

Resposta à tuberculina bovina e à tuberculina aviária em bovinos sensibilizados com inóculos inativados de *Mycobacterium avium* e de *Mycobacterium bovis*

Response to bovine tuberculin and avian tuberculin in cattle sensitized with inoculum inactivated *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium bovis*

Respuesta a la tuberculina bovina y a la tuberculina aviar en bovinos sensibilizados con inoculantes inactivados de *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium bovis*

Recebido: 26/01/2021 | Revisado: 01/02/2021 | Aceito: 03/02/2021 | Publicado: 08/02/2021

Thalita Masoti Blankenheim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7645-5859>
União das Faculdades dos Grandes Lagos, Brasil
E-mail: tmbvet@gmail.com

Raphaella Barbosa Meirelles-Bartoli

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7147-5711>
Universidade Federal de Jataí, Brasil
E-mail: raphaella@ufg.br

Glaucenyra Cecília Pinheiro da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1033-3813>
Universidade de Cuiabá, Brasil
E-mail: glaucenyracecilia@gmail.com

Andressa Vaz Martins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8530-7719>
Universidade Federal de Jataí, Brasil
E-mail: andressavaz@discente.ufg.br

Dirceu Guilherme de Souza Ramos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9603-6638>
Universidade Federal de Jataí, Brasil
E-mail: dgramos_vet@ufg.br

Daniel Bartoli de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3209-7911>
Universidade Federal de Jataí, Brasil
E-mail: daniel_bartoli_sousa@ufg.br

Nivaldo Aparecido de Assis

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5457-5908>
Universidade Estadual Paulista, Brasil
E-mail: nivaldo.assis@unesp.br

Luis Antonio Mathias

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7282-3071>
Universidade Estadual Paulista, Brasil
E-mail: la.mathias@unesp.br

Resumo

A tuberculose causada pelo *Mycobacterium bovis* é uma importante doença dos bovinos e constitui um grande problema de saúde animal, podendo também atingir seres humanos. Para o diagnóstico da infecção, e para desencadear as medidas sanitárias decorrentes desse diagnóstico, o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) estabelece a utilização de testes intradérmicos de tuberculinização. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas à tuberculina (PPD) aviária e à tuberculina bovina apresentadas por animais sensibilizados com inóculos inativados de *M. bovis* e de *M. avium*, e comparar os resultados do teste da prega caudal (TPC), do teste cervical simples (TCS) e do teste cervical comparativo (TCC) para diagnóstico da tuberculose bovina nos animais sensibilizados e em animais não sensibilizados. Os resultados mostraram que: a repetição dos testes não influenciou na proporção de resultados positivos; houve animais sensibilizados com *M. bovis* que apresentaram reação até 500 dias após a sensibilização; em animais sensibilizados com *M. avium*, a especificidade do TCC foi superior à do TCS e à do TPC, e o TCC mostrou-se efetivo para discriminar reações induzidas pelo inóculo desse microrganismo; em animais sensibilizados com *M. bovis*, o TCC apresentou menor sensibilidade do que os outros dois testes; o ponto de corte do TCS e do TCC com melhor combinação de sensibilidade e especificidade foi inferior ao ponto adotado pelo PNCEBT para diagnóstico em animais naturalmente infectados; o TCS apresentou boa concordância com os outros dois testes, mas a concordância entre o TCC e o TPC foi apenas regular; as frequências das repostas às

tuberculinas não apresentaram distribuição gaussiana, a não ser em alguns períodos pós-sensibilização ou então após transformação radicial ou logarítmica dos dados.

Palavras-chave: Comparação de testes; Diagnóstico; PPD; Tuberculose.

Abstract

Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* is an important disease in cattle e a great problem for animal health that can reach humans. For the diagnosis of the infection and the consequent sanitary measures, the National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT) establish the use of intradermal tuberculin tests. The aim of this study was to analyze the response to the avian and bovine tuberculin (PPD) developed by cattle sensitized with inactivated inoculum of *M. avium* and *M. bovis*. Another aim was to compare the results of the caudal fold test (CFT), the comparative cervical test (CCT), and the simple cervical test (SCT) for tuberculosis diagnosis in the sensitize animals and in animals that have not been sensitized. Repetition of the tests did not influence the proportion of positive results. There were animals sensitized with *M. bovis* showing reaction up to more than 500 days post sensitization. In animals sensitized with *M. avium*, the specificity of the CCT was higher than that of CFT and SCT, and CCT was able to discriminate the unspecific reaction induced by *M. avium* inoculum. In animals sensitized with *M. bovis*, CCT had lower sensitivity than the other two tests. The SCT and CCT cut-off with the best combination of sensitivity and specificity was lower than that adopted by the PNCEBT for the tuberculosis diagnosis in naturally infected animals. SCT hat good agreement with the other two tests, but the agreement between CFT and CCT was only moderate. The frequency of the responses to tuberculin did not show Gaussian distribution, but in some post sensitization periods or after square root or logarithmic transformation of the data.

Keywords: Diagnosis; PPD; Test comparison; Tuberculosis.

Resumen

La tuberculosis causada por *Mycobacterium bovis* es una enfermedad importante del ganado y constituye un importante problema de salud animal y también puede afectar a los seres humanos. Para el diagnóstico de infección, y para activar las medidas sanitarias derivadas de este diagnóstico, el Programa Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis y Tuberculosis (PNCEBT) establece el uso de pruebas de tuberculinización intradérmica. El objetivo de este estudio fue evaluar las respuestas a la tuberculina aviar (PPD) y tuberculina bovina que presentan animales sensibilizados con inoculantes inactivados de *M. bovis* y *M. avium*, y comparar los resultados de la prueba del pliegue caudal (PPC), de la prueba cervical simple (PCS) y la prueba cervical comparativa (PCC) para el diagnóstico de tuberculosis bovina en animales sensibilizados y en animales no sensibilizados. Los resultados mostraron que: la repetición de las pruebas no influyó en la proporción de resultados positivos; hubo animales sensibilizados con *M. bovis* que mostraron reacción hasta 500 días después de la sensibilización; en animales sensibilizados con *M. avium*, la especificidad de TCC fue superior a la de PCS y la de PPC, y la PCC fue efectiva para discriminar reacciones inducidas por el inóculo de este microorganismo; en animales sensibilizados con *M. bovis*, la PCC mostró menos sensibilidad que las otras dos pruebas; el punto de corte del PCS y PCC con la mejor combinación de sensibilidad y especificidad fue menor que el punto adoptado por el PNCEBT para el diagnóstico en animales naturalmente infectados; el PCS mostró un buen acuerdo con las otras dos pruebas, pero el acuerdo entre el PCC y el PPC fue solo regular; las frecuencias de las respuestas a la tuberculina no mostraron distribución gaussiana, excepto en algunos períodos de post-sensibilización o después de una transformación radical o logarítmica de los datos.

Palabras clave: Comparación de pruebas; Diagnóstico; PPD; Tuberculosis.

1. Introdução

A tuberculose foi reconhecida primeiramente como uma enfermidade causada por um agente infeccioso em animais, e historicamente a transmissibilidade da doença a partir de material humano aos coelhos foi descrita pela primeira vez por Villemin, em 1865. Mas foi Robert Koch que, em 1882, descobriu o agente infeccioso, corando-o pela fucsina-anilina, e isolando-o em meio de cultura em 1884. A diferenciação entre o bacilo humano-bovino e o aviário foi primeiramente descrita nos Estados Unidos por Smith, em 1897 (Pritchard, 1988).

A tuberculose bovina causada pelo *Mycobacterium bovis*, é uma antropozoonose de caracter crônica com efeito debilitante cujo hospedeiro primário é o bovino e endêmica de países em desenvolvimento (Abrahão, 1998). Além desse hospedeiro, outras espécies de mamíferos domésticos e animais silvestres estão susceptíveis à infecção por esse microrganismo. Por afetar uma gama muito grande de hospedeiros, causa sérios danos à saúde humana, principalmente em pacientes imunodeprimidos e grandes prejuízos econômicos, quando se trata da criação animal, principalmente bovinos

leiteiros (Roxo, 1996) que podem eliminar o bacilo pelo leite, pelo ar expirado, por corrimento nasal, por fezes e urina e pelas secreções reprodutivas (Abrahão, 1998).

