

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 50/2008
(MAPA) NA MELHORIA DA PURIFICAÇÃO DAS VACINAS CONTRA A FEBRE
AFTOSA COMERCIALIZADAS NO BRASIL.

JOÃO MARCOS NACIF DA COSTA

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 50/2008
(MAPA) NA MELHORIA DA PURIFICAÇÃO DAS VACINAS CONTRA A
FEBRE AFTOSA COMERCIALIZADAS NO BRASIL.**

Autor: João Marcos Nacif da Costa

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Epidemiologia, Saneamento e Profilaxia.**

**Orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo
Corbellini**

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

COSTA, JOAO MARCOS NACIF DA
AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DA INSTRUÇÃO NORMATIVA
N° 50/2008 (MAPA) NA MELHORIA DA PURIFICAÇÃO DAS
VACINAS CONTRA A FEBRE AFTOSA COMERCIALIZADAS NO
BRASIL. / JOAO MARCOS NACIF DA COSTA. -- 2018.
46 f.
Orientador: LUIS GUSTAVO CORBELLINI.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. febre aftosa. 2. vacina. 3. inquérito
soroepidemiológico. 4. DIVA. 5. especificidade. I.
CORBELLINI, LUIS GUSTAVO, orient. II. Título.

João Marcos Nacif da Costa

AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 50/2008
(MAPA) NA MELHORIA DA PURIFICAÇÃO DAS VACINAS CONTRA A FEBRE
AFTOSA COMERCIALIZADAS NO BRASIL.

Aprovada em 15 de março de 2018

APROVADO POR:

Prof. Dr. Luis Gustavo Corbellini
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Álvaro Vigo
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Membro da Comissão

Prof. Dr. Mauro Rigert Borba
Membro da Comissão

*Ao meu pai, João Luiz (in memoriam),
por me mostrar o valor do caminho e
aos meus filhos, Henrique e Isadora,
por me ensinarem a direção.*

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Fernanda, pelos incentivos, conselhos e pelo suporte nos momentos mais críticos do desenvolvimento deste trabalho. Eu te amo.

Ao meu orientador Luis Gustavo Corbellini, pelos ensinamentos, paciência e motivação, assim como aos amigos do Laboratório de Epidemiologia Veterinária, Ana Paula, Augusto, Bernardo, Eduardo, Gustavo, Mauro e Waldemir, por terem me recebido cordialmente no grupo e pelo aprendizado.

Aos meus amigos, Diego Viali, Fábio Marcelo e José Ravison, idealizadores e parceiros no desenvolvimento deste estudo, e aos colegas do LANAGRO-RS, especialmente, o pessoal do Laboratório de Diagnóstico, pela compreensão e os esforços nas minhas ausências.

Aos colegas do DSA e DFIP pela colaboração com os dados aqui utilizados.

A minha mãe Regina, pelo o exemplo de caráter e dedicação, que junto ao meu pai me deu toda a estrutura para chegar onde estou e a toda minha família pela compreensão pela minha ausência em momentos importantes nos últimos dois anos.

RESUMO

A febre aftosa é causada por um vírus do gênero *Aphthovirus*, cujas proteínas não estruturais (PNE) estão relacionadas diretamente a replicação viral e são comuns a todos os sorotipos e, portanto, são mais adequadas à pesquisa de anticorpos contra este vírus. Métodos de diagnóstico capazes de diferenciar animais infectados de vacinados aliados ao uso de vacinas purificadas quanto à PNE são imprescindíveis na estratégia para comprovação de ausência de transmissão viral. Através da Instrução Normativa nº 50/2008, o Brasil passou a realizar o controle oficial da pureza nas vacinas contra a febre aftosa. O objetivo deste trabalho foi avaliar se as chances de encontrar bovinos reativos aos testes sorológicos serão maiores antes da implantação do controle oficial, tanto nos resultados do controle oficial das vacinas, quanto nos inquéritos. Para isto, foram utilizados modelos de regressão logística com efeitos aleatórios, interações e controle de possíveis confundidores. Os resultados demonstraram que no realizado em laboratório oficial em 1016 partidas de vacinas, observou-se que a chance de ocorrência de resultados reativos antes da implantação da norma utilizando o método de triagem ELISA 3ABC NCPanaftosa foi 2,86 (IC95%,1,92-4,14) vezes a chance de ocorrência nos testes de vacina feitos após a norma, utilizando-se o mesmo método de triagem. Já a chance de resultados reativos antes da norma, utilizando-se o método NCPanaftosa, foi 19,70 (IC 95%,8,55- 45,37) vezes a chance de ocorrência após a norma com o uso do método PrioCHECK como triagem. Já, a partir da comparação entre inquéritos soroepidemiológicos, foi possível observar que antes da implantação da IN50/2008 a chance de ocorrência de resultados reativos em bovinos que receberam uma dose de vacina foi 2,22 (IC 95%, 1,22-4,06) vezes a chance da ocorrência em bovinos não vacinados. Já, a chance de ocorrência de resultados reativos em bovinos que receberam duas ou três vacinas foi 5,94 (IC 95%, 3,25-10,87) vezes a de bovinos não vacinados. Nas estimativas modeladas para os inquéritos soroepidemiológicos realizados após a implantação da norma, independentemente do método de triagem utilizado, não houve associação significativa entre diferentes doses de vacinas e a ocorrência de animais reativos. Os resultados obtidos sugerem que há uma associação do controle oficial com a melhoria da produção de vacinas no que diz respeito a purificação do antígeno, assim como, indicam que a melhoria na pureza está associada à diminuição na chance de ocorrência de bovinos reativos em inquéritos soroepidemiológicos, ou seja, redução nos falso-positivos a campo.

Palavras chave: febre aftosa, vacina, inquérito soroepidemiológico, DIVA, especificidade.

ABSTRACT

Foot and mouth disease (FMD) is a highly contagious disease caused by an Aphthovirus. Non-structural proteins (NSP) of this virus are directly related to viral replication and are common to all serotypes. Therefore, are more suitable for antibodies-based serological diagnosis. Diagnostic methods capable of differentiating infected from vaccinated animals (DIVA) are important surveillance tools; however, strategies should be in step with the development of vaccines. Since January 2009, the Brazilian government has been conducting an official control to evaluate NSP purity in vaccines production through the Normative Instruction No. 50 from 2008. This paper evaluates the situation of the vaccines produced in Brazil regarding NSP purification based on the results of the official control carried out by MAPA, as well as the adequacy of the surveillance system based on seroepidemiological surveys. Logistic regression with random effects, interactions and control for potential confounders were the chosen models. For the data obtained from the control of vaccines carried out in the official laboratory, the model estimated that the chance of occurrence of seroreactive results before the application of the official control using the 3ABC NCPanaftosa ELISA as screening method was 2.86 (95% CI, 1.92-4.14) times the chance of occurrence in the vaccine tests made after the standard, using the same method. The chance of seroreactive results before the official control, using the NCPanaftosa method as screening, was 19.70 (95% CI, 8.55 to 45.37) times the chance of occurrence after the official control with the use of the PrioCHECK method. Comparing the seroepidemiological surveys results, the model indicated that, before the official control of vaccine purity, the chance of occurrence of reactive results in cattle receiving a single dose of vaccine was 2.22 (95% CI, 1.22 -4.06) times the chance of occurrence in unvaccinated animals. Furthermore, the chance of occurrence of reactive results in animals receiving two or three vaccines was 5.94 (95% CI, 3.25-10.87) times that of unvaccinated animals. Despite that, there was no significant difference in the estimates of the odds ratio between different doses of vaccines regardless of the screening method used for the seroepidemiological surveys performed after the official control of vaccines purity,. The present study suggests that there is an association of the implementation of Normative Instruction No. 50 from 2008 with the improvement of the NSP purity of vaccines, as well as indicates that this improvement is associated with a decrease in chance of occurrence of reactive animals in seroepidemiological surveys, i.e., reduction of false-positives in field monitoring.

Key words: *Foot-and-mouth disease, FMD, vaccine, seroepidemiological surveys, DIVA strategies, specificity.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de vacinações e colheita de soro dos testes de vacinas	19
Figura 2 – Gráfico da média da probabilidade predita para a ocorrência de bovinos reativos conforme o aumento no número de doses de vacina aplicadas (“0”, “1” e “2 ou 3”)......	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados dos testes de controle de pureza de vacinas realizados pelo MAPA entre os anos 2008 e 2015 agrupados em relação a situação frente a implantação da IN 50/2008 e ao método utilizado.....	24
Tabela 2 - Resultados da regressão logística utilizando os dados do controle de vacinas contra a febre aftosa pelo MAPA de 2008 a 2015.....	25
Tabela 3 - Estatística descritiva dos inquéritos soropidemiológicos realizados pelo MAPA entre os anos 2004 a 2014 agrupados em relação a situação frente a implantação da IN 50/2008	26
Tabela 4 - Resultados da regressão logística utilizando os dados dos inquéritos soropidemiológicos realizados pelo MAPA de 2004 a 2014 – Modelo univariável e modelo com interação e ajustado.....	27
Tabela 5 - Resultados da regressão logística utilizando os dados dos inquéritos soropidemiológicos realizados pelo MAPA de 2004 a 2014 – Modelo com interação e ajustado demonstrando a razão de chances para os diferentes grupos IN50/método de triagem dentre a população de animais separada pelo número de doses recebidas	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC	Área sob a curva
DIVA	Métodos de diagnóstico capazes de diferenciar animais infectados de vacinados
DPR	Depois da revacinação
DPV	Depois da vacinação
DSA	Departamento de Saúde Animal
EITB	<i>Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer blot test</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FMDV	Vírus da Febre Aftosa
IC	Intervalo de confiança
IN	Instrução Normativa
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PNE	Proteína não estrutural do vírus da febre aftosa
PNEFA	Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa
RC	Razão de chances
ROC	<i>Receiver operator characteristic curve</i>
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
UF	Unidade da Federação

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Vírus da febre aftosa	13
2.2	Impactos da febre aftosa e situação no Brasil	13
2.3	Inquéritos soroepidemiológicos	14
2.4	Controle de focos em zonas livres com ou sem vacinação	16
2.5	Pureza das vacinas	16
2.6	Controle oficial de vacinas	17
3.	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Obtenção dos dados	20
3.2	Dados dos testes de controle de vacinas	20
3.3	Análise estatística do controle de vacinas	20
3.4	Dados dos inquéritos soroepidemiológicos	22
3.5	Análise estatísticas dos inquéritos soroepidemiológicos	22
4.	RESULTADOS	24
4.1	Controle de vacinas	24
4.2	Inquéritos soroepidemiológicos	26
5.	DISCUSSÃO	32
6.	CONCLUSÕES	34
	REFERÊNCIAS	35
	APÊNDICE A - Códigos do SAS e resultados detalhados dos modelos	39

1. INTRODUÇÃO

A febre aftosa é uma doença causada por um vírus RNA fita simples, não envelopado, do gênero *Aphthovirus* da Família Picornaviridae. Diferentemente das proteínas estruturais deste vírus, as chamadas proteínas não estruturais (PNE), como a 3A, 3B, 2C, 3D e 3ABC, estão relacionadas diretamente a replicação viral e são comuns a todos os sorotipos do vírus. Por este motivo, são as mais adequadas ao diagnóstico sorológico para pesquisa de anticorpos contra o vírus da febre aftosa (GRUBMAN; BAXT, 2004; CLAVIJO, et al., 2004; OIE, 2017a). A doença tem um custo anual estimado, em países com áreas endêmicas, que varia entre 6,5 e 21 bilhões de dólares. Já, os prejuízos econômicos estimados pela ocorrência de casos em áreas livres podem ultrapassar 1,5 bilhões de dólares por ano (KNIGHT-JONES; RUSHTON, 2013), levando os países a estabelecerem estratégias para prevenção e comprovação de ausência de transmissão do vírus (BRASIL, 2008a). Dentre as estratégias do Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa (PNEFA) estão o fortalecimento das estruturas dos serviços veterinários oficiais, modernização dos sistemas de informação epidemiológica, fortalecimento das estruturas de diagnóstico laboratorial, controle de movimentação de animais, monitoramento da condição sanitária dos rebanhos suscetíveis e controle da produção, da comercialização e aplicação da vacina contra a doença (BRASIL, 2007a). Métodos de diagnósticos capazes de diferenciar animais infectados de vacinados são importantes ferramentas nos monitoramentos, entretanto, as estratégias devem estar em compasso com o desenvolvimento das vacinas. Ressalta-se que nem todas as vacinas de vírus inativados disponíveis apresentam pureza suficiente que permita o uso de métodos diagnósticos capazes de diferenciar animais infectados de animais vacinados, ou DIVA do inglês *differentiating infected from vaccinated animals* (PARIDA, 2009; UTTENTHAL, et al., 2010).

