRINCIPLES and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: MANUAL of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: World Organization for Animal Health, 2016. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/1.01.05\\_VALIDATION.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf)> Acessado em 21-09-2016.

REITSMA, J.B.; RUJTES, A. W.S.; KHAN, K.S. *et al.*. A review of solutions for diagnostic accuracy studies with an imperfect or missing reference standard. *Journal of Clinical Epidemiology*, v, 62, n. 8, p. 797-806, 2009.

SCHILLER, I.; OESCH, B.; VORDERMEIER, H.M. *et al.*. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 57, n. 4, p. 205-220, 2010.

SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento*. Brasil: McGraw-Hill, 1975. 349p.

SILVA, E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v. 78, n. 2, p. 117 – 117, 2001.

SIMEL, D.L.; FEUSSNER, J.R.; DELONG, E.R.; MATCHAR, D.B. Intermediate, indeterminate, and uninterpretable diagnostic test results. *Medical Decision Making*, v. 7, n. 2, p. 107 – 114, 1987.

SOUZA, I.I.F.; MELO, E.S.P.; RAMOS, C.A.N. *et al.*. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA of bovine tuberculosis. *SpringerPlus*, v. 1, n. 1, p.77 - 83, 2012.

SPIEGELHALTER, D.J.; BEST, N.G.; CARLIN, B.P.; van der LINDE, A. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistic Society B.*, v. 64, n. 4, p. 583 – 639, 2002.

TROST, B.; STUBE, T.; SURUJBALLI, O. *et al.*. Investigation of the cause of geographic disparities in IDEXX ELISA sensitivity in serum samples form *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Scientific Reports*, v. 6, n. 22763, 2016.

VIDAL, C.E.S. *Testes diagnósticos para detecção de bovinos infectados por Mycobacterium bovis*. 2013. 89f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal de Santa Maria, RS.

WATERS, W.R.; BUDDLE, B.M.; WORDERMEIER, H.M. *et al.*. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 18, n. 11, p. 1882-1888, 2011.

ZINSSTAG, J.; SCHELLING, E.; ROTH, F.; KAZWALA, R. *Economics of bovine tuberculosis*. In: THOEN, C.O; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. (Eds.) *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Iowa, USA: Blackwell. 2006 p. 84-88.

## 5. CONCLUSÕES

Os modelos Bayesianos de classe latente foram adequados para estimar os parâmetros de desempenho dos testes *post-mortem* e *ante-mortem* para o diagnóstico da tuberculose bovina.

Esses modelos evidenciaram que o isolamento e a identificação do agente foram os testes com melhor desempenho para o diagnóstico *post-mortem* da tuberculose em amostras com lesões sugestivas oriundas de frigoríficos com inspeção sanitária. A qPCR e o ELISA IDEXX® apresentaram desempenhos inferiores, o que não desabona o seu uso como métodos diagnósticos da enfermidade. O seu emprego dependerá dos objetivos dos usuários e das condições epidemiológicas onde serão aplicados. Essa avaliação não se estende a amostras sem lesões sugestivas de tuberculose. Nessas, os testes podem apresentar, inclusive, desempenhos diferentes dos apresentados nesse trabalho. A avaliação de desempenho dos testes *post-mortem* em amostras suspeitas, sem lesão sugestiva, pode ser necessária à medida que o PNCEBT avançar no sentido da erradicação da enfermidade e a frequência desse tipo de amostra tornar-se maior.

O teste ELISA IDEXX® deve ser utilizado como prova complementar à tuberculinização cervical comparativa, preferencialmente, em rebanhos que já se encontram em saneamento devido ao melhor desempenho diagnóstico nessa condição. O seu uso em série com a tuberculinização cervical comparativa é desaconselhado devido à baixa sensibilidade e à discordância de resultados com a tuberculinização. Devido às imperfeições dos testes avaliados, recomenda-se o uso dos testes em paralelo com o objetivo de identificar o maior número possível de animais infectados e reduzir o tempo e os custos envolvidos no processo de saneamento dos rebanhos e reduzir a possibilidade de falsos negativos. Mesmo assim, fica evidente as dificuldades de identificação de todos os indivíduos infectados, especialmente em grandes rebanhos ou populações de animais.