Na última década, ocorreu um aumento significativo na produção leiteira nacional, resultando no incremento da produção tanto de leite como de animais, permitindo assim que o país se tornasse um dos principais do setor (Embrapa Gado de Leite, 2020). Diante do elevado desenvolvimento dessa produção e da importância do Brasil nesse setor, é fundamental a obtenção de uma matéria-prima livre de patógenos, já que uma vez fora dos padrões sanitários, tanto os produtores como as indústrias são afetadas diretamente (Guimarães, Mateus, Moraes, Da Costa, Soares, Dos Santos & Dos Santos, 2020).

A identificação da doença pode ser feita a partir da análise de lesões nodulares macroscópicas denominadas tubérculos, localizados em qualquer órgão ou tecido (Corrêa & Corrêa, 1992). Essa inspeção é importante na rotina de matadouros frigoríficos evitando assim que produtos veiculadores desses patógenos sejam comercializados e consumos.

Além da análise dessas lesões, diferentes técnicas diretas e indiretas para o diagnóstico da doença podem ser feitas nas propriedades rurais com o intuito de identificar os animais positivos e eliminar a doença dos rebanhos visando, com isso, melhorar a sanidade dos rebanhos e dos seres humanos que lidam com esses animais (Almeida, Madruga, Soares, Fernandes, Carvalho, Jorge & Osório, 2006).

No Brasil, atualmente, o protocolo recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) é a utilização de testes alérgicos de tuberculinização intradérmico. Tal exame baseia-se na hipersensibilidade tardia, mediada por linfócitos sensibilizados, desencadeada em indivíduos anteriormente expostos ao bacilo. Como antígenos, para desencadear a reação de hipersensibilidade, são empregadas tuberculininas sintéticas de dois tipos: a PPD bovina, procedente do *M. bovis*; e a PPD aviária proveniente do *M. avium*. Este teste apresenta boa sensibilidade e especificidade, sendo considerado pela Organização Mundial de Saúde (OIE) como técnica de referência (Brasil, 2004).

O exame intradérmico pode ser realizado de três maneiras, ou seja, teste da prega caudal (TPC), teste cervical simples (TCS) e teste cervical comparativo (TCC). O TPC e o TCS são utilizados como testes de triagem em pecuária de corte e leite, respectivamente. O TCC é usado como teste confirmatório, por causa da sua maior especificidade em relação aos testes simples. Este teste permite eliminar a maior causa de reações falso-positivas, que podem ser as infecções causadas por micobactérias ambientais ou pelas do complexo MAIS, que não são patogênicas para bovinos e bubalinos, contudo, provocam reações inespecíficas à tuberculinização, atrapalhando o diagnóstico da tuberculose nessas espécies (Jorge, 2001).

A principal desvantagem do teste intradérmico é a sua falta de especificidade e no caso de lesões não visíveis que possam ocorrer. A tuberculina bovina (PPD bovina) não é suficientemente específica para diferenciar entre as reações devido à infecção com *M. bovis* e a infecção por *M. avium*, *M. tuberculosis* e *M. paratuberculosis*, incluindo a vacinação ou *Nocardia farcinicus* (Monaghan, Doherty, Collins, Kazda & Quinn, 1994).

As outras desvantagens deste teste incluem a falha para detectar casos de sensibilidade mínima, em vacas idosas e em vacas que tenham parido recentemente, bem como na fase inicial da infecção, em alguns animais em um estado de anergia, má nutrição e estresse (Varello, Pezzolato, Mascarino, Ingravalle, Caramelli & Bozzetta, 2008).

Não se pode desconsiderar também uma desvantagem do ponto de vista da praticidade, resultante do fato de ser um teste de campo que exige ir duas vezes à propriedade e conter os animais duas vezes, uma para inocular a tuberculina e outra para fazer a leitura, e o conseqüente aumento de tempo, de custo e de estresse para os animais.

Com base nas informações relacionadas aos testes de diagnóstico, o objetivo deste trabalho é comparar os resultados dos testes de diagnóstico da tuberculose bovina e confrontar as respostas à tuberculina aviária e à tuberculina bovina expostas por animais sensibilizados com *Mycobacterium bovis*, animais sensibilizados com *Mycobacterium avium* e animais não sensibilizados.

2. Metodologia

A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista (FCAV - Jaboticabal) encontrando-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009 e, com as normas editadas pela Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) com o parecer aprovado nº 19.418/15 emitido em 06 de novembro de 2015.

O presente estudo epidemiológico tem caráter descritivo com abordagem quantitativa (Pereira, Shitsuka, Parreira & Shitsuka, 2018), baseado em dados secundários, coletados junto à Universidade Estadual Paulista – *Campus* Jaboticabal (FCAV).

Foram analisados dados de 747 fichas de resultados de testes de tuberculina realizados em 388 bovinos durante atividades do Curso de Treinamento em Métodos de Diagnóstico e Controle de Brucelose e Tuberculose, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias câmpus de Jaboticabal, Unesp, no período de dezembro de 2003 a julho de 2015. Dos 388 bovinos, 203 não foram sensibilizados, 35 foram sensibilizados com *Mycobacterium avium* e 130 foram sensibilizados com *M. bovis*.

A sensibilização com *Mycobacterium avium* foi efetuada pela aplicação, por via subcutânea, na região da barbel, de 2,5 mL de inóculo inativado da amostra D4 desse microrganismo, na concentração de 4 mg por mL, e na sensibilização com *M. bovis* foi utilizada a amostra AN5, na mesma dose e pela mesma via de aplicação. Esses inóculos foram fornecidos pelo Lanagro de Pedro Leopoldo, MG, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

A metodologia empregada para a realização dos testes alérgicos utilizados no estudo seguiu a técnica descrita no Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT (Brasil, 2006).

Foram utilizadas as tuberculinas PPD (*Purified Protein Derivate* – Derivado Proteico Purificado) bovina e aviária, produzidas segundo as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo as partidas controladas e aprovadas pelo Ministério.

Para a realização dos testes de diagnóstico de tuberculose foram utilizadas seringas automáticas e cutímetros adequados, conforme estabelece o MAPA: seringas multidoses calibradas para 0,1 mL, com agulhas de calibre 22 G x 3 mm ou 4 mm de comprimento; cutímetro específico para tuberculinização de bovídeos.

Para o teste cervical simples (TCS), a inoculação de tuberculina PPD bovina foi feita na região da escápula. A área da aplicação foi demarcada por tricotomia, evitando local com lesão ou nódulos de parasitas. A espessura da dobra da pele foi determinada com o auxílio de cutímetro antes da inoculação e as medidas anotadas no formulário para exame de tuberculose, de acordo com as normas. A tuberculina PPD bovina foi inoculada por via intradérmica na dosagem de 0,1 mL.

Após 72 ± 6 horas da inoculação, foi realizada nova medida da dobra da pele no local de inoculação da tuberculina PPD bovina, sendo o resultado anotado no respectivo campo do formulário para exame de tuberculose.

O aumento da espessura da dobra da pele (ΔB) foi calculado subtraindo-se da medida da dobra da pele 72 horas após a inoculação (B72) a medida da dobra da pele tomada no dia da inoculação para a tuberculina PPD bovina (B0), sendo o resultado anotado no respectivo campo do formulário ($\Delta B = B72 - B0$). Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com os critérios encontrados na Tabela 1, definidos no Regulamento Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2004).

Tabela 1. Interpretação do teste cervical simples para diagnóstico da tuberculose bovina.

ΔB (mm)	Características da reação			Interpretação
	Sensibilidade	Consistência	Outras alterações	
0 a 1,9	–	–	–	Negativo
2,0 a 3,9	Pouca dor	Endurecida	Delimitada	Inconclusivo
2,0 a 3,9	Muita dor	Macia	Exsudato, necrose	Positivo
$\geq 4,0$	–	–	–	Positivo

Fonte: Brasil (2004).