Os objetivos gerais deste trabalho foram avaliar a situação das vacinas produzidas no Brasil quanto à pureza para PNE, a partir dos resultados do controle oficial realizado pelo MAPA, e adequação ao sistema de vigilância de febre aftosa baseado em inquéritos soropidemiológicos utilizando métodos de diagnóstico capazes de diferenciar animais infectados de animais vacinados.

A partir da avaliação dos resultados dos testes de vacina realizados pelo Laboratório Nacional Agropecuário no Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS) antes e após a vigência da Instrução Normativa nº 50/2008, é possível avaliar os efeitos deste controle governamental na produção dos produtos biológicos. Além disso, possibilita expor um panorama das vacinas disponíveis no Brasil quanto à pureza relacionada às PNE e, conseqüentemente, sua aplicabilidade na resposta a focos em áreas livres com ou sem vacinação (METWALLY, et al., 2016; OIE, 2017a; OIE, 2017b). Desta forma, este trabalho tem como objetivo específico comparar os dados de ocorrência de animais reativos antes e após a implementação do controle oficial de pureza a partir dos resultados dos testes de vacina entre os anos de 2008 e 2015.

Já a avaliação dos resultados dos inquéritos antes e após a implantação do controle oficial de vacinas estabelecido pela IN 50/2008, demonstra se o sistema de controle, baseado no uso de vacinas purificadas somado a métodos de diagnóstico capazes de diferenciar animais vacinados em relação aos infectados adotado no Brasil, é adequado ao fim a que se propõe (BARNETT et al., 2015; ROBINSON, et al., 2016; KNIGHT-JONES et al., 2016; OIE, 2017a; OIE, 2017b). Neste ponto, o objetivo específico é comparar os dados de ocorrência de animais reativos antes e após a implementação da IN 50/2008, a partir dos resultados dos inquéritos soropidemiológicos realizados entre os anos de 2004 e 2014 no Brasil em zonas livres de FA com vacinação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vírus da febre aftosa

A febre aftosa é uma doença causada por um vírus RNA fita simples, não envelopado, do gênero *Aphthovirus* da Família Picornaviridae. O vírion é de capsídeo icosaédrico formado por cópias das proteínas estruturais VP1 a VP4 que são específicas para cada um dos sete sorotipos, denominados A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 e Asia 1. Estas proteínas estruturais são as responsáveis pela imunidade conferida pelas vacinas aos animais. Por sua vez, as chamadas proteínas não estruturais, como a 3A, 3B, 2C, 3D e 3ABC, estão relacionadas diretamente a replicação viral e são comuns a todos os sorotipos do vírus. Por este motivo, são as mais adequadas ao diagnóstico sorológico para pesquisa de anticorpos contra o vírus da febre aftosa (GRUBMAN; BAXT, 2004; CLAVIJO, et al., 2004; OIE, 2017a).

2.2 Impactos da febre aftosa e situação no Brasil

Considerada a doença mais contagiosa dentre as que acometem mamíferos, a febre aftosa causa enormes prejuízos econômicos às criações de animais biungulados (OIE, 2017a). O custo anual estimado com as medidas de controle e perdas econômicas em países onde a doença é endêmica varia entre 6,5 e 21 bilhões de dólares. Já os prejuízos econômicos estimados pela ocorrência de casos em áreas livres podem ultrapassar 1,5 bilhões de dólares por ano (KNIGHT-JONES; RUSHTON, 2013).

No Brasil, as estratégias de controle e erradicação foram marcadas por êxitos e retrocessos ao longo dos anos. Mais notadamente, a retirada da vacinação no final dos anos 90 dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul na busca pela classificação com zonas livre sem vacinação e a conseguinte identificação de foco no RS, trouxeram, além de grandes prejuízos econômicos e sociais, dificuldades nos processos de tomada de decisão para a erradicação da doença. Outro evento de grande impacto negativo nos últimos anos foram os focos nos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul entre 2005 e 2006. Já, a classificação pela OIE de Santa Catarina como zona livre sem vacinação, em 2007, e o avanço do reconhecimento das zonas livres com vacinação para os estados do norte e nordeste, destacam-se entre os êxitos das ações do PNEFA. Neste mesmo ano, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Portaria nº 116, da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), que aprova o Plano Estratégico para o decênio de 2017 a 2026 do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA) e que tem como a principal meta alterar a classificação do Brasil junto a OIE para livre de aftosa sem vacinação a partir do ano de 2023 (BRASIL, 2017).

2.3 Inquéritos soropidemiológicos

Dentre as estratégias do PNEFA estão o fortalecimento das estruturas dos serviços veterinários oficiais, modernização dos sistemas de informação epidemiológica, fortalecimento das estruturas de diagnóstico laboratorial, controle de movimentação de animais, controle dos procedimentos de comercialização e aplicação da vacina e monitoramento da condição sanitária dos rebanhos susceptíveis (BRASIL, 2007a; BRASIL, 2017)

Da mesma forma, o país que pretende ser reconhecido como livre de aftosa com ou sem vacinação e manter este reconhecimento deve realizar inquéritos soropidemiológicos dos rebanhos periodicamente de forma a gerar evidências de que não há transmissão viral em seu território. O mesmo se aplica àqueles países que buscam recuperar o reconhecimento de livre de aftosa após a ocorrência de um foco da doença (OIE, 2017b).

De forma geral, no Brasil os inquéritos ou monitoramentos conduzidos pelo PNEFA em zonas livres com ou sem vacinação consistem em três etapas básicas: delineamento, execução, análise e conclusão.

No delineamento, são definidos os municípios e as propriedades nos quais serão coletadas amostras de soro sanguíneo utilizando-se critérios baseados no risco da transmissão da febre aftosa, como a seleção de municípios com maior movimentação de animais. Adicionalmente, procura-se concentrar a coleta em animais que se encontram na faixa etária mais suscetível ao vírus, qual seja, de seis a doze meses de idade. A partir do atendimento destas premissas, são geradas listas das propriedades e a amostragem é estabelecida de forma a permitir identificar pelo menos uma propriedade onde há transmissão viral, com 95% de confiança, caso a prevalência entre rebanhos seja de 1%. Já, o número de animais na faixa etária de seis a doze meses a serem amostrados dentro de uma propriedade é estabelecido de forma a identificar, com 95% de confiança, pelo menos um animal infectado, dada uma prevalência esperada de 10% de animais soropositivos dentro de um rebanho hipoteticamente infectado. Este delineamento gera uma tabela que estabelece o número de animais de seis a doze meses a serem coletados de acordo com o número total de animais nesta faixa etária existentes em cada propriedade amostrada (OIE, 2017b; BRASIL, 2005; BRASIL, 2007b; BRASIL, 2011; BRASIL, 2016).

Na etapa de execução, as amostras de soro sanguíneo coletadas são encaminhadas aos laboratórios oficiais para análise. Estas amostras são avaliadas quanto à presença de anticorpos contra as PNE do vírus da febre aftosa através de um sistema de métodos de ensaio em sequência: i) um método de triagem tipo ELISA para pesquisa de anticorpos contra a proteína 3ABC do vírus da febre aftosa que pode ser o NCPanaftosa ELISA, fabricado pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa, ou o PrioCHECK FMDV NS ELISA, produzido pela Prionics/Thermo Fisher Scientific; ii) o método confirmatório o EITB – *Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot* – NCPanaftosa – Prova confirmatória, também, fabricado pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa (SORENSEN, et al., 1998; BERGMANN et al., 2000; BRASIL, 2005; BRASIL, 2007b; BRASIL, 2008b; BRASIL, 2011; BRASIL, 2016; OIE, 2017).

Os métodos para detecção de PNE disponíveis, todavia, necessitam de medidas complementares para garantir a ausência de infecção em animais (UTTENTHAL, et al., 2010; OIE, 2017b) Assim, propriedades com pelo menos um animal com resultado soropositivo no sistema 3ABC/EITB são classificadas como possivelmente infectadas e uma investigação epidemiológica complementar é iniciada. Esta investigação inclui a realização de colheitas de soro subsequentes, novos exames clínicos e colheitas de amostras de líquido esofágico-faríngeo (LEF) para pesquisa viral, de forma a descartar

possíveis portadores assintomáticos da doença nas propriedades classificadas como possivelmente infectadas (KITCHING, 2002; BRASIL, 2005; BRASIL 2008b, BRASIL, 2011; BRASIL, 2016).

2.4 Controle de focos em zonas livres com ou sem vacinação

Além de ser utilizada na prevenção, a vacinação pode ser empregada no controle e erradicação de doenças em determinadas áreas. Países classificados como livre de febre aftosa com ou sem vacinação, quando necessitam controlar um foco, recorrem a vacinação emergencial dos animais suscetíveis nas áreas que circundam os rebanhos afetados, assim como a restrição da movimentação de animais. Para a continuidade destas ações de controle, o Código de Animais terrestres da OIE prevê duas alternativas. Na primeira delas, os países optam por abater todos os animais vacinados na área que circunda o foco, porém, esta ação pode ser de difícil operacionalização, além de levantar questionamentos éticos e sociais. Ao optar pela segunda alternativa, qual seja, manter vivos os animais vacinados emergencialmente, os países devem realizar o monitoramento destes animais através de inquéritos soroepidemiológicos para a detecção de anticorpos contra as proteínas não estruturais do vírus da febre aftosa. Portanto, após a aplicação de vacinas em animais para o controle de focos é importante detectar infecção ativa em animais vacinados a fim de evitar a disseminação do vírus, como também, para comprovar a ausência de infecção na população remanescente após o controle do foco (OIE, 2017b; BARNETT, et al., 2015; PATON, 2014; UTTENTHAL, et al., 2010). Por este motivo, faz-se necessário o emprego de estratégias que utilizam métodos sorológicos capazes de detectar a infecção em animais previamente vacinados (UTTENTHAL, et al., 2010; METWALLY, et al., 2016).

2.5 Pureza das vacinas

Métodos de diagnóstico capazes de diferenciar animais infectados de vacinados são importantes ferramentas nos monitoramentos, entretanto, as estratégias devem estar em compasso com o desenvolvimento das vacinas. Atualmente, nem todas as vacinas de vírus inativados disponíveis apresentam pureza suficiente que permita o uso de métodos diagnósticos DIVA (PARIDA, 2009; UTTENTHAL, et al., 2010).