Outros métodos diagnósticos baseados em princípios diferentes dos testes já existentes, como a busca por proteínas e peptídeos, sabidamente secretados pelo *M. bovis*, em fluidos, secreções, lesões e tecidos poderiam contribuir para identificar os animais não detectados pelos testes avaliados neste trabalho, e viabilizar o processo de saneamento e erradicação da tuberculose bovina em grandes populações de animais onde a identificação de todos os animais infectados, utilizando-se somente esses testes, ainda é de grande dificuldade.

## 6. ANEXOS

### 6.1 MODELO PARA AVALIAÇÃO DE DOIS TESTES DIAGNÓSTICOS DA TUBERCULOSE BOVINA (ISOLAMENTO - DBAC E ELISA) EM AMOSTRAS COM LESÃO SUGESTIVA DE TUBERCULOSE - DADOS DE 2010 E 2011.

```

model{
x[1:4] ~ dmulti (p[1:4], n)
p[1] <- pi*Seisol*Seelisa+(1-pi)*(1-Spisol)*(1-Spelisa)
p[2] <- pi*Seisol *(1-Seelisa)+(1-pi)*(1-Spisol)*Spelisa
p[3] <- pi*(1-Seisol)*Seelisa+(1-pi)*Spisol*(1-Spelisa)
p[4] <- pi*(1-Seisol)*(1-Seelisa)+(1-pi)*Spisol*Spelisa
Seisol ~ dbeta (1.0,1.0) ### Mode = 0.5 , L1 =0 , L2 =1.0
Spisol ~ dbeta (2657.67, 3.9925) ### Mode = 99.9, L1 = 99.7, L2 = 100.00
Seelisa ~ dbeta (1.0, 1.0) ### Mode = 0,5, L1 = 0, L2 = 1.0
Spelisa ~ dbeta (1.0, 1.0) ### Mode = 0.5, L1 = 0, L2 = 1.0
pi ~ dbeta (1.0, 1.0) ### Mode = 0.5, L1 = 0, L2 = 1.0
}
Data
list(n=438, x=c(88,240,6,104))
Inits
list(pi=0.5, Seisol=0.5, Spisol=0.999, Seelisa=0.5, Spelisa=0.5)

```

Resultados:

Estatística:

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
Seelisa	0.267	0.02416	1.752E-4	0.2207	0.2666	0.3159	5000	19000
Seisol	0.9545	0.03046	2.275E-4	0.886	0.9587	0.9978	5000	19000
Spelisa	0.9613	0.02605	1.931E-4	0.9028	0.965	0.9983	5000	19000
Spisol	0.9985	7.491E-4	5.338E-6	0.9967	0.9986	0.9996	5000	19000
pi	0.7813	0.03068	2.451E-4	0.7252	0.7799	0.8451	5000	19000

### 6.2 MODELOS PARA AVALIAÇÃO DE TRÊS TESTES DIAGNÓSTICOS PARA A TUBERCULOSE BOVINA (ISOLAMENTO - DBAC, ELISA E PCR) EM AMOSTRAS COM LESÃO SUGESTIVA DE TUBERCULOSE -DADOS DE 2012 E 2013.

#### 6.2.1 Modelo 1 - sem correlação entre Isolamento (DBac), ELISA e PCR (três testes e uma população)

```

model{
y[1:8] ~ dmulti(p[1:8], n)
p[1] <- pi*SeDBac*SeELISA*SePCR + (1-pi)*(1-SpDBac)*(1-SpELISA)*(1-SpPCR)
p[2] <- pi*SeDBac*SeELISA*(1-SePCR) + (1-pi)*(1-SpDBac)*(1-SpELISA)*SpPCR
p[3] <- pi*SeDBac*(1-SeELISA)*SePCR + (1-pi)*(1-SpDBac)*SpELISA*(1-SpPCR)
p[4] <- pi*SeDBac*(1-SeELISA)*(1-SePCR) + (1-pi)*(1-SpDBac)*SpELISA*SpPCR
p[5] <- pi*(1-SeDBac)*SeELISA*SePCR + (1-pi)*(SpDBac)*(1-SpELISA)*(1-SpPCR)
p[6] <- pi*(1-SeDBac)*SeELISA*(1-SePCR) + (1-pi)*(SpDBac)*(1-SpELISA)*SpPCR
p[7] <- pi*(1-SeDBac)*(1-SeELISA)*SePCR + (1-pi)*SpDBac*SpELISA*(1-SpPCR)
p[8] <- pi*(1-SeDBac)*(1-SeELISA)*(1-SePCR) + (1-pi)*SpDBac*SpELISA*SpPCR
pi ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0.0, L2=1.0
SeDBac ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpDBac ~ dbeta(7991, 3.99) ## Mode=0.9995, L1=0.999, L2=1.00
SeELISA ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpELISA ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SePCR ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpPCR ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
}
data
list(n=126 , y=c(18,4,40,27,0,2,4,31))
inits
list(pi=0.5 , SeDBac=0.5 , SpDBac=0.995 , SeELISA=0.5 , SpELISA=0.5 , SePCR=0.5 , SpPCR=0.5)