Para o teste cervical comparativo (TCC), as tuberculinas, bovina e aviária, foram inoculadas por via intradérmica na dosagem de 0,1 mL, na região da escápula, a uma distância mínima de 15 a 20 cm entre as duas inoculações, de um mesmo lado em todos os animais. Os locais foram demarcados por tricotomia, evitando áreas com lesão ou nódulos de parasitos. A espessura da dobra de pele foi determinada com o auxílio de cutímetro antes da inoculação. As medidas da dobra da pele do local da inoculação da tuberculina PPD aviária e da tuberculina PPD bovina foram anotadas nos respectivos campos do formulário para exame de tuberculose.

Após 72 ± 6 horas da inoculação, foi realizada nova medida da dobra da pele no local de inoculação da tuberculina PPD aviária e da tuberculina PPD bovina, sendo os resultados anotados nos respectivos campos do formulário para exame de tuberculose.

O aumento da espessura da dobra da pele foi calculado subtraindo da medida da dobra da pele 72 horas após a inoculação a medida da dobra da pele tomada no dia da inoculação da tuberculina PPD aviária (ΔA) e da tuberculina PPD bovina (ΔB). A diferença de aumento da dobra da pele provocado pela inoculação da tuberculina PPD bovina (ΔB) e da tuberculina PPD aviária (ΔA) foi calculada subtraindo-se ΔA de ΔB . Os resultados das diferenças ($\Delta B - \Delta A$) foram interpretados de acordo com os critérios definidos no Regulamento Técnico do PNCEBT (Tabela 2).

Tabela 2. Interpretação do teste cervical comparativo para diagnóstico da tuberculose bovina.

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

Fonte: Brasil (2004).

No teste da prega caudal (TPC) a tuberculina PPD bovina foi inoculada por via intradérmica, na dosagem de 0,1 mL, 6 a 10 cm da base da cauda, na junção da pele pilosa e da pele glabra, após limpeza do local.

Após 72 ± 6 horas da inoculação foi realizada a leitura do teste, comparando-se, por avaliação visual e palpação, a prega inoculada com a prega do lado oposto. Qualquer aumento de espessura na prega inoculada classificava o animal como reagente.

Para as diversas comparações entre as proporções de resultados positivos foi empregado o teste exato de Fisher, sendo os cálculos efetuados por meio do software R.

A especificidade e a sensibilidade dos testes foram calculadas com base nas fórmulas padrões associadas a esses conceitos (Thrusfield, 2010). A comparação entre os valores foi feita por meio do intervalo de confiança, o qual foi calculado usando os critérios recomendados por Thrusfield (2010).

Para analisar a concordância entre os resultados de dois testes calculou-se concordância observada, concordância esperada e indicador kappa. Foram calculados também fatores que influenciam a magnitude do kappa (Sim & Wright, 2005), como concordância máxima além do acaso, kappa máximo atingível, índice de prevalência (pindex), índice de bias (bindex), prevalência ajustada a bias (pabak) e teste de χ^2 de McNemar. O kappa máximo atingível foi calculado usando planilha eletrônica do site “<http://www.winepi.net/uk/index.htm>”. Os demais cálculos foram efetuados usando o pacote EpiR do software R (Stevenson, 2012). A interpretação do indicador kappa tomou como base os critérios de Pereira (2000), os quais se encontram na Tabela 3, e levou em consideração o intervalo de confiança 95%, calculado por meio do pacote EpiR.

Tabela 3. Interpretação do indicador Kappa.

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

Fonte: Pereira (2000).

Nas diversas comparações entre as respostas à inoculação de tuberculina, expressa em variável contínua, foi efetuada inicialmente a análise da normalidade dos dados, por meio do teste de Shapiro-Wilk. Havendo normalidade ($P > 0,05$), as comparações foram feitas por meio do teste t para comparação de médias em amostras pareadas, após a realização de teste de comparação de variâncias; não havendo normalidade, as comparações foram feitas por estatística não paramétrica, usando o teste de Wilcoxon para diferença entre pares ordenados (Siqueira & Tibúrcio, 2011). Os cálculos foram efetuados utilizando o software R.

Para a análise da normalidade da distribuição das frequências das respostas à inoculação da tuberculina utilizou-se o teste de Anderson-Darling. Também foi feita a análise por meio de gráficos (histograma e QQ-plot). Quando não se observou normalidade na distribuição, ou seja, $P < 0,05$ no teste de normalidade de Anderson-Darling, os dados foram transformados em raiz quadrada de cada valor (x) e também em logaritmo de base 10 de cada valor acrescido de 1 (x+1). Esses dados transformados foram novamente submetidos à análise de normalidade. Tanto as análises como as transformações foram realizadas usando o software R.

Em todas as análises adotou-se o nível de significância de 5%.

3. Resultados e Discussão

Em 298 testes realizados em animais não sensibilizados foram observados apenas 2 (0,7%) resultados positivos no TCS. Um positivo (0,5%) foi observado entre 203 animais testados pela primeira vez e outro (5,3%) entre 19 animais testados pela terceira vez (Tabela 4). Não se observou diferença significativa entre as proporções de resultados positivos levando em consideração o número de vezes que o animal foi submetido ao teste (Tabela 5).

Tabela 4. Resultados do teste cervical simples (TCS) para diagnóstico de tuberculose em bovinos não sensibilizados, de acordo com o número de vezes em que o animal foi testado.

Número do teste	Número de testes	Teste cervical simples					
		Positivo		Inconclusivo		Negativo	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	203	1	0,5	6	3,0	196	96,5
2	74	0	0,0	2	2,7	72	97,3
3	19	1	5,3	1	5,3	17	89,5
4	2	0	0,0	0	0,0	2	100,0
Geral	298	2	0,7	9	3,0	287	96,3

Fonte: Pesquisa Própria.

Tabela 5. Comparação, por meio do teste exato de Fisher, das proporções de resultados positivos no teste cervical simples (TCS) entre cada faixa de número de vezes que o animal foi testado, desconsiderando os resultados inconclusivos, em bovinos não sensibilizados.

Comparação	Valor de P
1x2	1,0
1x3	0,1608
1x4	1,0
2x3	0,20
2x4	1,0
3x4	1,0

Fonte: Pesquisa Própria.

No TCC não foi observado nenhum resultado positivo entre os animais não sensibilizados (Tabela 6) e, obviamente, não se observou diferença significativa entre as proporções de positivos conforme o número de vezes que o animal foi testado (Tabela 7).

Tabela 6. Resultados do teste cervical comparativo (TCC) para diagnóstico de tuberculose em bovinos não sensibilizados, de acordo com o número de vezes em que o animal foi testado.

Número do teste	Número de testes	Teste cervical comparativo					
		Positivo		Inconclusivo		Negativo	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	203	0	0,0	4	2,0	199	98,0
2	74	0	3,0	0	3,0	74	100,0
3	19	0	0,0	1	5,3	18	94,7
4	2	0	0,0	0	0,0	2	100,0
Geral	298	0	0,0	5	1,7	293	98,3

Fonte: Pesquisa Própria.

Tabela 7. Comparação, por meio do teste exato de Fisher, das proporções de resultados positivos no teste cervical comparativo (TCC) entre cada faixa de número de vezes que o animal foi testado, desconsiderando os resultados inconclusivos, em bovinos não sensibilizados.

Comparações	Valor de P
1x2	1,0
1x3	1,0
1x4	1,0
2x3	1,0
2x4	1,0
3x4	1,0

Fonte: Pesquisa Própria.

Quando submetidos ao TPC, 6 (3,0%) de 203 animais não sensibilizados foram positivos na primeira vez em que foram testados, 1 (1,4%) de 74 animais foi positivo na segunda vez em que foram testados e 1 (50,0%) de 2 animais foi positivo na quarta vez em que foi testado (Tabela 8), mas as diferenças entre essas proporções não foram significativas (Tabela 9).

Tabela 8. Resultados do teste da prega caudal (TPC) para diagnóstico de tuberculose em bovinos não sensibilizados, de acordo com o número de vezes em que o animal foi testado.

Número do teste	Número de testes	Teste da prega caudal			
		Positivo		Negativo	
		Nº	%	Nº	%
1	203	6	3,0	197	97,0
2	74	1	1,4	73	98,6
3	19	0	0,0	19	100,0
4	2	1	50,0	1	50,0
Geral	298	8	2,7	290	97,3

Fonte: Pesquisa Própria.