A utilização de vacinas com deficiências quanto à purificação das PNE pode gerar resultados falsos positivos nestes ensaios, dado que o animal não está infectado com o vírus, prejudicando as análises e conclusões dos estudos soroepidemiológicos. Isto ocorre, pois nestes casos a vacina não eficientemente purificada pode conter resíduos de proteínas não estruturais provenientes dos cultivos celulares de vírus e induzir a produção de anticorpos contra estas proteínas (DOEL, 2003; OIE, 2017a). Por este motivo, fabricantes que afirmam que sua vacina é purificada em relação às PNE devem demonstrar através de testes em animais que esta não induz a produção de anticorpos contra estas proteínas (METWALLY, et al., 2016).

A vacina contra a febre aftosa é, em geral, fabricada a partir de vírus vivo cultivado em linhagem de células BHK (Baby Hamster Kidney) posteriormente inativado quimicamente, parcialmente purificado e formulado com um adjuvante (PARIDA, 2009).

Alguns fabricantes utilizam a precipitação com polietilenoglicol e a ultrafiltração para a purificação adequada do antígeno vacinal. Em empresas fabricantes mais avançadas, o concentrado bruto de antígenos inativados é submetido a cromatografia para obtenção de antígenos altamente purificados, que são posteriormente armazenados em nitrogênio líquido até a formulação da vacina (DOEL, 2003).

2.6 Controle oficial de vacinas

As vacinas fabricadas e comercializadas no Brasil são todas produzidas a partir de cepas do vírus da aftosa fornecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As vacinas são registradas e todas as etapas de produção, comercialização, distribuição, transporte e utilização são controladas por este ministério (BRASIL, 2007a).

De acordo com o que determina a Instrução Normativa nº 50/2008, a vacina deve ter todas as suas partidas testadas em laboratório oficial e aprovadas pelo MAPA antes de serem comercializadas. Alternativamente, podem ser aceitos os testes realizados pelo controle de qualidade das empresas. Dentre os testes aos quais são submetidas as vacinas estão (BRASIL, 2008a):

- a) Pesquisa de vírus residual ativo no produto acabado.
- b) Avaliação da tolerância dos bovinos quanto a vacinação, através do qual se observa reações indesejáveis que possam ser atribuídas as vacinas.

- c) Estabilidade térmica para avaliar a qualidade da emulsão.
- d) Teste de esterilidade.
- e) Avaliação da potência utilizando ELISA CFL, que avaliar a expectativa de proteção da vacina.
- f) Teste da purificação da vacina quanto às Proteínas Não Estruturais (PNE) do vírus.

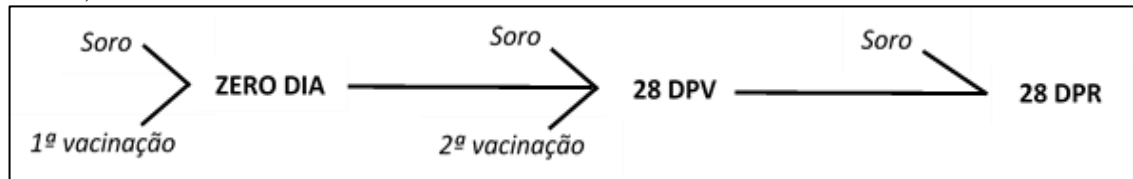
Até a entrada em vigor da IN 50/2008, cujos efeitos deram-se a partir de janeiro de 2009, não havia o controle oficial de pureza das vacinas utilizadas no Brasil quanto às PNE, já que não era exigido pela Portaria MAPA nº 713, de 1º de novembro de 1995, norma que regulamentava nacionalmente a produção de vacinas anteriormente (BRASIL, 1995). Este controle consiste na vacinação seriada de bovinos sensíveis e posterior avaliação quanto a capacidade da vacina de induzir a produção de anticorpos contra às PNE do vírus da febre aftosa. Todos os procedimentos desde a seleção dos bovinos sensíveis até o teste das vacinas são realizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGRO).

Para o controle de vacinas, são selecionados bovinos machos, que não tenham sido vacinados contra a febre aftosa, com idade entre 18 a 24 meses de idade, provenientes de fazendas controladas pelo MAPA. Estes bovinos são previamente testados através de método ELISA para pesquisa de anticorpos contra a proteína não estrutural 3ABC do vírus. Aqueles que apresentam resultado inconclusivo ou positivo (reativo) em ELISA 3ABC não entram no teste de vacina, os demais são considerados bovinos sensíveis e aptos (BRASIL, 2008a).

Para cada partida de vacina, dezoito bovinos sensíveis são submetidos ao teste oficial que ao “zero dia”, como é chamado o dia em que o experimento inicia, tem seu soro colhido e recebem a primeira dose da vacina que está sendo testada. No 28º dia após a primeira vacinação (28 DPV), os bovinos têm novamente seu soro colhido e são revacinados. Finalmente, passados 28 dias desta revacinação (28 DPR) os bovinos têm sua última alíquota de soro colhida (BRASIL, 2008a; METWALLY, et al., 2016; OIE, 2017a).

O esquema de vacinações e colheita de soro está representado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema de vacinações e colheita de soro dos testes de vacinas (BRASIL, 2008a).



Os soros colhidos são submetidos ao mesmo sistema de métodos sorológicos utilizado nos inquéritos soroepidemiológicos de rebanhos de áreas com vacinação (BRASIL, 2007a). Este sistema tem como triagem o ELISA 3ABC (NCPanaftosa ELISA ou Prionics – PrioCHECK FMDV NS ELISA) e como método confirmatório o EITB (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot – Panaftosa – Prova confirmatória). Os bovinos cujos soros coletados no “zero dia” são reativos ou indeterminados no sistema ELISA 3ABC/EITB são excluídos do teste de vacinas.

Ao final do teste, as partidas de vacina que induzem reação imunológica nos bovinos contra as proteínas não estruturais, ou seja, apresentam resultado reativo no sistema ELISA 3ABC/EITB para um ou mais bovinos na coleta DPR ou DPV são consideradas reprovadas (BRASIL, 2008a; METWALLY, et al., 2016; OIE, 2017a).

Em 21 de janeiro de 2018, foi publicada pelo MAPA a Instrução Normativa nº 11, que substitui a IN 50/2008. Dentre as principais mudanças estão a redução do volume da dose da vacina que passa a ser de dois mililitros e a alteração do período entre a vacinação e a coleta do soro que aumenta de 28 para 56 dias, na avaliação da potência da vacina. Para o controle de pureza da vacina em relação às PNE não houve alterações em relação a IN 50/2008.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos dados

Os dados foram obtidos junto ao Departamento de Saúde Animal e Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários, ambos da Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA.

Para a realização das análises estatísticas do estudo foram utilizados os *softwares* SAS Studio (versão 3.7 – SAS release 9.04) e Microsoft Office 365 (versão 1711). Os Códigos do SAS e resultados detalhados dos modelos estão no Apêndice A.

3.2 Dados dos testes de controle de vacinas

A primeira hipótese testada foi a de que a aplicação da IN 50/2008, particularmente a introdução do controle de pureza para PNE das vacinas de Febre Aftosa, pode estar associada a uma diminuição da capacidade das vacinas de induzir a produção de anticorpos contra as proteínas não estruturais do vírus da febre aftosa nos bovinos, resultando em chances menores de encontrar animais reagentes aos testes após a implantação da IN. O banco de dados utilizado foi elaborado entre 2008 e 2015 pela equipe do Laboratório de Diagnóstico de Doença dos Animais do LANAGRO-RS com as informações obtidas de testes referentes a 1016 partidas de vacina, totalizando 17.939 animais. As informações nele contidas foram validadas frente aos relatórios de ensaios emitidos oficialmente pelo laboratório. Foram utilizados somente os dados referentes a partidas de vacinas destinadas ao mercado nacional e, portanto, foram excluídos os testes realizados com partidas pilotos ou vacinas para exportação.

3.3 Análise estatística do controle de vacinas

Foi utilizado o modelo de regressão logística a partir dos resultados dos testes do controle de vacina realizados no LANAGRO-RS para avaliar o efeito da IN sobre os resultados reativos no sistema 3ABC/EITB, utilizando os dados dos experimentos realizados antes e depois da entrada efetiva em vigor da referida Instrução Normativa, que ocorreu em janeiro de 2009.

Tendo em vista que o método de triagem PrioCHECK passou a ser utilizado somente no ano de 2012 e, portanto, depois da implantação da norma, fez-se necessário, a fim de incluir no modelo os efeitos do método de triagem utilizado no sistema de diagnóstico ELISA 3ABC/EITB, agregar os preditores em 3 grupos diferentes. O primeiro grupo refere-se aos testes de vacina realizados **antes** da implantação da norma utilizando-se o método de triagem **NCPanaftosa**. O segundo, referente aos testes realizados **depois** da implantação a norma com o uso também do método **NCPanaftosa**. O último grupo refere-se aos testes realizados **depois** da implantação da norma, porém com a utilização do método de triagem **PrioCHECK**. Além disso, o modelo incluiu, para fins de ajuste de possível confundidor, o efeito aleatório da **marca comercial** da vacina, considerando a esperada correlação entre observações de uma mesma marca de vacina. O nível de significância para manutenção das variáveis no modelo foi de 5%. A probabilidade modelada foi a de ocorrência de bovinos reativos no sistema de diagnóstico ELISA 3ABC/EITB em relação ao total de bovinos testados para o controle de vacinas. O modelo utilizado pode ser representado pela seguinte equação:

$$\ln\left(\frac{\pi(x)}{1-\pi(x)}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + b_2$$

Onde:

β_0 = intercepto;

β_i, \dots, β_k = coeficiente para variável independente;

x_{1i}, \dots, x_{ki} = valor da variável independente;

b_i = variância do efeito aleatório;

1 = Grupo antes ou depois da IN50 agregado ao método de triagem utilizado no sistema de diagnóstico;

2 = variável de ajuste “marca comercial da vacina”,

Já, o cálculo da especificidade do sistema de métodos diagnósticos foi feito através da estimativa pontual da proporção de bovinos negativos no teste em relação ao número de bovinos verdadeiramente negativos e o intervalo de confiança estimado através do método exato binomial (Clopper-Pearson) a um nível de confiança de 95%.

3.4 Dados dos inquéritos soroepidemiológicos

A segunda hipótese testada foi a que postula que a aplicação da IN 50/2008 no controle de pureza das vacinas está associada a redução dos resultados falso-positivos nos inquéritos soroepidemiológicos, ou seja, bovinos reativos no sistema de diagnóstico para PNE, porém não infectados com o vírus da febre aftosa. Para isto foram avaliados os resultados obtidos nos inquéritos soroepidemiológicos antes e a após a implantação do controle oficial de pureza das vacinas, realizados entre o ano de 2004 e 2014. Para fins de inclusão no presente estudo, os dados foram validados frente aos relatórios oficiais emitidos pelo DSA para cada inquérito. Incluiu-se somente resultados de unidades da federação pertencentes a zonas classificadas como livre de febre aftosa com vacinação desde o primeiro inquérito incluído neste estudo iniciado em 2004, totalizando, desta forma, 13 estados.

3.5 Análise estatística dos inquéritos soroepidemiológicos

Para este fim, utilizou-se também o modelo de regressão logística ajustado, neste caso, pelos potenciais confundidores: **idade** dos bovinos e **unidade da federação** na qual foram coletadas as amostras.