```

Resultados

Estatística:

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
SeDBac	0.9551	0.03395	2.379E-4	0.8742	0.9618	0.9984	5000	19000
SeELISA	0.2487	0.04481	2.963E-4	0.1653	0.2471	0.341	5000	19000
SePCR	0.6439	0.0499	3.67E-4	0.5426	0.6446	0.738	5000	19000
SpDBac	0.9995	2.503E-4	1.806E-6	0.9989	0.9995	0.9999	5000	19000
SpELISA	0.9263	0.04575	3.442E-4	0.8174	0.934	0.9914	5000	19000
SpPCR	0.9097	0.05804	4.114E-4	0.7792	0.9171	0.9949	5000	19000
pi	0.7286	0.04435	3.12E-4	0.6392	0.7293	0.8127	5000	19000

## 6.2.2 Modelo 2 - correlação entre ELISA e PCR (três testes e uma população)

```

model{
y[1:8] ~ dmulti(p[1:8], n)
p[1] <- pi*SeDBac*(SeELISA*SePCR+covDp) + (1-pi)*(1-SpDBac)*((1-SpELISA)*(1-SpPCR)+covDn)
p[2] <- pi*SeDBac*(SeELISA*(1-SePCR)-covDp) + (1-pi)*((1-SpDBac)*(1-SpELISA)*SpPCR-covDn)
p[3] <- pi*SeDBac*((1-SeELISA)*SePCR-covDp) + (1-pi)*(1-SpDBac)*(SpELISA*(1-SpPCR)-covDn)
p[4] <- pi*SeDBac*((1-SeELISA)*(1-SePCR)+covDp) + (1-pi)*(1-SpDBac)*(SpELISA*SpPCR+covDn)
p[5] <- pi*(1-SeDBac)*(SeELISA*SePCR+covDp) + (1-pi)*(SpDBac)*((1-SpELISA)*(1-SpPCR)+covDn)
p[6] <- pi*(1-SeDBac)*(SeELISA*(1-SePCR)-covDp) + (1-pi)*(SpDBac)*((1-SpELISA)*SpPCR-covDn)
p[7] <- pi*(1-SeDBac)*((1-SeELISA)*SePCR-covDp) + (1-pi)*SpDBac*(SpELISA*(1-SpPCR)-covDn)
p[8] <- pi*(1-SeDBac)*((1-SeELISA)*(1-SePCR)+covDp) + (1-pi)*SpDBac*(SpELISA*SpPCR+covDn)
ls <- (SeELISA-1)*(1-SePCR)
us <- min(SeELISA,SePCR)-SeELISA*SePCR
lc <- (SpELISA-1)*(1-SpPCR)
uc <- min(SpELISA, SpPCR)-SpELISA*SpPCR
pi ~ dbeta(1.00, 1.00) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1.0
SeDBac ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpDBac ~ dbeta(7991, 3.99) ## Mode=0.9995, L1=0.999, L2=1.00
SeELISA ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpELISA ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SePCR ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpPCR ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
covDn ~ dunif(lc, uc)
covDp ~ dunif(ls, us)
rhoD <- covDp / sqrt(SeELISA*(1-SeELISA)*SePCR*(1-SePCR))
rhoDc <- covDn / sqrt(SpELISA*(1-SpELISA)*SpPCR*(1-SpPCR))
}

data
list(n=126 , y=c(18,4,40,27,0,2,4,31))
inits
list(pi=0.5 , SeDBac=0.5 , SpDBac=0.995 , SeELISA=0.5 , SpELISA=0.5 , SePCR=0.5 , SpPCR=0.5, covDp=0.05, covDn=0.05)

```

Resultados:

Estatística:

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
SeDBac	0.9522	0.03647	3.798E-4	0.8666	0.9588	0.9982	5000	9500
SeELISA	0.2536	0.04487	4.185E-4	0.1712	0.2516	0.3466	5000	9500
SePCR	0.6462	0.04961	5.017E-4	0.547	0.6469	0.7398	5000	9500
SpDBac	0.9995	2.525E-4	2.67E-6	0.9989	0.9995	0.9999	5000	9500
SpELISA	0.9212	0.05047	4.73E-4	0.8012	0.9305	0.9926	5000	9500
SpPCR	0.9071	0.06468	6.752E-4	0.7641	0.9143	0.9968	5000	9500
covDn	0.004318	0.01122	1.233E-4	-0.01464	0.002217	0.0325	5000	9500
covDp	0.03469	0.01951	2.06E-4	-0.005193	0.03512	0.07254	5000	9500
pi	0.7325	0.04624	5.029E-4	0.6404	0.7336	0.8203	5000	9500
rhoD	0.168	0.09178	9.877E-4	-0.02583	0.1729	0.3368	5000	9500
rhoDc	0.08853	0.1578	0.001727	-0.1256	0.05189	0.4836	5000	9500

## 6.2.3 Modelo 3 - correlação entre isolamento (DBac) e PCR (três testes e uma população).

```

model{
y[1:8] ~ dmulti(p[1:8], n)
p[1] <- pi*(SeDBac*SePCR+covDp)*SeELISA + (1-pi)*((1-SpDBac)*(1-SpPCR)+covDn)*(1-SpPCR)
p[2] <- pi*(SeDBac*(1-SePCR)-covDp)*SeELISA + (1-pi)*((1-SpDBac)*SpPCR-covDn)*(1-SpELISA)
p[3] <- pi*(SeDBac*SePCR+covDp)*(1-SeELISA) + (1-pi)*((1-SpDBac)*(1-SpPCR)+covDn)*SpELISA
p[4] <- pi*(SeDBac*(1-SePCR)-covDp)*(1-SeELISA) + (1-pi)*((1-SpDBac)*SpPCR-covDn)*SpELISA
p[5] <- pi*((1-SeDBac)*SePCR-covDp)*SeELISA + (1-pi)*((SpDBac)*(1-SpPCR)-covDn)*(1-SpELISA)

```

```

p[6] <- pi*((1-SeDBac)*(1-SePCR)+covDp)*SeELISA + (1-pi)*(SpDBac*SpPCR+covDn)*(1-SpELISA)
p[7] <- pi*((1-SeDBac)*SePCR-covDp)*(1-SeELISA) + (1-pi)*(SpDBac*(1-SpPCR)-covDn)*SpELISA
p[8] <- pi*((1-SeDBac)*(1-SePCR) + covDp)*(1-SeELISA) + (1-pi)*(SpDBac*SpPCR+covDn)*SpELISA
ls <- (SeDBac-1)*(1-SePCR)
us <- min(SePCR,SeDBac)-SePCR*SeDBac
lc <- (SpDBac-1)*(1-SpPCR)
uc <- min(SpPCR, SpDBac)-SpPCR*SpDBac
pi ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0.0, L2=1.0
SeDBac ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpDBac ~ dbeta(7991, 3.99) ## Mode=0.9995, L1=0.999, L2=1.00
SeELISA ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpELISA ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SePCR ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpPCR ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
covDn ~ dunif(lc, uc)
covDp ~ dunif(ls, us)
rhoD <- covDp / sqrt(SePCR*(1-SePCR)*SeDBac*(1-SeDBac))
rhoDc <- covDn / sqrt(SpPCR*(1-SpPCR)*SpDBac*(1-SpDBac))
}

data
list(n=126 , y=c(18,4,40,27,0,2,4,31))
inits
list(pi=0.5 , SeDBac=0.5 , SpDBac=0.995 , SeELISA=0.5 , SpELISA=0.5 , SePCR=0.5 , SpPCR=0.5, covDp=0.05, covDn=0.05)

```

Resultados:

Estatística:

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
SeDBac	0.9154	0.07395	0.00141	0.7158	0.9363	0.9969	5000	9500
SeELISA	0.2423	0.04564	4.856E-4	0.1614	0.2398	0.3385	5000	9500
SePCR	0.6123	0.06263	9.449E-4	0.4759	0.6171	0.7213	5000	9500
SpDBac	0.9995	2.518E-4	2.51E-6	0.9989	0.9995	0.9999	5000	9500
SpELISA	0.9217	0.08622	0.001091	0.7295	0.9402	0.9962	5000	9500
SpPCR	0.8622	0.1252	0.001739	0.5017	0.8882	0.9903	5000	9500
covDn	1.837E-4	2.007E-4	2.017E-6	-9.81E-5	1.477E-4	6.537E-4	5000	9500
covDp	0.02951	0.03389	6.291E-4	-0.009334	0.01835	0.1142	5000	9500
pi	0.766	0.0757	0.001327	0.6514	0.7532	0.9729	5000	9500
rhoD	0.1868	0.1743	0.002884	-0.09932	0.1732	0.5295	5000	9500
rhoDc	0.03381	0.05	4.437E-4	-0.009756	0.02492	0.1318	5000	9500

## 6.2.4 Modelo 4 - correlação entre isolamento (DBac) e ELISA (três testes e uma população).

```

model{
y[1:8] ~ dmulti(p[1:8], n)
p[1] <- pi*(SeDBac*SeELISA+covDp)*SePCR + (1-pi)*((1-SpDBac)*(1-SpELISA)+covDn)*(1-SpPCR)
p[2] <- pi*(SeDBac*SeELISA+covDp)*(1-SePCR) + (1-pi)*((1-SpDBac)*(1-SpELISA)+covDn)*SpPCR
p[3] <- pi*(SeDBac*(1-SeELISA)-covDp)*SePCR + (1-pi)*((1-SpDBac)*SpELISA-covDn)*(1-SpPCR)
p[4] <- pi*(SeDBac*(1-SeELISA)-covDp)*(1-SePCR) + (1-pi)*((1-SpDBac)*SpELISA-covDn)*SpPCR
p[5] <- pi*((1-SeDBac)*SeELISA-covDp)*SePCR + (1-pi)*((SpDBac)*(1-SpELISA)-covDn)*(1-SpPCR)
p[6] <- pi*((1-SeDBac)*SeELISA-covDp)*(1-SePCR) + (1-pi)*((SpDBac)*(1-SpELISA)-covDn)*SpPCR
p[7] <- pi*((1-SeDBac)*(1-SeELISA)+covDp)*SePCR + (1-pi)*(SpDBac*SpELISA+covDn)*(1-SpPCR)
p[8] <- pi*((1-SeDBac)*(1-SeELISA)+covDp)*(1-SePCR) + (1-pi)*(SpDBac*SpELISA+covDn)*SpPCR
ls <- (SeDBac-1)*(1-SeELISA)
us <- min(SeELISA,SeDBac)-SeELISA*SeDBac
lc <- (SpDBac-1)*(1-SpELISA)
uc <- min(SpELISA, SpDBac)-SpELISA*SpDBac
pi ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0.0, L2=1.0
SeDBac ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpDBac ~ dbeta(7991, 3.99) ## Mode=0.9995, L1=0.999, L2=1.00
SeELISA ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpELISA ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SePCR ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpPCR ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
covDn ~ dunif(lc, uc)
covDp ~ dunif(ls, us)
rhoD <- covDp / sqrt(SeELISA*(1-SeELISA)*SeDBac*(1-SeDBac))
}

```

```
rhoDc <- covDn / sqrt(SpELISA*(1-SpELISA)*SpDBac*(1-SpDBac))
}

data
list(n=126 , y=c(18,4,40,27,0,2,4,31))
inits
list(pi=0.5 , SeDBac=0.5 , SpDBac=0.995 , SeELISA=0.5 , SpELISA=0.5 , SePCR=0.5 , SpPCR=0.5, covDp=0.05, covDn=0.05)
```

Resultados:  
Estatística:

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
SeDBac	0.9612	0.03287	3.806E-4	0.8794	0.9697	0.999	5000	9500
SeELISA	0.2534	0.04454	4.489E-4	0.1719	0.2517	0.3454	5000	9500
SePCR	0.6448	0.04972	5.865E-4	0.5459	0.6455	0.7409	5000	9500
SpDBac	0.9995	2.493E-4	2.387E-6	0.9989	0.9995	0.9999	5000	9500
SpELISA	0.9255	0.04623	5.159E-4	0.8141	0.9337	0.9914	5000	9500
SpPCR	0.9018	0.05884	5.949E-4	0.771	0.9078	0.9931	5000	9500
covDn	2.109E-4	1.958E-4	1.866E-6	-2.729E-5	1.652E-4	6.973E-4	5000	9500
covDp	-5.953E-4	0.009631	9.923E-5	-0.02194	-3.076E-4	0.01932	5000	9500
pi	0.7248	0.04424	3.993E-4	0.6361	0.7264	0.8088	5000	9500
rhoD	-0.01944	0.1019	0.001031	-0.2467	-0.008453	0.1542	5000	9500
rhoDc	0.04462	0.04858	4.553E-4	-0.004352	0.03464	0.1579	5000	9500