Tabela 9. Comparação, por meio do teste exato de Fisher, das proporções de resultados positivos no teste da prega caudal (TPC) entre cada faixa de número de vezes que o animal foi testado, desconsiderando os resultados inconclusivos, em bovinos não sensibilizados.

Comparações	P
1x2	0,679
1x3	1,0
1x4	0,06729
2x3	1,0
2x4	0,05228
3x4	0,09524

Fonte: Pesquisa Própria.

Dos 35 animais sensibilizados com *M. avium*, 5 (14,3%) foram positivos ao serem testados pela primeira vez pelo TCS, 3 (13,0%) de 23 foram positivos ao serem testados pela segunda vez, 1 (5,3%) de 19 foi positivo ao ser testado pela terceira vez e 1 (16,7%) de seis foi positivo ao ser testado pela quarta vez. De um total de 88 testes, 10 (11,4%) resultaram em reação positiva (Tabela 10). Não se observou diferença significativa entre essas proporções, conforme se observa pelos resultados contidos na Tabela 11.

Tabela 10. Resultados do teste cervical simples (TCS) para diagnóstico de tuberculose em bovinos sensibilizados com *Mycobacterium avium*, de acordo com o número de vezes em que o animal foi testado.

Número do teste	Número de testes	Teste cervical simples					
		Positivo		Inconclusivo		Negativo	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	35	5	14,3	9	25,7	21	60,0
2	23	3	13,0	5	21,7	15	65,2
3	19	1	5,3	6	31,6	12	63,2
4	6	1	16,7	2	33,3	3	50,0
5	4	0	0,0	1	25,0	3	75,0
6	1	0	0,0	0	0,0	1	100,0
Geral	88	10	11,4	23	26,1	55	62,5

Fonte: Pesquisa Própria.

Tabela 11. Comparação, por meio do teste exato de Fisher, das proporções de resultados positivos no teste cervical simples (TCS) entre cada faixa de número de vezes que o animal foi testado, desconsiderando os resultados inconclusivos, em bovinos sensibilizados com *Mycobacterium avium*.

Comparações	P
1x2	1,0
1x3	0,6426
1x4	1,0
1x5	1,0
1x6	1,0
2x3	0,6207
2x4	1,0
2x5	1,0
2x6	1,0
3x4	0,4265
3x5	1,0
3x6	1,0
4x5	1,0
4x6	1,0
5x6	1,0

Fonte: Pesquisa Própria.

No TCC, não se observou resultado positivo entre os animais sensibilizados com *M. avium* (Tabela 12), o que também significa ausência de diferença significativa entre as proporções de positivos segundo o número de vezes em que os animais foram testados (Tabela 13). Concordando com as conclusões de Almeida, Madruga, Soares, Fernandes, Carvalho, Jorge e Osório (2006), os resultados do presente estudo também mostraram que o TCC se mostrou efetivo na discriminação de reações inespecíficas induzidas por *M. avium*.

Tabela 12. Resultados do teste cervical comparativo (TCC) para diagnóstico de tuberculose em bovinos sensibilizados com *Mycobacterium avium*, de acordo com o número de vezes em que o animal foi testado.

Número do teste	Número de testes	Teste cervical comparativo					
		Positivo		Inconclusivo		Negativo	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	35	0	0,0	1	2,9	34	97,1
2	23	0	0,0	1	4,3	22	95,7
3	19	0	0,0	0	0,0	19	100,0
4	6	0	0,0	0	0,0	6	100,0
5	4	0	0,0	0	0,0	4	100,0
6	1	0	0,0	0	0,0	1	100,0
Geral	88	0	0,0	2	2,3	86	97,7

Fonte: Pesquisa Própria.

Tabela 13. Comparação, por meio do teste exato de Fisher, das proporções de resultados positivos no teste cervical comparativo (TCC) entre cada faixa de número de vezes que o animal foi testado, desconsiderando os resultados inconclusivos, em bovinos sensibilizados com *Mycobacterium avium*.

Comparações	Valor de P
1x2	1,0
1x3	1,0
1x4	1,0
1x5	1,0
1x6	1,0
2x3	1,0
2x4	1,0
2x5	1,0
2x6	1,0
3x4	1,0
3x5	1,0
3x6	1,0
4x5	1,0
4x6	1,0
5x6	1,0

Fonte: Pesquisa Própria.

O TPC foi positivo em 21 (23,9%) das vezes em que foi aplicado em animais sensibilizados com *M. avium*. Dos 35 animais testados pela primeira vez, 10 (28,6%) foram positivos, e a proporção de positivos variou conforme o número de vezes em que o animal foi testado, porém sem sugerir tendência, sendo que, a diferença entre essas proporções não foi estatisticamente significativa.

Dos 130 testes em animais sensibilizados com *M. bovis*, 75,4% (98/130) foram positivos no TCS na primeira vez em que foram testados, 68,5% (61/89) foram positivos na segunda vez, 46,8% (29/62) foram positivos na terceira e 20,0% (3/15) foram positivos na quarta vez em que foram testados. Na quinta e na sexta vez não se observou reagente, mas o número de animais nessa situação era muito pequeno. No geral, foram observadas 191 (63,2%) reações positivas em 302 testes realizados (Tabela 14). Ao comparar as proporções de positivos conforme o número de vezes em que o animal foi testado, constata-se diferença estatisticamente significativa em diversas dessas comparações, mas as proporções de positivos na primeira e na segunda vez não diferiram, conforme se observa na Tabela 15.

Tabela 14. Resultados do teste cervical simples (TCS) para diagnóstico de tuberculose em bovinos sensibilizados com *Mycobacterium bovis*, de acordo com o número de vezes em que o animal foi testado.

Número do teste	Número de testes	Teste cervical simples					
		Positivo		Inconclusivo		Negativo	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	130	98	75,4	14	10,8	18	13,8
2	89	61	68,5	17	19,1	11	12,4
3	62	29	46,8	13	21,0	20	32,3
4	15	3	20,0	5	33,3	7	46,7
5	5	0	0,0	1	20,0	4	80,0
6	1	0	0,0	0	0,0	1	100,0
Geral	302	191	63,2	50	16,6	61	20,2

Fonte: Pesquisa Própria.

Tabela 15. Comparação, por meio do teste exato de Fisher, das proporções de resultados positivos no teste cervical simples (TCS) entre cada faixa de número de vezes que o animal foi testado, desconsiderando os resultados inconclusivos, em bovinos sensibilizados com *Mycobacterium bovis*.

Comparações	Valor de P
1x2	1,0
1x3	0,0009592
1x4	0,0004452
1x5	0,003775
1x6	0,1624
2x3	0,00265
2x4	0,0006625
2x5	0,001064
2x6	0,1644
3x4	0,162
3x5	0,03629
3x6	0,42
4x5	0,5055
4x6	1,0
5x6	1,0

Fonte: Pesquisa Própria.

No TCC aplicado aos animais sensibilizados com *M. bovis*, 66 (50,8%) de 130 animais foram positivos na primeira vez em que foram testados, 46 (51,7%) de 89 foram positivos na segunda vez e 15 (24,2%) de 62 o foram na terceira. A partir daí não se observou mais resultado positivo. No global, 127 (42,1%) de 302 testes foram positivos. Várias das comparações mostraram diferença significativa, porém não houve diferença entre as proporções de positivos na primeira e na segunda vez em que os animais foram testados.

Almeida, Madruga, Soares, Fernandes, Carvalho, Jorge & Osório (2006) identificaram pelo TCC 75% dos bovinos sensibilizados com *M. bovis* como sendo positivos, e 25% apresentaram reações inconclusivas. Tais dados diferem dos encontrados no presente trabalho, e esse dado pode ser apoiado no fato dos autores citados apenas testarem os animais uma única vez, ou seja, 60 dias após a sensibilização, afirmando ainda que seriam necessários mais testes para esclarecer a questão relacionada com a infecção nos diferentes momentos.

Na primeira vez que os animais sensibilizados com *M. bovis* foram submetidos ao TPC, 97 (75,8%) de 128 apresentaram resultado positivo, na segunda vez, 62 de 83 (74,7%), na terceira 38 de 61 (62,3%) e na quarta, 7 de 15 (46,7%).