Assim como no modelo utilizado para avaliar o controle de vacinas descrito no item 3.3, para inclusão dos efeitos relativos ao método de triagem utilizado no sistema de diagnóstico ELISA 3ABC/EITB, dado que o método de triagem PrioCHECK não foi utilizado em nenhum dos inquéritos soroepidemiológicos realizados antes da implantação da IN 50/2008, fez-se necessário agregar os preditores em 3 grupos diferentes, quais sejam, **antes** da IN com o método de triagem **NCPanaftosa**, **depois** da IN com o método **NCPanaftosa** e **depois** da IN com o método **PrioCHECK**.

Adicionalmente, neste modelo, também foi testada a interação entre os referidos grupos e a quantidade de doses de vacina recebidas pelos animais, categorizadas em: animal **não vacinado**; **uma dose** de vacina recebida e; **duas ou três doses** de vacina recebidas.

A variável contínua utilizada no ajuste do modelo **idade** foi testada quanto a linearidade em relação ao logito (*log odds*), através do teste proposto por Collet (1994). O nível de significância para manutenção das variáveis independentes, assim como, da

interação no modelo foi de 5%. A probabilidade modelada foi a de ocorrência de bovinos reativos no sistema de diagnóstico ELISA 3ABC/EITB. O modelo pode ser representado pela seguinte equação:

$$\ln\left(\frac{\pi(x)}{1 - \pi(x)}\right) = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_1x_2 + \beta_4x_4 + \beta_5x_5$$

β_0 = intercepto;

β_i, \dots, β_k = coeficientes para cada variável independente ou interação;

x_{1i}, \dots, x_{ki} = valor da variável independente;

1 = Grupo antes ou depois da IN50 agregado ao método de triagem utilizado no sistema de diagnóstico;

2 = número de doses de vacinas;

3 = interação 1*2;

4 = variável de ajuste “idade dos animais”;

5 = variável de ajuste “UF dos animais”.

4. RESULTADOS

4.1 Controle de Vacinas

A Tabela 1 apresenta os dados do controle oficial de vacinas do ano de 2008, ou seja, antes da vigência da IN 50/2008 e do período entre 2009 e 2015, isto é, depois da IN 50/2008.

Tabela 1 - Dados dos testes de controle de pureza de vacinas realizados pelo MAPA entre os anos 2008 e 2015 agrupados em relação a situação frente a implantação da IN 50/2008 e ao método utilizado.

<i>Método de triagem</i>	Antes da IN 50/2008		Depois da IN 50/2008	
	NCPanaftosa		NCPanaftosa	PrioCHECK
<i>Total de bovinos</i>	2.150		9.119	6.670
<i>Bovinos reativos (%)</i>	126 (5,9)		72 (0,8)	7 (0,1)
<i>Partidas testadas</i>	120		523	373
<i>Partidas não conformes</i>	34		37	7
<i>Bovinos Zero dia</i>	2.159		9.367	6.685
<i>Reativos em Zero dia</i>	6		46	3

Pode-se observar uma proporção maior de bovinos reativos antes da implantação do controle oficial de pureza em relação ao período após a implantação da norma. Este resultado reflete-se na quantidade de partidas de vacina não conformes em relação ao total de partidas testadas.

Quando utilizado o método de triagem NCPanaftosa no sistema de diagnóstico, observa-se um relativo aumento no número de bovinos reativos em zero dia quando comparado ao uso do método PrioCHECK como sistema de triagem, isto é, bovinos (não vacinados, provenientes de propriedades constantemente monitoradas pelo Serviço Veterinário Oficial e que foram previamente testados) apresentam resultado reativo no sistema 3ABC/EITB mesmo antes de receber a primeira dose de vacina. Estes dados mostram uma especificidade de 99,55% (IC 95%, 99,41-99,66) para o sistema de diagnóstico utilizando o método ELISA 3ABC NCPanaftosa como triagem, estimada através do método exato binomial (Clopper-Pearson) a um nível de confiança de 95%. Já o sistema utilizando o método ELISA PrioCHECK como triagem apresentou especificidade de 99,96% (IC 95%, 99,87-99,99).

Por sua vez, a Tabela 2 apresenta os resultados obtidos a partir do modelo de regressão logística para estimar a associação de múltiplos efeitos em relação à

ocorrência de resultados reativos no sistema ELISA 3ABC/EITB em soros de bovinos coletados durante os testes de vacina.

Tabela 2 - Resultados da regressão logística com efeito aleatório utilizando os dados do controle de vacinas contra a febre aftosa pelo MAPA de 2008 a 2015.

Modelo	n	RC ^a (IC 95%)	p(wald)	AUC ^b
<i>Univariável</i>			<0,0001	0,7503
depois da IN 50	15.789	1		
antes da IN 50	2.150	12,38 (9,31-16,46)		
<i>Ajustado^c</i>			<0,0001	0,8725
depois IN50/ teste NCPanaftosa	9.119	1		
antes IN50/teste NCPanaftosa	2.150	2,86 (1,92-4,14)		
depois IN 50/teste PrioCHECK	6.670	1		
antes IN 50/teste NCPanaftosa	2.150	19,70 (8,55-45,37)		
depois IN 50/teste PrioCHECK	6.670	1		
depois IN 50/teste NCPanaftosa	9.119	6,89 (3,11-15,29)		

^a Razão de chances; ^b Área sob a curva ROC; ^c Modelo ajustado pela marca comercial da vacina como efeito aleatório.

O primeiro modelo descrito na Tabela 2 compara somente os resultados obtidos antes e depois da implantação do controle oficial de vacinas. A partir deste modelo observou-se que a chance de ocorrência de resultados reativos em amostras dos testes de vacinas realizados antes da implantação da IN 50/2008 foi de 12,38 (IC 95%, 9,31-16,46) vezes a chance de ocorrência nos testes após a implantação da norma.

Em seguida, a fim de ajustar do modelo de regressão, foram estimadas as medidas de associação após a inclusão dos efeitos relativos a marca comercial da vacina e do método de diagnóstico utilizado como triagem, tendo em vista que o método confirmatório utilizado foi o mesmo em todos os casos. Observa-se a partir das estimativas do modelo que a chance de ocorrência de resultados reativos antes da implantação da norma utilizando o método de triagem ELISA 3ABC NCPanaftosa foi 2,86 (IC95%, 1,92-4,14) vezes a chance de ocorrência nos testes de vacina feitos após a norma, utilizando-se o mesmo método de triagem. Já a chance de resultados reativos antes da norma utilizando-se o método NCPanaftosa foi 19,70 (IC 95%, 8,55- 45,37)

vezes a chance de ocorrência após a norma com o uso do método PrioCHECK como triagem.

Por sua vez, quando comparados os resultados após a vigência da norma, a razão de chances entre o uso do método NCPanaftosa e método PrioCHECK foi de 6,89 (IC 95%, 3,11-15,29).

4.2 Inquéritos soroepidemiológicos

A tabela 3 apresenta as estatísticas descritivas dos inquéritos realizados antes e após a IN 50/2008.

Tabela 3 - Estatística descritiva dos inquéritos soroepidemiológicos realizados pelo MAPA entre os anos 2004 a 2014 agrupados em relação a situação frente a implantação da IN 50/2008.

	Antes da IN 50	Depois da IN 50
<i>Nº total de bovinos</i>	69.223	83.691
<i>Nº de bovinos reativos (%)</i>	1.756 (2,5)	344 (0,4)
<i>Não vacinados (%)</i>	2.401 (3,5)	9.323 (11,1)
<i>Uma dose (%)</i>	35.316 (51,0)	42.111 (50,3)
<i>Duas ou três doses (%)</i>	31.506 (45,5)	32.257 (38,5)
<i>Média idade (meses)</i>	9,2	9,8
<i>Desvio padrão idade</i>	2,2	1,8
<i>Mediana idade (meses)</i>	10	10
<i>Idade mínima (meses)</i>	0	0
<i>Idade máxima (meses)</i>	24	21
<i>UF</i>	13	13

Nela pode-se observar uma proporção de bovinos reativos em primeira coleta maior nas amostras dos inquéritos realizados antes da vigência da norma (2,5%) em relação aos realizados após a implantação da mesma (0,4%).

Também, observa-se que a maioria das amostras coletadas, tanto nos inquéritos realizados antes quanto depois da IN 50/2008, foram provenientes de bovinos que receberam apenas uma dose de vacina. Porém, há uma proporção maior de bovinos que receberam duas ou três vacinas nos inquéritos conduzidos antes do controle oficial de pureza, quando comparado aos inquéritos realizados depois do controle de pureza de

vacinas. Quanto à idade dos bovinos pode-se notar uma aproximação entre as médias e medianas tanto antes quanto após a implantação da norma.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para as medidas de associação estimadas por regressão logística entre diferentes efeitos e a ocorrência de resultados reativos para a presença de anticorpos contra as PNE do vírus da febre aftosa, em amostras de soros de bovinos coletadas a campo durante os inquéritos soroepidemiológicos.

Tabela 4 - Resultados da regressão logística utilizando os dados dos inquéritos soroepidemiológicos realizados pelo MAPA de 2004 a 2014 – Modelo univariável e modelo com interação e ajustado.

Modelo	n	RC ^a (IC 95%)	p (wald)	AUC ^b
<i>Univariável</i>			<0,0001	0,6944
<i>depois</i> da IN 50	83.691	1		
<i>antes</i> da IN 50	69.223	6,31 (5,62-7,08)		
<i>Com interação e ajustado^c</i>			<0,0001 ^d	0,7857
Antes IN 50/teste NCPanaftosa				
Não vacinado	2.401	1		
Uma dose	35.316	2,22 (1,22-4,06)		
Duas ou três doses	31.506	5,94 (3,25-10,87)		
Depois IN 50/teste NCPanaftosa				
Não vacinado	3.726	1		
Uma dose	21.583	0,69 (0,42-1,14)		
Duas ou três doses	13.131	0,96 (0,57-1,63)		
Depois IN 50/teste PrioCHECK				
Não vacinado	5.597	1		
Uma dose	20.528	0,76 (0,50-1,16)		
Duas ou três doses	19.126	0,81 (0,53-1,24)		

^a Razão de chances; ^b Área sob a curva ROC; ^c Modelo ajustado pela UF e idade dos bovinos. ^d significância para interação entre o número de doses de vacinas recebidas pelo animal *versus* grupo implantação da norma/método de triagem.

A primeira linha da Tabela 4 refere-se ao modelo que inclui somente o efeito “implantação da IN 50/2008” em relação ao desfecho. Neste modelo, observa-se que a chance de ocorrência de bovinos reativos nos monitoramentos soro epidemiológicos

antes da implantação da IN 50/2008 foi de 6,31 (IC 95%, 5,62-7,08) vezes a chance da ocorrência após a implantação.