### 6.3 MODELOS PARA AVALIAÇÃO DOS TESTES DIAGNÓSTICOS ELISA E TUBERCULINIZAÇÃO CERVICAL COMPARATIVA (TCC) EM REBANHOS COM DIFERENTES PREVALÊNCIAS.

#### 6.3.1 Modelo Rebanho 1 (Inconclusivos no TCC = negativos)

```
model{
x[1:4] ~ dmulti (p[1:4], n)
p[1] <- pi*SePPD*Seelisa+(1-pi)*(1-SpPPD)*(1-Spelisa)
p[2] <- pi*SePPD*(1-Seelisa)+(1-pi)*(1-SpPPD)*Spelisa
p[3] <- pi*(1-SePPD)*Seelisa+(1-pi)*SpPPD*(1-Spelisa)
p[4] <- pi*(1-SePPD)*(1-Seelisa)+(1-pi)*SpPPD*Spelisa
SePPD ~ dbeta (19.26, 5.64) # Mode = 0.794, L1=0.609, L2 =0.93.8
SpPPD ~ dbeta (417.16, 11.35) # Mode = 0.977, L1=0.958, L2 =0.989
Seelisa ~ dbeta (5.6, 3.66) ### Mode = 63.0, L1 = 30.0, L2 = 91.0
Spelisa ~ dbeta (105.46, 3.825) ### Mode = 95.0, L1 = 93.23, L2 = 100,00
pi ~ dbeta (4.58, 82.61) # Mode = 0.05, L1=0.005, L2 =0.1
}
Data
list(n=79, x=c(00,01,07,71))
```

Inits  
list(pi=0.05, SePPD=0.794, SpPPD=0.977, Seelisa=0.63, Spelisa=0.95)

Estatística:

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
SePPD	0.7479	0.08824	6.367E-4	0.5587	0.7549	0.8988	5000	19000
Seelisa	0.5951	0.1529	0.001157	0.2863	0.6022	0.8671	5000	19000
SpPPD	0.9763	0.00678	4.897E-5	0.9614	0.9769	0.9877	5000	19000
Spelisa	0.9462	0.01721	1.209E-4	0.9079	0.9478	0.9754	5000	19000
pi	0.03553	0.01621	1.188E-4	0.01103	0.03322	0.07334	5000	19000

#### 6.3.2 Modelo Rebanho 1 (Inconclusivos no TCC = positivos)

```
model{
x[1:4] ~ dmulti (p[1:4], n)
p[1] <- pi*SePPD*Seelisa+(1-pi)*(1-SpPPD)*(1-Spelisa)
p[2] <- pi*SePPD*(1-Seelisa)+(1-pi)*(1-SpPPD)*Spelisa
p[3] <- pi*(1-SePPD)*Seelisa+(1-pi)*SpPPD*(1-Spelisa)
p[4] <- pi*(1-SePPD)*(1-Seelisa)+(1-pi)*SpPPD*Spelisa
SePPD ~ dbeta (19.26, 5.64) # Mode = 0.794, L1=0.609, L2 =0.93.8
```



```

SpPPD ~ dbeta (417.16, 11.35) # Mode = 0.977, L1=0.958, L2 =0.989
Seelisa ~ dbeta (5.6, 3.66) ### Mode = 63.0, L1 = 30.0, L2 = 91.0
Spelisa ~ dbeta (105.46, 3.825) ### Mode = 95.0, L1 = 93.23, L2 = 100,00
pi ~ dbeta (4.58, 82.61) # Mode = 0.05, L1=0.005, L2 =0.1
}
Data
list(n=79, x=c(01,02,05,71))

```

```

Inits
list(pi=0.05, SePPD=0.794, SpPPD=0.977, Seelisa=0.63, Spelisa=0.95)

```

Estatística:

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
SePPD	0.7575	0.08478	5.85E-4	0.5765	0.764	0.9035	5000	19000
Seelisa	0.6115	0.1448	0.00105	0.3188	0.6179	0.8695	5000	19000
SpPPD	0.9749	0.007087	5.224E-5	0.9593	0.9755	0.987	5000	19000
Spelisa	0.9562	0.01564	1.122E-4	0.9215	0.9577	0.9821	5000	19000
pi	0.04395	0.01798	1.319E-4	0.01558	0.04172	0.08542	5000	19000

### 6.3.3 Modelo Rebanho 2 (Inconclusivos no TCC = negativos)

```

model{
x[1:4] ~ dmulti (p[1:4], n)
p[1] <- pi*SePPD*Seelisa+(1-pi)*(1-SpPPD)*(1-Spelisa)
p[2] <- pi*SePPD*(1-Seelisa)+(1-pi)*(1-SpPPD)*Spelisa
p[3] <- pi*(1-SePPD)*Seelisa+(1-pi)*SpPPD*(1-Spelisa)
p[4] <- pi*(1-SePPD)*(1-Seelisa)+(1-pi)*SpPPD*Spelisa
SePPD ~ dbeta (19.26, 5.64) # Mode = 0.794, L1=0.609, L2 =0.93.8
SpPPD ~ dbeta (417.16, 11.35) # Mode = 0.977, L1=0.958, L2 =0.989
Seelisa ~ dbeta (5.6, 3.66) # # # Mode = 63.0, L1 = 30.0, L2 = 91.0
Spelisa ~ dbeta (105.46, 3.825) # # # Mode = 95.0, L1 = 93.23, L2 = 100,00
pi ~ dbeta (19.35, 23.65) # Mode = 0.45, L1=0.3, L2 =0.6
}
Data
list(n=41, x=c(00,16,04,21))

```

```

Inits
list(pi=0.45, SePPD=0.794, SpPPD=0.977, Seelisa=0.63, Spelisa=0.95)

```

Estatística

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
SePPD	0.7594	0.07539	5.191E-4	0.5997	0.763	0.8925	5000	19000
Seelisa	0.2643	0.08582	6.611E-4	0.1126	0.2587	0.4494	5000	19000
SpPPD	0.9729	0.007901	5.472E-5	0.9553	0.9736	0.9863	5000	19000
Spelisa	0.9577	0.01938	1.349E-4	0.9135	0.9602	0.9878	5000	19000
pi	0.4755	0.06331	4.741E-4	0.3535	0.4745	0.6015	5000	19000

### 6.3.4 Modelo Rebanho 2 (Inconclusivos no TCC = positivos)

```

model{
x[1:4] ~ dmulti (p[1:4], n)
p[1] <- pi*SePPD*Seelisa+(1-pi)*(1-SpPPD)*(1-Spelisa)
p[2] <- pi*SePPD*(1-Seelisa)+(1-pi)*(1-SpPPD)*Spelisa
p[3] <- pi*(1-SePPD)*Seelisa+(1-pi)*SpPPD*(1-Spelisa)
p[4] <- pi*(1-SePPD)*(1-Seelisa)+(1-pi)*SpPPD*Spelisa
SePPD ~ dbeta (19.26, 5.64) # Mode = 0.794, L1=0.609, L2 =0.93.8
SpPPD ~ dbeta (417.16, 11.35) # Mode = 0.977, L1=0.958, L2 =0.989
Seelisa ~ dbeta (5.6, 3.66) # # # Mode = 63.0, L1 = 30.0, L2 = 91.0
Spelisa ~ dbeta (105.46, 3.825) # # # Mode = 95.0, L1 = 93.23, L2 = 100,00
pi ~ dbeta (19.35, 23.65) # Mode = 0.45, L1=0.3, L2 =0.6
}
Data
list(n=41, x=c(02,26,02,11))

```

```

Inits
list(pi=0.45, SePPD=0.794, SpPPD=0.977, Seelisa=0.63, Spelisa=0.95)

```

Estatística:

node	mean	sd	MC error	2.5%	median	97.5%	start	sample
SePPD	0.8472	0.05363	4.057E-4	0.7312	0.8516	0.9389	5000	19000
Seelisa	0.221	0.06728	4.949E-4	0.1045	0.2163	0.3652	5000	19000
SpPPD	0.9725	0.008026	5.876E-5	0.9547	0.9733	0.9861	5000	19000
Spelisa	0.9607	0.01859	1.469E-4	0.9178	0.9632	0.9893	5000	19000
pi	0.5886	0.05753	4.009E-4	0.4748	0.5897	0.6995	5000	19000