Dos 302 testes realizados, 204 (69,6%) resultaram em reação positiva. Algumas das comparações entre as proporções de positivos conforme o número de vezes em que o animal foi testado mostraram significância, mas a comparação entre a primeira e a segunda vez não apontou diferença significativa.

Na Tabela 16 encontram-se as proporções de resultados positivos no TCS em bovinos sensibilizados com *M. avium*. Consta-se que 20,0% (4/20) dos animais testados de 60 a 90 dias após a sensibilização, 25,0% (3/12) dos testados entre 151 e 230 dias, 7,7% (1/13) dos testados de 301 a 500 dias e 15,4% (2/13) foram positivos, ao passo que nenhum de 13 animais testados entre 91 e 150 dias e nenhum dos 14 testados entre 231 e 300 dias apresentou reação positiva nesse teste. Não se observou diferença significativa entre essas proporções de positivos conforme o tempo após a sensibilização.

Tabela 16. Resultados do teste cervical simples (TCS) para diagnóstico de tuberculose em bovinos sensibilizados com *Mycobacterium avium*, de acordo com o tempo (dias) após a sensibilização (PS).

Tempo	Dias PS	Número de testes	Teste cervical simples					
			Positivo		Inconclusivo		Negativo	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	60 a 90	20	4	20,0	7	35,0	9	45,0
2	91 a 150	13	0	0,0	5	38,5	8	61,5
3	151 a 230	12	3	25,0	2	16,7	7	58,3
4	231 a 300	14	0	0,0	3	21,4	11	78,6
5	301 a 500	13	1	7,7	1	7,7	11	84,6
6	>500	13	2	15,4	5	38,5	6	46,2
Geral		85	10	11,7	23	27,1	52	61,2

Fonte: Pesquisa Própria.

No TCC, todos os animais sensibilizados com *M. avium* apresentaram resultado negativo. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre as proporções de positivos conforme o tempo após a sensibilização. Váldez, Piratelli-Filho, Costa, Ribeiro, Nascimento e Soares (2014) obtiveram resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo quando desconsideraram os resultados inconclusivos para interpretar os resultados do TCC, observando que o diagnóstico final não sofreu alteração, de modo que os diagnósticos negativos devem ser considerados como conclusivos.

A proporção de positivos no TCS em animais sensibilizados com *M. bovis* foi maior (74,4%) na primeira faixa de tempo (60 a 90 dias após a sensibilização) e foi diminuindo (35,9%) até a quarta faixa (231 a 300 dias), e voltou a subir. Deve-se observar, ainda, que nessa quarta faixa aumentou a proporção de resultados inconclusivos (Tabela 17). Observou-se que a proporção de reagentes na sexta faixa de tempo (>500 dias) não diferiu significativamente das proporções das demais faixas, embora algumas das comparações entre as outras faixas tenham apontado diferença significativa. Analisando os dados de Almeida, Madruga, Soares, Fernandes, Carvalho, Jorge e Osório (2006) constata-se que todos os 16 (100%) animais apresentaram resultado positivo no TCS 60 dias após a sensibilização com *M. bovis*, resultado diferente do observado no presente estudo, que apontou 74,4% de positivos após 60 a 90 dias.

Tabela 17. Resultados do teste cervical simples (TCS) para diagnóstico de tuberculose em bovinos sensibilizados com *Mycobacterium bovis*, de acordo com o tempo (dias) após a sensibilização (PS).

Tempo	Dias PS	Número de testes	Teste cervical simples					
			Positivo		Inconclusivo		Negativo	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	60 a 90	78	58	74,4	10	12,8	10	12,8
2	91 a 150	53	38	71,7	8	15,1	7	13,2
3	151 a 230	43	30	69,8	7	16,3	6	14,0
4	231 a 300	39	14	35,9	14	35,9	11	28,2
5	301 a 500	54	25	46,3	8	14,8	21	38,9
6	>500	23	15	65,2	3	13,0	5	21,7
Geral		290	180	62,1	50	17,2	60	20,7

Fonte: Pesquisa Própria.

No TCC, a proporção de positivos entre os animais sensibilizados com *M. bovis* foi maior na primeira faixa de tempo após a sensibilização (51,3%), e essa proporção foi diminuindo até a quinta faixa (27,8%), voltando a subir na faixa com mais de 500 dias de sensibilização (Tabela 18). Também nesse caso a proporção de positivos na sexta faixa de tempo não diferiu significativamente das demais. Diferença significativa foi observada entre a primeira e a quarta faixa ($P=0,04748$) e entre a primeira e a quinta faixa ($P=0,02758$), sendo não significativas as demais diferenças observadas (Tabela 19). Esses dados diferem das observações de Almeida, Madruga, Soares, Fernandes, Carvalho, Jorge & Osório (2006), que observaram 12 (75%) positivos no TCC entre 16 bovinos após 60 dias de sensibilização com *M. bovis*; os outros quatro (25%) foram inconclusivos, não tendo sido observados resultados negativos.

Tabela 18. Resultados do teste cervical comparativo (TCC) para diagnóstico de tuberculose em bovinos sensibilizados com *Mycobacterium bovis*, de acordo com o tempo (dias) após a sensibilização (PS).

Tempo	Dias PS	Número de testes	Teste cervical comparativo					
			Positivo		Inconclusivo		Negativo	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	60 a 90	78	40	51,3	12	15,4	26	33,3
2	91 a 150	53	25	47,2	10	18,9	18	34,0
3	151 a 230	43	17	39,5	12	27,9	14	32,6
4	231 a 300	39	11	28,2	10	25,6	18	46,2
5	301 a 500	54	15	27,8	14	25,9	25	46,3
6	>500	23	8	34,8	6	26,1	9	39,1
Geral		290	116	40,0	64	22,1	110	37,9

Fonte: Pesquisa Própria.

Tabela 19. Comparação, por meio do teste exato de Fisher, das proporções de resultados positivos no teste cervical comparativo (TCC) entre cada faixa de tempo após a sensibilização com *Mycobacterium bovis*, desconsiderando os resultados inconclusivos.

Comparações	Valor de P
1x2	0,8433
1x3	0,6606
1x4	0,04748
1x5	0,02758
1x6	0,4105
2x3	0,8155
2x4	0,1488
2x5	0,07949
2x6	0,5666
3x4	0,2081
3x5	0,1589
3x6	0,764
4x5	1,0
4x6	0,7571
5x6	0,563

Fonte: Pesquisa Própria.

Nos bovinos sensibilizados com *M. bovis*, o TPC revelou uma proporção de 77,6% (59/76) de positivos em animais após 60-90 dias de sensibilização. Essa proporção aumentou ligeiramente aos 91-150 dias (80,0%) e aos 151-230 (81,0%), diminuindo aos 231-300 (61,5%) e aos 301-500 (45,3%), mas voltando a subir após 500 dias de sensibilização (65,0%), conforme mostram os dados da Tabela 20. Foram significativas as diferenças entre a faixa 301-500 e as faixas 60-90, 91-150 e 151-230, as quais não diferiram entre si. É relevante destacar que a proporção de positivos com mais de 500 dias após a sensibilização não diferiu significativamente das proporções de positivos nas demais faixas de tempo (Tabela 21).

Tabela 20. Resultados do teste da prega caudal (TPC) para diagnóstico de tuberculose em bovinos sensibilizados com *Mycobacterium bovis*, de acordo com o tempo (dias) após a sensibilização (PS).

Tempo	Dias PS	Número de testes	Teste da prega caudal			
			Positivo		Negativo	
			Nº	%	Nº	%
1	60 a 90	76	59	77,6	17	22,4
2	91 a 150	50	40	80,0	10	20,0
3	151 a 230	42	34	81,0	8	19,0
4	231 a 300	39	24	61,5	15	38,5
5	301 a 500	53	24	45,3	29	54,7
6	>500	20	13	65,0	7	35,0
Geral		280	194	69,3	86	30,7

Fonte: Pesquisa Própria.

Tabela 21. Comparação, por meio do teste exato de Fisher, das proporções de resultados positivos no teste da prega caudal (TPC) entre cada faixa de tempo após a sensibilização com *Mycobacterium bovis*, desconsiderando os resultados inconclusivos.