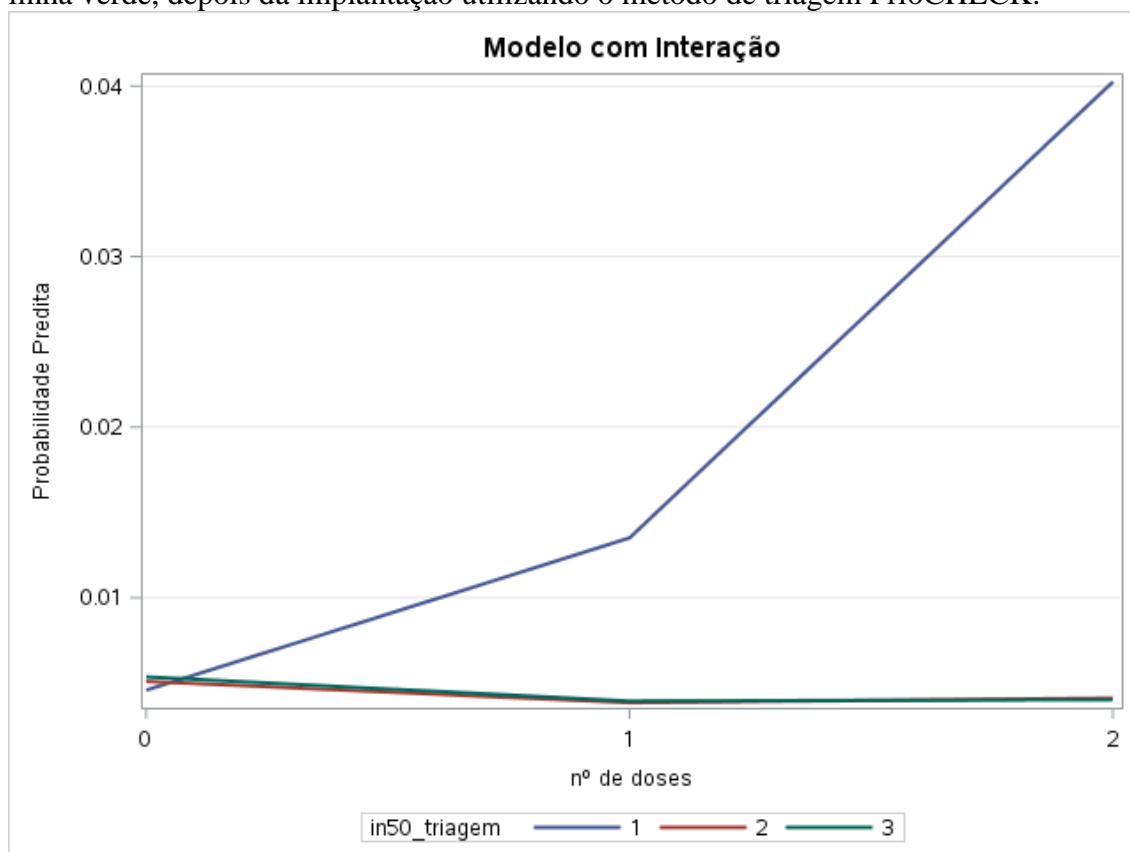
O modelo com interação e ajustado exposto na Tabela 4 inclui como variáveis de ajuste a idade dos bovinos e a Unidade da Federação onde foram coletadas as amostras. O teste proposto por Collett (1994), indicou não haver linearidade entre a idade e o logito (*log-odds*) da variável dependente. Por este motivo, optou-se por classificar a idade em 7 categorias: “até 6” meses; “7”, “8”, “9”, “10” e “11” meses; e “12 ou mais” meses.

Além disso, este modelo estima as razões de chances na presença da interação entre o número de doses de vacina aplicadas nos bovinos e os grupos que agregam a implantação da norma e o método de triagem utilizado. Desta forma pode-se avaliar se a aplicação do controle de vacinas estabelecido pela IN 50/2008, agrupado com o método de triagem utilizado, modificou o efeito da aplicação de doses sucessivas de vacina na ocorrência de bovinos reativos a campo.

A partir deste modelo, é possível inferir que, antes da implantação da IN 50/2008, a chance de ocorrência de resultados reativos em bovinos que receberam uma dose de vacina foi 2,22 (IC 95%, 1,22-4,06) vezes a chance da ocorrência em bovinos não vacinados. Já, a chance de ocorrência de resultados reativos em bovinos que receberam duas ou três vacinas foi 5,94 (IC 95%, 3,25-10,87) vezes a de bovinos não vacinados. Nos resultados obtidos para os inquéritos soropidemiológicos realizados após a implantação da norma, independentemente do kit de triagem utilizado, não houve diferença significativa para as estimativas da razão de chances entre diferentes doses de vacinas, visto que os intervalos de confiança obtidos incluem o valor 1,00.

A Figura 2 ilustra as diferentes probabilidades preditas pelo modelo ajustado, utilizando a estimativa por máxima verossimilhança, para cada grupo definido pela combinação implantação da norma/método de triagem utilizado em relação ao número de doses de vacina aplicadas no animal.

Figura 2 - Gráfico da média da probabilidade predita para a ocorrência de bovinos reativos conforme o aumento no número de doses de vacina aplicadas (“0”, “1” e “2 ou 3”). A linha de cor azul ilustra as probabilidades antes da implantação da IN 50/2008 utilizando o método de triagem NCPanaftosa, a linha vermelha representa as probabilidades depois da implantação da norma utilizando o método NCPanatosa e a linha verde, depois da implantação utilizando o método de triagem PrioCHECK.



A partir deste gráfico, pode-se observar que no grupo dos bovinos cujas coletas de amostras deram-se antes da implantação da IN 50/2008 a probabilidade aumenta conforme a quantidade de doses de vacinas aplicadas nos bovinos. Já os grupos de bovinos, cujas coletas se deram após a norma, apresentam probabilidades semelhantes e que permanecem praticamente inalteradas mesmo com a aplicação de uma ou três doses de vacina.

Sob outra perspectiva, avaliando-se os resultados deste mesmo modelo de regressão, porém neste momento, avaliando a associação do grupo definido pela combinação controle oficial/método de triagem dentro da população de animais segregada pelo número de doses de vacina recebida, observa-se os resultados expostos na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados da regressão logística utilizando os dados dos inquéritos soropidemiológicos realizados pelo MAPA de 2004 a 2014 – Modelo com interação e ajustado demonstrando a razão de chances para os diferentes grupos IN50/método de triagem dentre a população de animais separada pelo número de doses recebidas.

Modelo	n	RC ^a (IC 95%)	p (wald)	AUC ^b
<i>Com interação e ajustado^c</i>			<0,0001 ^d	0,7857
Bovinos não vacinados				
depois IN50/ teste NCPanaftosa	3.726	1		
antes IN50/teste NCPanaftosa	2.401	1,21 (0,572-2,57)		
depois IN 50/teste PrioCHECK	5.597	1		
antes IN 50/teste NCPanaftosa	2.401	1,17 (0,56-2,24)		
depois IN 50/teste PrioCHECK	5.597	1		
depois IN 50/teste NCPanaftosa	3.726	0,92 (0,52-1,64)		
Bovinos com uma dose				
depois IN50/ teste NCPanaftosa	21.583	1		
antes IN50/teste NCPanaftosa	35.316	3,90 (3,07-4,96)		
depois IN 50/teste PrioCHECK	20.528	1		
antes IN 50/teste NCPanaftosa	35.316	3,27 (2,57-4,16)		
depois IN 50/teste PrioCHECK	20.528	1		
depois IN 50/teste NCPanaftosa	21.583	0,84 (0,62-1,14)		
Bovinos com duas ou três doses				
depois IN50/ teste NCPanaftosa	13.131	1		
antes IN50/teste NCPanaftosa	31.506	7,48 (5,67-9,85)		
depois IN 50/teste PrioCHECK	19.126	1		
antes IN 50/teste NCPanaftosa	31.506	8,18 (6,48-10,33)		
depois IN 50/teste PrioCHECK	19.126	1		
depois IN 50/teste NCPanaftosa	13.131	1,09 (0,77-1,55)		

Desta forma, observa-se que, dentre os bovinos não vacinados, não há associação da vigência do controle oficial de pureza com a ocorrência de animais reativos, independentemente do método de triagem utilizado dado que os intervalos de confiança de todas as razões de chance estimada para este grupo incluem o valor 1.

Já no grupo de bovinos que receberam uma dose de vacina, a chance de ocorrência de um animal reativo antes da norma utilizando o método de triagem NCPanaftosa foi 3,90 (IC 95%, 3,07-4,96) vezes a chance de ocorrência depois da norma utilizando o mesmo método de triagem e de 3,27 (IC 95%, 2,57-4,16) vezes a chance de ocorrência de animais reativos quando utilizado o método PrioCHECK. Neste mesmo grupo de animais, considerando somente os resultados obtidos após a implantação da norma, não houve diferença significativa na razão de chance estimada para uso dos diferentes métodos de triagem (0,84 com IC 95% de 0,62-1,14).

Por fim, no grupo de bovinos que receberam duas ou três doses de vacina, a chance de ocorrência de um animal reativo antes da norma utilizando o método de triagem NCPanaftosa foi 7,48 (IC 95%, 5,67-9,85) vezes a chance de ocorrência depois da norma utilizando o mesmo método de triagem e de 8,18 (IC 95%, 6,48-10,33) vezes a chance de ocorrência de animais reativos quando utilizado o método PrioCHECK. Da mesma forma, ao considerar somente os resultados obtidos após a implantação da norma, não houve diferença significativa na razão de chance estimada para uso dos diferentes métodos de triagem (1,09 com IC 95% de 0,77-1,55).

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir do modelo referente ao teste de vacinas corroboram a hipótese de que a implementação do controle de pureza das vacinas está associada a diminuição da capacidade das vacinas de induzir a produção de anticorpos contra as proteínas não estruturais do vírus da febre aftosa nos bovinos. O ajuste do modelo pelos confundidores alterou consideravelmente a estimativa da RC e aumentou a área sob a curva ROC do modelo, melhorando seu poder de discriminação.

Neste modelo, as chances de ocorrência de bovinos reativos são mais elevadas antes da implantação do controle oficial da pureza de vacinas do que depois da implantação.

Por sua vez, a considerável diferença nas estimativas da razão de chances, quando se modifica o método de triagem, pode indicar uma influência distinta dos métodos ELISA na especificidade do sistema diagnóstico ELISA 3ABC/EITB utilizado. Diversos autores realizaram estudos para avaliar a sensibilidade e especificidades dos diferentes métodos diagnósticos disponíveis (BROCCHI, et al., 2006; PATON, et al., 2006; BRAGA, et al., 2007). Uma forma de avaliar esta diferença de especificidade do sistema quando se altera o método de triagem, a partir dos dados obtidos neste estudo, é avaliar a proporção de resultados reativos em bovinos no dia zero do teste de vacinas, que mostram que a especificidade do sistema de diagnóstico utilizando o método ELISA 3ABC NCPanaftosa como triagem foi de 99,55% (IC 95%, 99,41-99,66) e o sistema utilizando o método ELISA PrioCHECK como triagem apresentou especificidade de 99,96% (IC 95%, 99,87-99,99). Apesar de não avaliar a combinação de testes ELISA 3ABC/EITB e partindo-se da premissa de que a especificidade do método confirmatório EITB é constante, pode-se afirmar que os resultados do estudo de Brocchi et al. (2006), diferem daqueles encontrados neste trabalho já que estimou especificidades muito similares entre os métodos ELISA 3ABC NCPanaftosa e PrioCHECK em 675 bovinos não vacinados (97,3 e 97,2% respectivamente). Os resultados do presente trabalho diferem também do estudo realizado por Bergmann et al. (2000) e Braga et al. (2007) que relatam especificidade de 100% do sistema ELISA 3ABC NCPanaftosa/EITB em 250 e 105 bovinos, respectivamente, todos não vacinados. Por outro lado, aproximam-se do encontrado por Paton et al. (2006), em

bovinos primo vacinados, no qual relatam uma especificidade de 99,98% em um sistema que combina ELISA 3ABC PrioCHECK com EITB como confirmatório, porém este inclui um reteste das amostras positivas, ou seja, submete para confirmação em EITB somente os soros positivos duas vezes em sequência no ELISA. O presente estudo limita-se a avaliar a especificidade dos kits tendo em vista que foram utilizados somente amostras de bovinos não infectados com o vírus da febre aftosa.