Comparações	Valor de P
1x2	0,8267
1x3	0,815
1x4	0,08111
1x5	0,0003281
1x6	0,2575
2x3	1,0
2x4	0,06204
2x5	0,0004748
2x6	0,2233
3x4	0,08335
3x5	0,0006086
3x6	0,2108
4x5	0,1432
4x6	1,0
5x6	0,19

Fonte: Pesquisa Própria.

Sensibilidade do método de diagnóstico é a proporção de positivos verdadeiros detectados por este e a especificidade do método é a proporção de negativos verdadeiros detectados por este (Thrusfield, 2010). Em programas sanitários, procura-se usar testes de diagnóstico que combinem elevada sensibilidade com elevada especificidade, o que nem sempre é possível. O teste tuberculínico é eficaz na detecção precoce de casos pré-clínicos de infecção por *M. bovis* em bovinos, o que permite a rápida remoção dos animais infectados, auxiliando a limitar a transmissão da doença, e por isso tem sido uma ferramenta muito útil no controle e na erradicação da tuberculose bovina em muitos países. No entanto, um resultado negativo no teste da tuberculina não significa que o animal não está infectado com *M. bovis*, enquanto um resultado positivo pode representar uma resposta imunológica na forma de uma reação de hipersensibilidade retardada à tuberculina devido a uma infecção ou exposição a outras bactérias que partilham antígenos semelhantes aos de *M. bovis* (Kaya, Içen, Tuzcu, Simsek, Yesilmen, Yildirim & Alan, 2015).

O presente estudo demonstrou, em animais não sensibilizados, especificidade de 96,3% no TCS, de 98,3% no TCC e de 97,3% no TPC. Já em animais sensibilizados com *M. avium* a especificidade foi de 61,2% no TCS, 100% no TCC e de

76,5% no TPC. Esses resultados estão de acordo com o conhecimento que se tem desses testes, uma vez que se espera maior especificidade do teste cervical comparativo (Brasil, 2006). No caso da sensibilidade, nos animais sensibilizados com *M. bovis*, os resultados obtidos foram de 62,1% no TCS; 40% no TCC e de 69,3% no TPC, indicando, conforme esperado, menor sensibilidade do TCC (Brasil, 2006).

Em animais não sensibilizados, a especificidade do TCS, no geral, foi de 96,3%, a do TCC foi de 98,3%, e a do TPC foi de 97,3%. Analisando os intervalos de confiança 95% pode-se constatar que não houve diferença significativa entre a especificidade desses testes, o mesmo podendo-se afirmar quando se considera apenas a primeira vez em que cada animal foi testado.

Casseb, Negrão, Casseb, Silva, Rodrigues, Lima e Langoni (2015), em estudo realizado com búfalos não sensibilizados da Ilha de Marajó, observaram alta especificidade no TCC quando considerados apenas animais positivos e negativos, fato este também observado no presente estudo. Mesmo sendo comparados animais de diferentes espécies, o teste demonstra ser efetivo tanto para bovinos como para bubalinos, assim como preconizado pelo Ministério (Brasil, 2006).

A especificidade do TCS, 96,3%, está próxima daquela observada por Wood, Corner, Rothel, Ripper, Fifis, McCormick, Francis, Melville, Small, De Witte, Tolson, Ryan, De Lisle, Cox e Jones (1992), que encontraram o valor 96,7%. Esses valores são maiores do que os descritos por Pinto (2015) em animais em condições de campo, 84,48% para o TCS e 91,38% para o TCC. Já a especificidade do TCC observada no presente estudo mostrou-se um pouco abaixo da relatada por Ameni, Miörner, Roger e Tibbo (2000), que observaram resultado negativo em todos os animais não infectados. Deve-se mencionar que os valores aqui observados não diferem significativamente da maioria daqueles relatados na literatura, especialmente quando se leva em consideração o intervalo de confiança.

A especificidade do TCS em animais sensibilizados com *M. avium* foi, no geral, de 61,2% (50,8% - 71,5%). Analisando essa especificidade de acordo com a faixa de tempo após a sensibilização observa-se variação de 45,0% (60 a 90 dias após) a 84,6% (301 a 500 dias após), mas os intervalos de confiança mostram que a diferença não é significativa.

O TCC em animais sensibilizados com *M. avium* apresentou especificidade geral de 100% (95,7% - 100%), uma vez que em todos os testes os resultados foram negativos. Também as especificidades nas faixas de tempo após a sensibilização foram de 100,0%, com pequenas diferenças nos limites inferiores do intervalo de confiança, mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Nos animais sensibilizados com *M. avium*, o TPC apresentou sensibilidade geral de 76,5% (67,5% - 85,5%). Nas faixas de tempo após a sensibilização, a especificidade variou de 55,0% a 92,9%, porém a diferença entre essas faixas não foi significativa. Nesses animais, a especificidade geral do TCC foi significativamente maior do que a do TCS e a do TPC, e essas duas últimas não diferiram significativamente entre si.

A sensibilidade do TCS em animais sensibilizados com *M. bovis* foi, no geral, de 62,1% (56,5% - 67,7%). Essa sensibilidade é significativamente inferior a valores encontrados na literatura relatando a avaliação do teste em animais naturalmente infectados: 68,7% (Wood, Corner, Rothel, Ripper, Fifis, McCormick, Francis, Melville, Small, De Witte, Tolson, Ryan, De Lisle, Cox e Jones (1992)), 70,3% (Scacchia, Lelli, Petrini, Prencipe, Calistri & Giovannini, 2000), 80,2% (Llamazares, Martín, Nistal, Redondo, Rodríguez & Ferri, 1999), 84,48% (Pinto, 2015). Tal diferença pode ser explicada pelo fato de a infecção natural proporcionar estímulo imune constante, o que não ocorre no caso da sensibilização com inóculos inativados. Além disso, diferenças podem ser consequência de critérios diferentes na execução do cálculo. Por exemplo, no estudo de Pinto (2015) os resultados inconclusivos foram considerados positivos, o que acarreta maior sensibilidade, ao passo que no presente estudo os inconclusivos foram desconsiderados.

Nas diversas faixas de tempo após a sensibilização, a sensibilidade variou de 74,4% (60 a 90 dias) a 46,3% (301 a 500 dias), e foi observada diferença significativa entre alguns dos valores dessas faixas.

A sensibilidade geral do TCC em animais sensibilizados com *M. bovis* foi de 40,0% (34,4% - 45,6%). Esse resultado é bem inferior ao relatado por Ameni et al. (2000) em animais naturalmente infectados (90,9%) e ao de Pinto (2015), 74,14%. A sensibilidade do teste conforme o tempo após a sensibilização variou de 51,3% (30-90 dias) a 27,8% (301-500 dias), e a única diferença significativa observada foi justamente entre essas duas faixas com valores extremos.

Kantor, Odeón, Stefan, Aianuza, Madrid e Marchevsky (1984), em trabalho realizado em Buenos Aires, na Argentina, descreveram que o teste cervical simples, quando utilizada uma dose de 0,1 mg de PPD bovina, apresenta uma baixa sensibilidade. No presente estudo, além da diferença na dosagem de PPD bovina utilizada, observou-se que a sensibilidade do TCS foi significativamente superior à do TCC.

O TPC apresentou, em animais sensibilizados com *M. bovis*, sensibilidade geral de 69,3% (63,9% – 74,7%). Nas faixas de tempo após a sensibilização a sensibilidade variou de 81,0% a 45,3%, tendo sido observada diferença significativa entre os valores observados para a faixa de 301 a 500 dias e as faixas 60-90, 91-150 e 151-230, e essas três não diferiram entre si. Comparando a sensibilidade geral dos três testes nesses animais, verifica-se que o TCC apresentou sensibilidade significativamente inferior às dos outros dois testes, os quais não diferiram entre si.

Kantor, Odeón, Stefan, Aianuza, Madrid e Marchevsky (1984) também observaram que o TPC apresentou sensibilidade maior do que o TCC e sensibilidade próxima ao do TCS, mas vale ressaltar que nesse estudo foram avaliadas também diferentes doses de PPD. Já Casseb, Negrão, Casseb, Silva, Rodrigues, Lima e Langoni (2015), em estudo realizado com búfalos da Ilha de Marajó, concluíram que o TCC apresentou o melhor desempenho, combinando elevada especificidade e elevada sensibilidade.