Na avaliação dos dados obtidos a partir dos inquéritos soroepidemiológicos, pode-se observar uma proporção de 2,54%, de bovinos reativos em relação aos bovinos testados na primeira coleta antes da aplicação da Instrução Normativa 50/2008. Isto significa uma proporção quase seis vezes maior do que a proporção encontrada nos inquéritos realizados após a implantação da norma (0,41%). Estes resultados diferem do encontrado por Smitsaart et al. (2015) em inquéritos soroepidemiológicos realizados na Argentina entre 2006 e 2011, cuja porcentagem média de bovinos reativos no sistema ELISA 3ABC/EITB foi de 0,05%.

No que diz respeito ao modelo ajustado de regressão logística, pode-se observar que nos inquéritos realizados antes do controle de pureza da vacina de aftosa há influência do número de doses de vacina aplicada nos bovinos na probabilidade predita pelo modelo para ocorrência de bovinos reativos no sistema de métodos diagnósticos. Por outro lado, naqueles inquéritos realizados após a implantação da IN 50/2008 não há diferença significativa independentemente do número de doses aplicadas em relação ao animal que não foi vacinado. Este resultado vai ao encontro do proposto por Metwally et al. (2016) no guia de monitoramento da vacinação contra a febre aftosa da FAO. Além disso, quando avaliados os resultados obtidos em inquéritos realizados após a vigência da norma, diferentemente do observado nos dados do controle oficial de pureza de vacinas, não houve diferença significativa entre o número de doses ainda que utilizando-se métodos de triagem distintos.

Estes resultados são reforçados quando avaliada a interação para o grupo bovinos não vacinados já que, neste caso, não há associação entre a implantação do controle oficial e a redução de animais reativos. Por outro lado, esta associação é significativa quando avaliados os grupos de animais vacinados.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que há uma associação da implantação da Instrução Normativa nº 50 de 2008 com a melhoria da produção de vacinas contra a febre aftosa no que diz respeito a purificação do antígeno e a consequente remoção das proteínas não estruturais derivadas da replicação viral.

Além disso, as estimativas dos modelos estudados neste trabalho sugerem que esta melhoria na pureza está associada a diminuição na chance de ocorrência de bovinos reativos na primeira coleta de inquéritos soropidemiológicos, ou seja, redução nos falso-positivos a campo, dado que a infecção pelo vírus da febre aftosa foi descartada para os bovinos avaliados neste estudo.

Adicionalmente, quando avaliados os resultados obtidos em inquéritos realizados após a vigência da norma, diferentemente do observado nos dados do controle oficial de pureza de vacinas, não houve diferença significativa entre doses ainda que se utilizando métodos de triagem distintos.

REFERÊNCIAS

ALLISON, P. D, Measures of Fit for Logistic Regression. **SAS Global Forum**, Paper 1485-2014. Disponível em <<https://support.sas.com/resources/papers/proceedings14/1485-2014.pdf>> Acessado em 24/01/2018.

BARNETT, P. V. et al. A review of OIE country status recovery using vaccinate-to-live versus vaccinate-to-die foot-and-mouth disease response policies I: benefits of higher potency vaccines and associated nsp diva test systems in post-outbreak surveillance. **Transboundary and emerging diseases**, v. 62, n. 4, p. 367–387, 2015.

BERGMANN, I. E. et al. Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 145, n. 3, p. 473–489, 2000.

BERGMANN, I.E., MALIRA, T.V, NEITZERT, E.; CORREA MELO, E. Vaccination: foot-and-mouth disease experience in South America. *In*: SCHUDEL, A.; LOMBARD, M. (Ed.). **Development in Biologicals 119**. New York: Karger, 2004, 283–292.

BRAGA, A.C. PANIZZUTTI, R. RAVISON, J.A. SOUZA, R. The use of non-structural protein of foot and mouth disease virus ELISA kits in different serological evaluations in Brazil. *In*: IAEA-TECDOC-1546. International Atomic Energy Agency. **The use of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) to differentiate between vaccinated and infected animals**. RCA Project. Joint, Vienna: FAO/IAEA Program of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, 2007. p.70–95.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MARA nº 713, de 01 de novembro de 1995. Aprova as Normas de Produção, Controle e Emprego de Vacinas contra a Febre Aftosa. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 07 de nov. de 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Monitoramento da zona livre de febre aftosa com vacinação - Atividades de vigilância sanitária realizadas em 2004**. Brasília: 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 44, de 02 de outubro de 2007. Aprova diretrizes gerais para erradicação e prevenção da febre aftosa, a serem observados em todo o Território Nacional com vistas a implementação do PNEFA conforme estabelecido pelo SUASA. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 3 de out. de 2007a, seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Vigilância veterinária de doenças vesiculares – Orientações Gerais**. Brasília/DF, Out. de 2007b. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/programa-nacional-de-erradicacao-de-febre-aftosa-pnefa>> Acesso em 08 de janeiro de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 50, de 23 de setembro de 2008. Aprova o regulamento técnico para a produção, controle da qualidade, comercialização e emprego de vacinas contra a febre aftosa, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 24 de set. de 2008a, seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório anual do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa – PNEFA**. Brasília: 2008b. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/Relatorio_PNEFA_2008_final.pdf

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estudo epidemiológico para avaliação de circulação viral na zona livre de febre aftosa com vacinação - 2010/2011 - Relatório final**, Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estudo epidemiológico para avaliação de transmissão viral na zona livre de febre aftosa com vacinação - 2014/2015 - Relatório final**, Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA nº 116, de 20 de setembro de 2017. Aprova o Plano Estratégico do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa - PNEFA para 2017 -2026. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 02 de out. de 2017, seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 18 de janeiro de 2018. Aprova o Regulamento Técnico para a Produção, Controle da Qualidade, Comercialização e Emprego de Vacinas contra a febre aftosa, na forma desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 21 de jan. de 2018, seção 1.

BROCCHI, E. et al. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. **Vaccine**, [s. l.], v. 24, n. 47–48, p. 6966–6979, 2006.

CLAVIJO, A.; WRIGHT, P.; KITCHING, P. Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. **Veterinary Journal**,. v. 167, n. 1, p. 9–22, 2004

COLLETT, D. **Modelling Survival Data in Medical Research**. London: Chapman & Hall, 1994. ISBN 978-0-412-44890-4 ISBN 978-1-4899-3115-3 (eBook). DOI 10.1007/978-1-4899-3115-3

DOEL, T. R. Fmd vaccines. **Virus research**, v. 91, n. 1, p. 81–99, 2003.

GRUBMAN, M.J.; BAXT, B. Foot-and-mouth disease. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 465–493, 2004.

KITCHING, R.P. Identification of foot and mouth disease virus carrier and subclinically infected animals and differentiation from vaccinated animals. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 21, p. 531–538, 2002.

KNIGHT-JONES, T.J.D, et al. Global foot-and-mouth disease research update and gap analysis: 4 - diagnostics. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 63, n. S1, p. 3–13, 2016.

KNIGHT-JONES, T.J.D.; RUSHTON, J. The economic impacts of foot and mouth disease - what are they, how big are they and where do they occur? **Preventive Veterinary Medicine**, v. 112, n. 3-4, p. 162–173, 2013.

METWALLY, S.; MÜNSTERMANN, S.; FERRARI, G.; PATON, D.; DUFFY, S.; BARTELS, C.; KNIGHT-JONES, T. **Foot and mouth disease vaccination monitoring Guidelines**. [s.l.]: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5975e.pdf> Acessado em 08 de janeiro de 2018

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Foot and mouth disease. **OIE Terrestrial Manual**, v. 1, n. May, chapter 2.1.8, 2017a. Disponível em <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.08_FMD.pdf> Acesso em 08 de janeiro de 2018.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Infection with foot and mouth disease virus. **Terrestrial Animal Health Code**. Chapter 8.8, 2017 b. Disponível em <http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_fmd.htm> Acesso em 08 de janeiro de 2018.

PARIDA, S. Vaccination against foot-and-mouth disease virus: strategies and effectiveness. **Expert Review of Vaccines**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 347–65, 2009.

PATON, D.J. et al. Application of non-structural protein antibody tests in substantiating freedom from foot-and-mouth disease virus infection after emergency vaccination of cattle. **Vaccine**, [s. l.], v. 24, n. 42–43, p. 6503–6512, 2006.

PATON, D. J. et al. The use of serosurveys following emergency vaccination, to recover the status of “foot-and-mouth disease free where vaccination is not practised”. **Vaccine**, [s. l.], v. 32, n. 52, p. 7050–7056, 2014.

ROBINSON, L. et al. Global foot-and-mouth disease research update and gap analysis: 3 - Vaccines. **Transboundary and emerging diseases**, v. 63, n. S1, p. 30–41, 2016.

SMITSAART, E. et al. Importancia de la pureza de las vacunas antiaftosa en la interpretación de los estudios serológicos. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 741–766, 2015.

SORENSEN, K. J. et al. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 143, n. 8, p. 1461–1476, 1998.

UTTENTHAL, Å. et al. Strategies for differentiating infection in vaccinated animals (DIVA) for foot-and-mouth disease, classical swine fever and avian influenza. **Expert Review of Vaccines**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 73–87, 2010.

APÊNDICE A – Códigos do SAS e resultados detalhados dos modelos

1. Códigos do SAS

1.1. Banco de dados – Controle Oficial de Vacinas

```

**** modelo duas variáveis*/
proc logistic data=WORK.VACINAS descending plots = (roc phat influence leverage);
title1 "Modelo in50_triagem + fabricante";
      class in50_triagem (ref="3") fabricante (ref="12") / param=ref;
      model res_vac_pos/res_vac_total=in50_triagem fabricante / aggregate scale=none rsquare rl
lackfit;
run;

/* Modelo com efeito aleatório*/

proc glimmix data=work.vacinas plots=diff;
      class in50_triagem (ref="3") fabricante;
      model res_vac_pos/res_vac_total = in50_triagem / dist=bin link=logit oddsratio cl;
      random fabricante/type=cs ;
      output out=glmmout pred=xbeta pred(ilink)=predprob;
run;

/*Curva ROC*/
proc logistic data=glmmout;
      model res_vac_pos/res_vac_total = / nofit;
      roc "GLIMMIX model" pred=predprob;
run;

/*especificidade***/

data sp_pan;
input Test Response Count;
datalines;
0 0 11870
0 1 0
1 0 52
1 1 0
;
proc sort data=sp_pan;
by descending Test descending Response;
run;
proc freq data=sp_pan order=data;
weight Count;
tables Test*Response;
run;

title 'Especificidade NCPanaftosa';
proc freq data=sp_pan;
where Response=0;
weight Count;
tables Test / binomial(level="0" ac lr wald exact wilson);
exact binomial;
run;

```

```

data sp_prio;
input Test Response Count;
datalines;
0 0 6685
0 1 0
1 0 3
1 1 0
;
proc sort data=sp_prio;
by descending Test descending Response;
run;
proc freq data=sp_prio order=data;
weight Count;
tables Test*Response;
run;

title 'Especificidade PrioCHECK';
proc freq data=sp_prio;
where Response=0;
weight Count;
tables Test / binomial(level="0" ac lr wald exact wilson);
exact binomial;
run;