Quando observados os valores de sensibilidade e especificidade do teste cervical simples (TCS) e do teste cervical comparativo (TCC) conforme a variação do ponto de corte, de modo a observar qual ponto proporciona melhor combinação de sensibilidade e especificidade. Os valores de sensibilidade e de especificidade do TCS observados nos diversos pontos de corte, bem como a soma dessas duas características, podem ser observados na Tabela 22. Constata-se que o ponto de corte 2,0 mm proporcionou a maior soma das duas características, indicando melhor combinação. Pinto (2015), em animais naturalmente infectados, constatou que a melhor combinação nesse teste estava no ponto de corte 3,15 mm.

Tabela 22. Sensibilidade (S), especificidade (E) e soma desses dois valores (S + E) do teste cervical simples (TCS) para diagnóstico da tuberculose bovina, segundo o ponto de corte adotado (aumento da dobra da pele em mm).

Aumento (mm)	S	E	S + E
≤0,4	100,0	0,00	100,00
0,5	94,37	42,08	136,45
1,0	88,08	63,38	151,46
1,5	84,77	79,48	164,25
2,0	81,13	88,05	169,18
2,5	76,49	92,21	168,70
3,0	72,19	94,55	166,73
3,5	66,56	95,84	162,40
4,0	63,58	97,40	160,98
4,5	58,61	98,44	157,05
5,0	53,64	98,44	152,08
5,5	48,34	98,70	147,05
6,0	42,72	98,96	141,68
8,0	23,84	99,22	123,06
10,0	14,57	99,74	114,31
15,0	3,97	100,0	103,97
20,0	1,32	100,0	101,32
30,0	0,33	100,0	100,33
40,0	0,00	100,0	100,00

Fonte: Pesquisa Própria.

No gráfico abaixo (Figura 1) também pode ser constatado o ponto de corte que proporciona melhor soma de sensibilidade e especificidade (2,0 mm).

Figura 1. Soma de sensibilidade e especificidade do teste cervical simples (TCS) para diagnóstico da tuberculose bovina, conforme o ponto de corte.

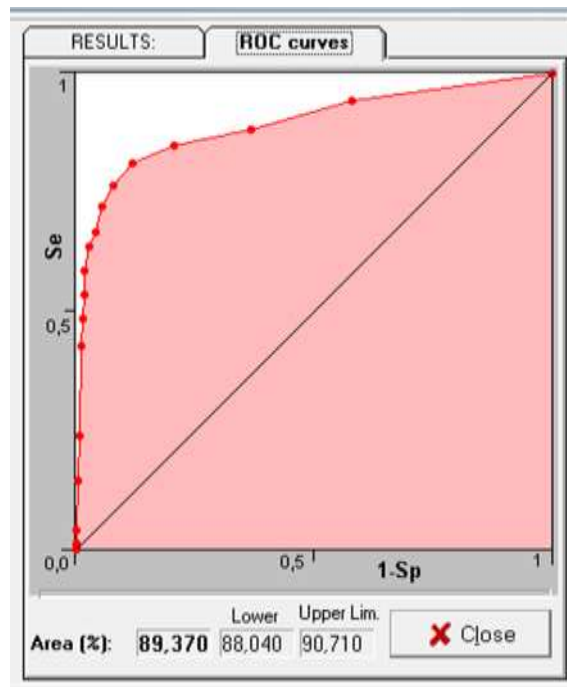


Fonte: Pesquisa Própria.

O gráfico da curva ROC é formado colocando a sensibilidade em um eixo e o inverso da especificidade no outro, de modo que no ângulo superior esquerdo localiza-se o valor de 100% tanto da sensibilidade quanto da especificidade. Quanto mais esses valores se aproximam de 100%, mais a área sob a curva se aproxima também de 100%, e quanto mais essa área se aproxima de 50% (linha diagonal), mais a concordância entre os dois testes se aproxima de um modelo aleatório.

Nos dois testes avaliados no presente estudo, a área sob a curva ROC ficou na faixa entre 80% e 90%, conforme se observa na Figura 2, ou seja, 89,37% (IC 95%: 88,04% - 90,71%) para o TCS e 87,9% (IC 95%: 86,41% - 89,39%) para o TCC. Esses valores estão próximos dos observados por Pinto (2015), que obtiveram 88,9% e 87,9% para o TCS e o TCC, respectivamente, e indicam bom desempenho do teste, uma vez que se situam entre 80% e 90% (Martinez, Louzada-Neto & Pereira, 2003; Câmara, 2016).

Figura 2. Curva ROC (receiver operating characteristic) referente aos resultados de sensibilidade e especificidade do teste cervical simples (TCS) para diagnóstico da tuberculose bovina.



Fonte: Pesquisa Própria.

Quanto ao TCC, o ponto de corte com maior soma de sensibilidade e especificidade foi 1,0 mm (Tabela 23). Esse baixo ponto de corte talvez possa estar associado a uma resposta imune menos intensa por parte de animais sensibilizados com inóculos inativados, mas é interessante mencionar que Pinto (2015), estudando animais em condições naturais, encontrou o valor de 1,6 mm como o ponto de corte com melhor combinação de sensibilidade e especificidade, valor esse bastante abaixo daquele estabelecido pelo PNCEBT para a interpretação dos testes.

Tabela 23. Sensibilidade (S), especificidade (E) e soma desses dois valores (S + E) do teste cervical comparativo (TCC) para diagnóstico da tuberculose bovina, de acordo com o ponto de corte adotado (aumento da dobra da pele em mm).

Aumento (mm)	S	E	S + E
≤0,4	100,00	0,00	100,00
0,5	81,13	83,64	164,76
1,0	77,15	92,47	169,62
1,5	70,86	96,62	167,48
2,0	63,58	98,44	162,02
2,5	56,95	99,22	156,17
3,0	53,31	99,74	153,05
3,5	46,03	99,74	145,77
4,0	42,05	100,00	142,05
4,5	36,42	100,00	136,42
5,0	29,80	100,00	129,80
5,5	26,16	100,00	126,16
6,0	22,85	100,00	122,85
8,0	12,58	100,00	112,58
10,0	7,28	100,00	107,28
13,0	3,31	100,00	103,31
16,0	2,32	100,00	102,32
20,0	0,99	100,00	100,99
25,0	0,33	100,00	100,33
30,0	0,00	100,00	100,00

Fonte: Pesquisa Própria.

Registre-se que o ponto de corte com a melhor combinação de sensibilidade e de especificidade resultou em valores superiores (soma de especificidade com sensibilidade) àqueles obtidos com o ponto de corte (4,0 mm) estabelecido pela legislação para diagnóstico da tuberculose em animais naturalmente infectados. No caso do TCS, o ponto de corte de 2,0 mm proporcionou soma de sensibilidade e especificidade igual a 169,18, e o ponto de corte 4,0 mm proporcionou soma igual a 160,98. No caso do TCC, a diferença foi ainda maior, pois o ponto de corte com maior soma (1,0 mm) resultou em 169,62, ao

passo que o ponto de corte 4,0 resultou em 142,05. Entretanto, deve-se considerar também que, no caso do diagnóstico de rotina, tanto no TCS quanto no TCC, a legislação prevê a adoção de medidas sanitárias também em animais classificados como inconclusivos, ou seja, aqueles com aumento de espessura da dobra de pele entre 2,0 e 3,9 mm (Brasil, 2004).

4. Conclusão

Em animais não sensibilizados e em animais sensibilizados com *M. avium* não se observou diferença significativa entre as proporções de resultados positivos no teste cervical simples, no teste cervical comparativo e no teste da prega caudal conforme o número de vezes em que o animal foi testado. Em animais sensibilizados com *M. bovis* foram observadas diferenças, mas é possível que essas diferenças também estejam relacionadas com o tempo após a sensibilização.

Com o transcorrer do tempo após a sensibilização com *M. avium*, observou-se redução na proporção de positivos no teste cervical simples e no teste da prega caudal, embora essa redução não tenha sido estatisticamente significativa. Nos animais sensibilizados com *M. bovis*, observou-se redução na proporção de animais positivos conforme o tempo após a sensibilização, nos três testes estudados, sendo algumas das diferenças significativas e outras não, mas a observação mais surpreendente foi que a proporção de positivos após mais de 500 dias de sensibilização não diferiu significativamente das proporções de positivos nas outras faixas de tempo pós-sensibilização.