```

1.2. Banco de dados – Inquéritos Soroepidemiológicos

```

/***** testando a linearidade de idade*/
proc rank data=WORK.MONIT groups=4 ties=low out=WORK.TEMP1;
title1 "linearidade - 4 rank IDADE";
ranks IDADE4RK ;
var idade;
run;

*checa a frequencia dentro dos quartis;
proc freq data=WORK.TEMP1;
title1 "linearidade - frequencia 4 rank IDADE";
table reativos_prim_col IDADE4RK;
run;

*obtem o -2logL para a continua;
proc logistic data=WORK.TEMP1 descending;
title1 'linearidade - IDADE continua';
class in50_triagem (ref="3") dose3cat (ref="0") uf (ref="6")/ param=ref;
model reativos_prim_col=in50_triagem dose3cat in50_triagem*dose3cat idade4RK uf/;
run;

* obtem -2logl para a categorizada;
proc logistic data=WORK.TEMP1 descending plots=roc;
title1 'linearidade IDADE4RK categorica';
class in50_triagem (ref="3") dose3cat (ref="0") uf (ref="6") IDADE4RK(REF="0")/ param=ref;
model reativos_prim_col=in50_triagem dose3cat in50_triagem*dose3cat idade4RK uf/;
run;

/**Modelo com IDADE_CAT ***/
/* modelo full com interação in50_triagem*dose3cat e odds by in50_triagem*/
proc logistic data=WORK.MONIT descending plots(maxpoints=none)=(roc phat influence leverage);
title1 "Modelo in50_triagem*dose3cat + idade_cat + UF";
class in50_triagem (ref="3") dose3cat (ref="0") uf (ref="4") idade_cat(ref="9")/ param=ref;

```

```

        model reativos_prim_col=in50_triagem dose3cat in50_triagem*dose3cat idade_cat uf/ sr rl
lackfit ;
        output out=reativos_preditos predicted=predito lower=predito_l upper=predito_u;
        oddsratio dose3cat / at (in50_triagem="1" "2" "3");
run;

/*Grafico preditos*/
ods graphics / reset imagemap;

proc sgplot data=WORK.REATIVOS_PREDITOS;
        vline dose3cat / response=predito group=in50_triagem lineattrs=(thickness=5) stat=Mean;
        yaxis grid;
run;

ods graphics / reset;

```

2. Resultados encontrados

2.1. Banco de dados – Controle Oficial de Vacinas

Deviance and Pearson Goodness-of-Fit Statistics

Criterion	Value	DF	Value/DF	Pr > ChiSq
Deviance	70.0393	13	5.3876	<.0001
Pearson	66.7315	13	5.1332	<.0001

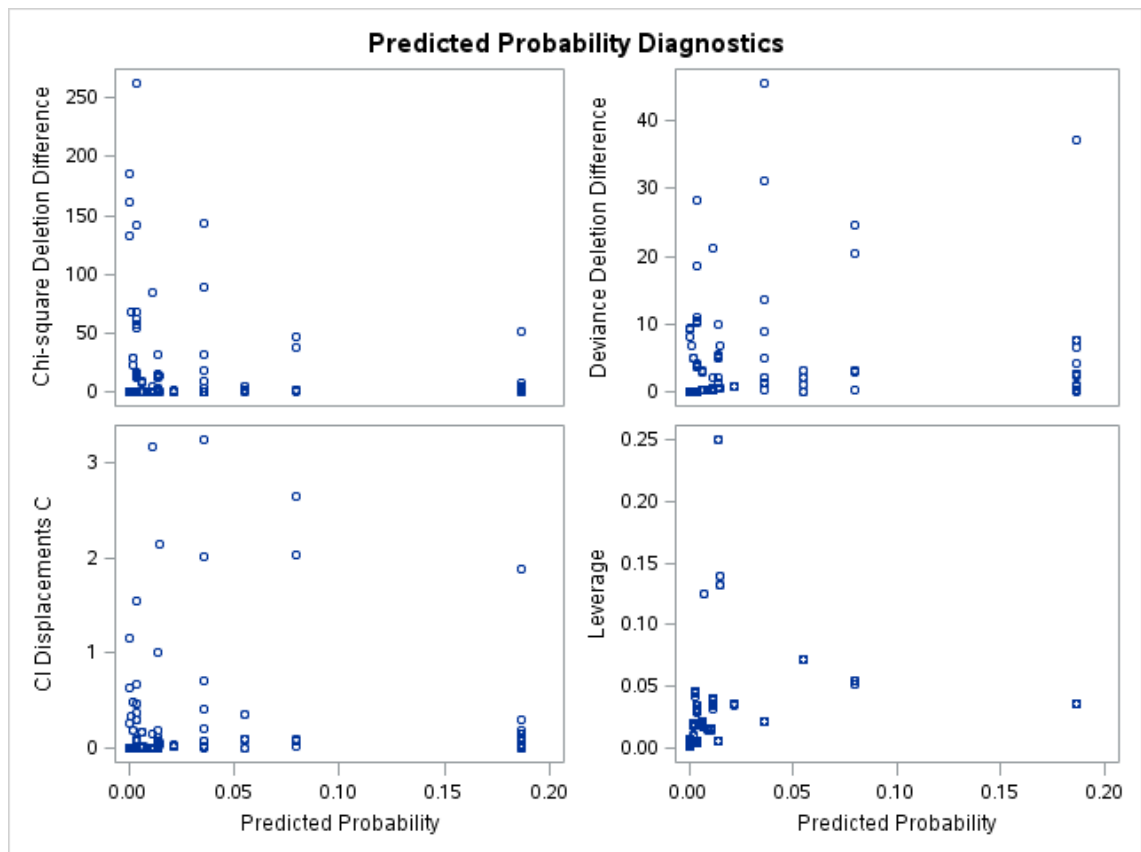
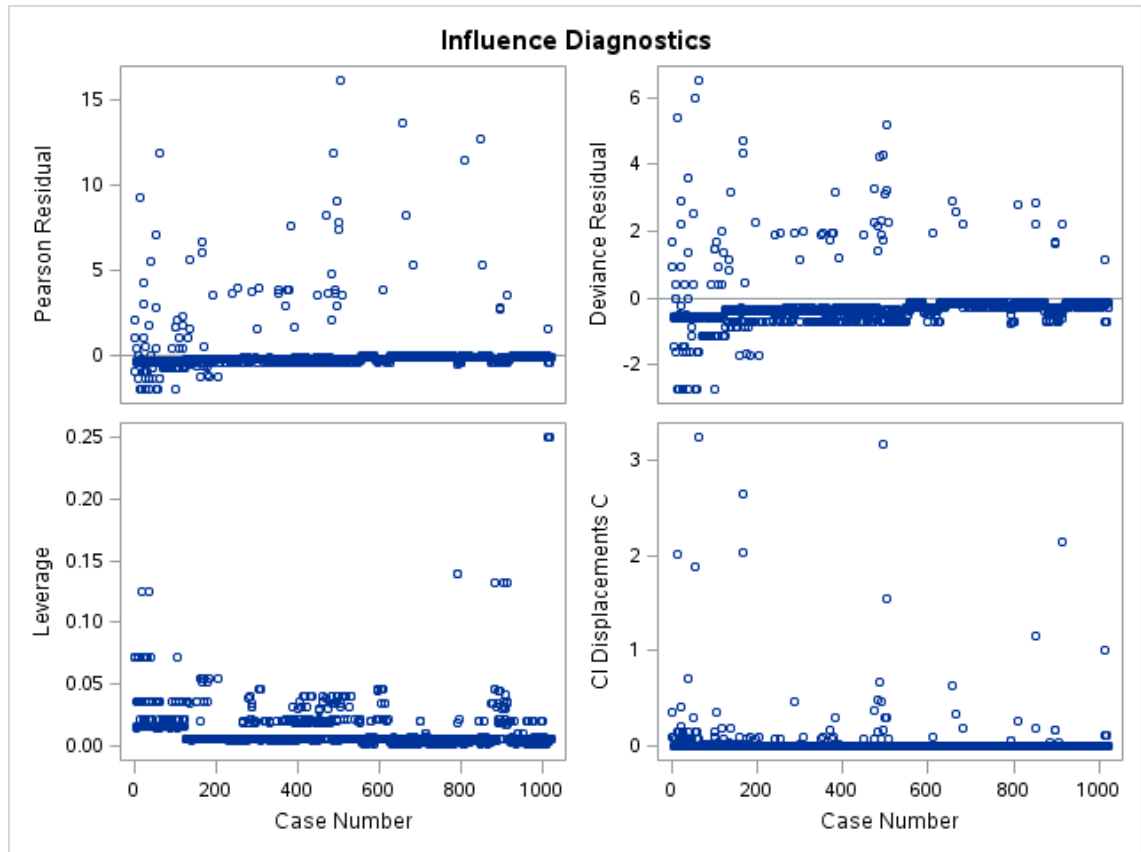
Number of unique profiles: 27

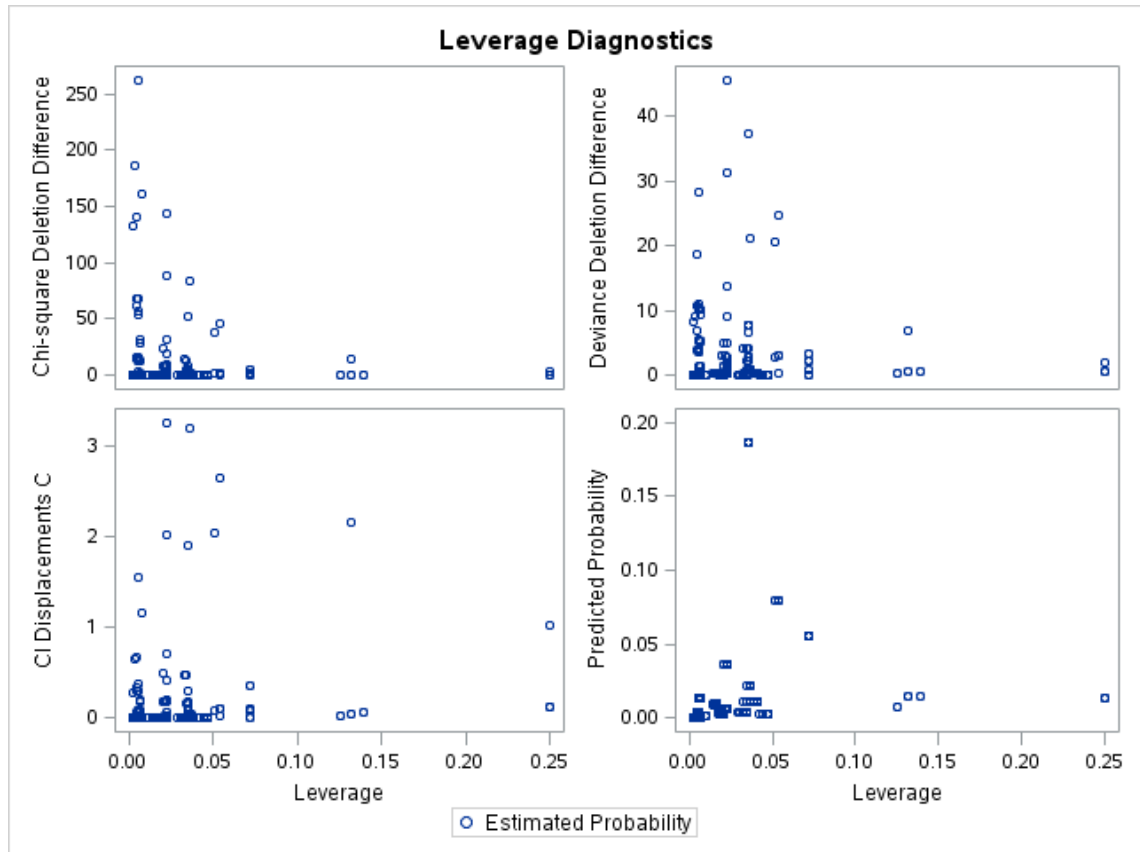
Partition for the Hosmer and Lemeshow Test