Em animais não sensibilizados, não se observou diferença significativa entre a especificidade dos três testes analisados. Já em animais sensibilizados com *M. avium*, a especificidade do teste cervical comparativo foi significativamente maior do que a especificidade dos outros dois testes.

A sensibilidade do teste cervical comparativo em animais sensibilizados com *M. bovis* foi significativamente inferior à sensibilidade dos outros dois testes. Observou-se influência do tempo após a sensibilização na sensibilidade diagnóstica dos três testes analisados.

Englobando os resultados dos três grupos de animais, o teste cervical simples apresentou concordância boa com o teste cervical comparativo e com o teste da prega caudal. Já a concordância entre o teste cervical comparativo e o teste da prega caudal pode ser classificada como regular.

Em animais não sensibilizados, a resposta à tuberculina aviária foi significativamente superior à resposta à tuberculina bovina.

A repetição dos testes não influenciou significativamente na resposta à tuberculina aviária nem na resposta à tuberculina bovina em animais não sensibilizados.

O tempo após a sensibilização influenciou na resposta às tuberculas, exceto no caso da resposta de animais sensibilizados com *M. avium* à tuberculina aviária, situação em que não se observou diferença significativa entre as respostas nas diversas faixas de tempo.

Tanto em animais sensibilizados com *M. avium* quanto em animais sensibilizados com *M. bovis* a diferença entre as respostas à tuberculina aviária e as respostas à tuberculina bovina foi significativa.

Não se observou normalidade na distribuição das frequências das respostas dos bovinos não sensibilizados, tanto quando foram inoculados com tuberculina aviária quanto quando foram inoculados com tuberculina bovina.

Não se observou normalidade na distribuição das frequências das respostas à tuberculina aviária e à tuberculina bovina, em bovinos sensibilizados com *Mycobacterium avium*, nos dados gerais, tendo sido observada normalidade nas respostas em alguns períodos pós-sensibilização e também em dados transformados em raiz quadrada e dados transformados em $\log_{10} x+1$.

Em bovinos sensibilizados com *M. bovis* não se observou normalidade na distribuição dos dados gerais, em resposta à tuberculina aviária e à tuberculina bovina. Foi observada normalidade apenas nas respostas após quinhentos dias de

sensibilização. Em alguns outros períodos de tempo após a sensibilização observou-se normalidade apenas após a transformação dos dados.

Referências

- Abrahão, R. M. C. M. (1998). Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. Dissertação de mestrado em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Almeida, R. F. C., Madruga, C. R., Soares, C. O.; Fernandes, M. C.; Carvalho, N. M., Jorge, K. S. G. & Osório, A. L. A. R. (2006). Resposta imune específica de bovinos experimentalmente sensibilizados com inóculos inativados de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 26(4), 195-200.
- Ameni, G., Mjörner, H., Roger, F. & Tibbo, M. (2000). Comparison between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. *Tropical Animal and Production*, 32, 267-276.
- Brasil. (2004). Instrução Normativa SDA n.6, de 08 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 jan., Seção 1, 6-10.
- Brasil. (2006). Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 184 p.
- Câmera, F. P. (2016). Psiquiatria e estatística. Validação de procedimentos de diagnóstico pela curva ROC. *Psychiatry on line Brasil*, 21.
- Casseb, A. R., Negrão, A. G., Casseb, L. M. N., Silva, S. P., Rodrigues, E. D. L., Lima, W. F. & Langoni, H. (2015). Comparação de três testes de tuberculina usados para o diagnóstico de tuberculose em búfalos de água na Ilha de Marajó. *Veterinária e Zootecnia*, 22(2), 231-237.
- Corrêa, W. M. & Corrêa, C. N. M. (1992). Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos – Tuberculose. (2a ed.), Editora Médica e Científica, 317–337.
- Embrapa Gado de Leite. (2020). Pecuária de leite espera crescer cerca de 2% em 2020. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/4935845/1/pecuaria-de-leite-espera-crescer-cerca-de-2-em-2020>
- Guimarães, G. M., Mateus, L. S., Moraes, A. I. P.; Da Costa, W. S., Soares, N. R., Dos Santos, L. S. & Dos Santos, P. A. (2020). Qualidade do leite in natura perante a instrução normativa IN 76 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. *Research, Society and Development*, 9 (9), 1-19.
- Jorge, K. S. G. (2001). Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Dissertação de mestrado, FIOCRUZ/UFMS, Campo Grande, MS.
- Kantor, I. N., Odeón, A. C.; Stefan, P. E.; Aianuza, M. J.; Madrid, C. R. & Marchevsky, N. (1984). Sensitivity of the cervical and the caudal fold tuberculin tests with *Mycobacterium bovis* in infected cattle of Argentina. *Revue Scientifique et technique International Office of Epizootics*, 3 (1), 137-150.
- Kaya, A., Içen, H., Tuzcu, N., Simsek, A., Yesilmen, S., Yildirim, I. & Alan, A. (2015). Comparison of tuberculin skin test, IFN- γ assay, real time PCR and lateral flow rapid test in diagnosis of field outbreaks of bovine tuberculosis. *Kafkas University Veterinary Fak Derg*, 21(5), 739-743.
- Llamazares, O. R. G., Martín, C. B. G.; Nistal, D., Redondo, V. A. P., Rodríguez, L. D. & Ferri, E. F. R. (1999). Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Veterinary Microbiology*, 70, 55-66.
- Martinez, E. Z., Louzada-Neto, F. & Pereira, B. B. (2003). A curva ROC para testes diagnósticos. *Cadernos de Saúde Coletiva*, 11 (1), 7-31.
- Monaghan, M. L.; Doherty, M. L.; Collins, J. D.; Kazda, J. F. & Quinn, P. J. (1994). *The tuberculin test*. *Veterinary Microbiology*, 40, p.111-124.
- Pereira, M. G. (1995). Epidemiologia. Teoria e prática. Guanabara Koogan, 596 p.
- Pereira, A. S.; Shitsuka, D. M.; Parreira, F. J. & Shitsuka, R. (2018). Metodologia de Pesquisa Científica. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 119 p.
- Pinto, F. O. (2015) Métodos estatísticos e neurais para o diagnóstico da tuberculose bovina via testes cervicais. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Pritchard, D. G. (1988). A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *Journal of Comparative Pathology*, 99(4), 357-399.
- Roxo, E. (1996). Tuberculose bovina: Revisão. *Arquivos do Instituto Biológico*, 63(2), 91-97.
- Scacchia, M., Lelli, R., Petrini, A., Prencipe, V., Calistri, P & Giovannini, A. (2000). Use of innovative methods in the eradication of bovine tuberculosis. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 47, 321-327.
- Sim, J. & Wright, C. C. (2005). The kappa statistic in reliability studies: Use, interpretation, and sample size requirements. *Physical Therapy*, 85(3), 257-268.
- Siqueira, A. L. & Tibúrcio, J. D. (2011). Estatística na área da saúde: conceitos, metodologia, aplicações e prática computacional. Belo Horizonte: Coopmed, 520 p.
- Stevenson, M. (2012). An R package for the analysis of epidemiological data. Version 0.9-43. Recuperado de: <http://epicentre.massey.ac.nz>.
- Thrusfield, M. (2010). *Veterinary epidemiology*. Blackwell. (3a ed). 610 p.

Wood, P. R., Corner, L. A., Rothel, J. S., Ripper, J. L., McCormick, B. S., Francis, B., Melville, L., Small, K., De Witte, K., Tolson, J., Ryan, T. J., De Lisle, G. W., Cox, J. C. & Jones, J. C. (1992). A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 31, 71-79.

Váldez, R. A., Piratelli-Filho, A., Costa, H. L., Ribeiro, A. M. C. L., Nascimento, M. D. & Soares, P. M. (2014). A metrological contribution to the diagnosis of bovine tuberculosis. *British Journal of Applied Science & Technology*, 4(34), 4771-4790.

Varello, K., Pezzolato, M., Mascarino, D., Ingravalle, F., Caramelli, M. & Bozzetta, E. (2008). Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 64-169.