Group	Total	Event	Nonevent	Observed	Expected
1	2112	3	0.75	2109	2111.25
2	1554	0	0.78	1554	1553.22
3	1040	1	0.91	1039	1039.09
4	1892	2	3.55	1890	1888.45
5	1009	1	2.35	1008	1006.65
6	1842	10	6.11	1832	1835.89
7	2644	16	10.14	2628	2633.86
8	1754	4	14.12	1750	1739.88
9	2605	19	34.97	2586	2570.03
10	1593	149	131.32	1444	1461.68

Hosmer and Lemeshow Goodness-of-Fit Test

Chi-Square	DF	Pr > ChiSq
32.1133	8	<.0001





2.2. Banco de dados – Inquéritos Seroepidemiológicos

Deviance and Pearson Goodness-of-Fit Statistics

Criterion	Value	DF	Value/DF	Pr > ChiSq
Deviance	1021.8687	716	1.4272	<.0001
Pearson	1573.7294	716	2.1979	<.0001

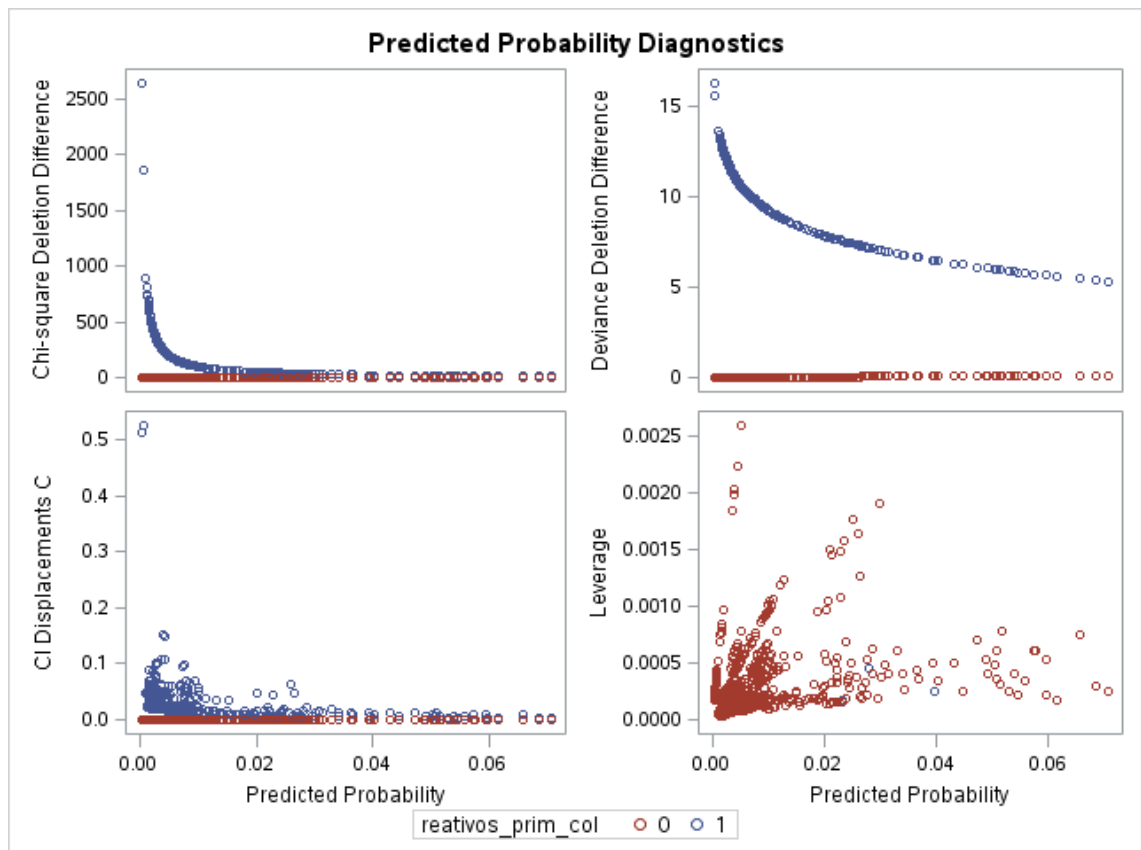
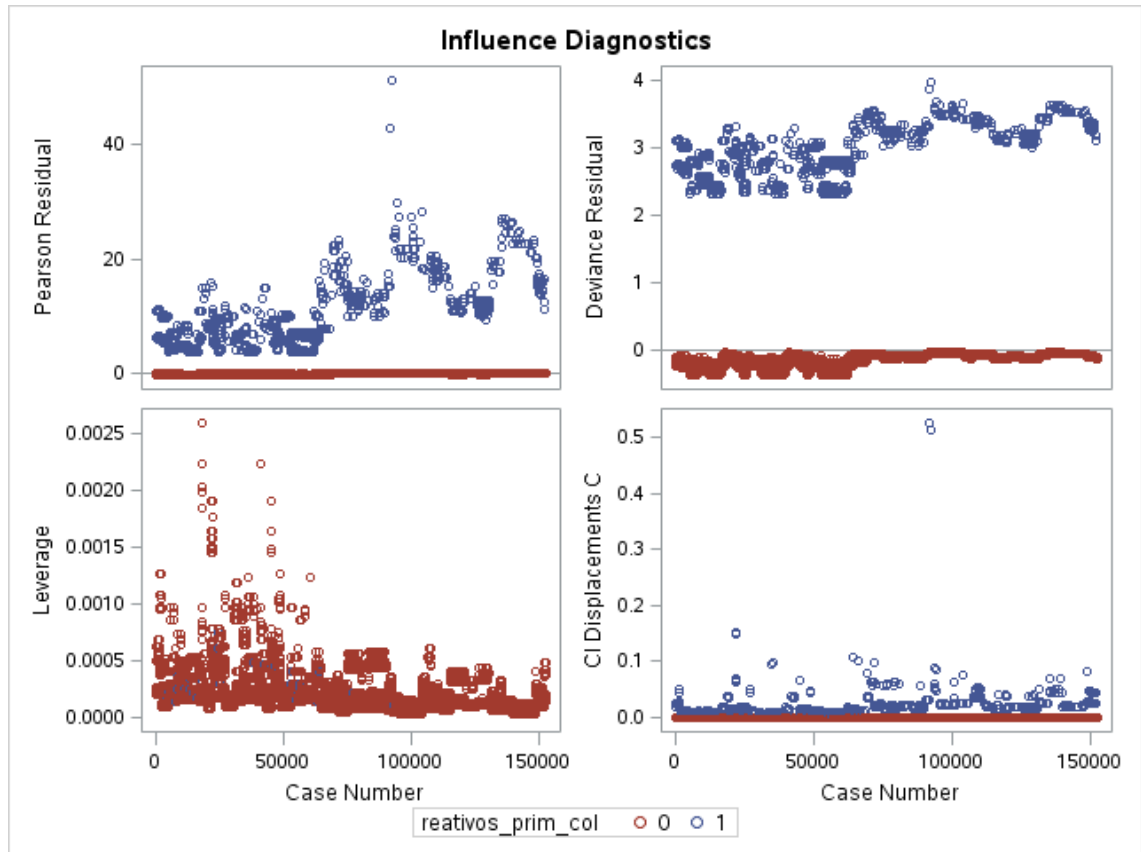
Number of unique profiles: 743

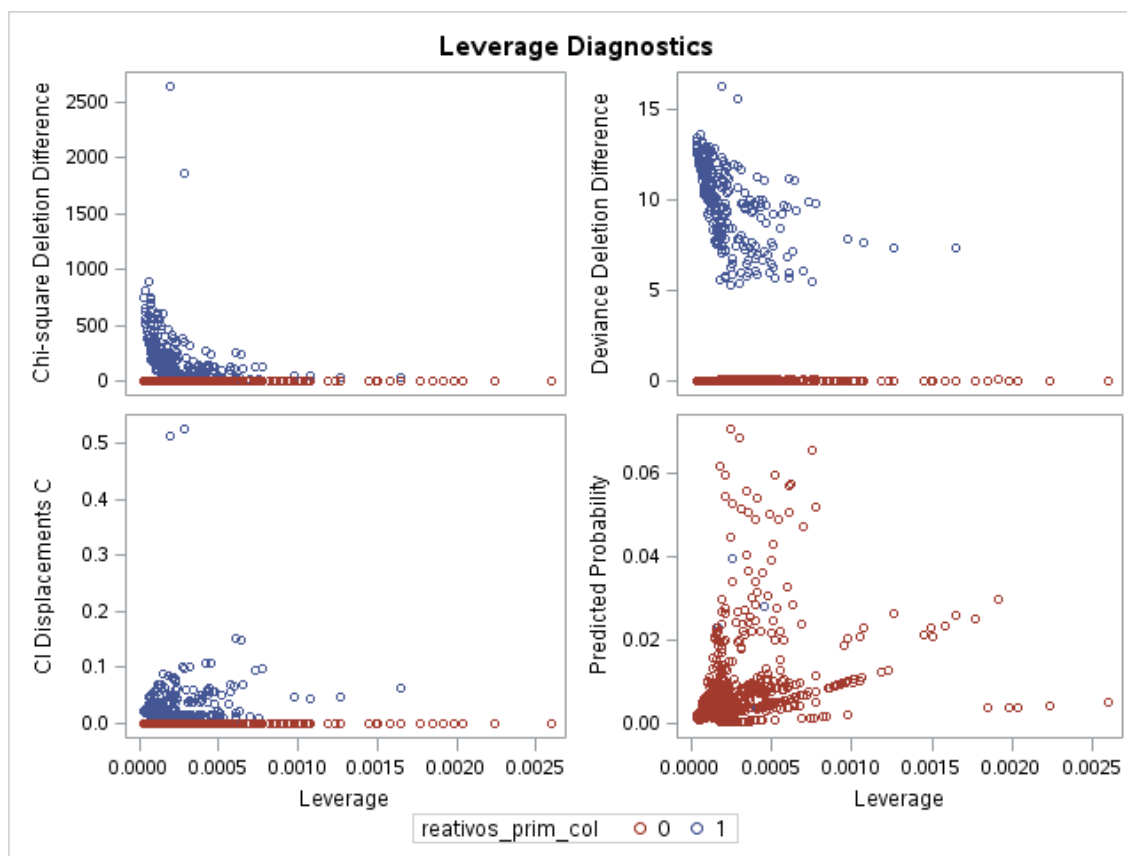
Partition for the Hosmer and Lemeshow Test

Group	Total	reativos_prim_col = 1		reativos_prim_col = 0	
		Observed	Expected	Observed	Expected
1	15148	34	22.38	15114	15125.62
2	15290	35	32.51	15255	15257.49
3	15351	75	45.96	15276	15305.04
4	15281	69	68.12	15212	15212.88
5	15079	73	87.11	15006	14991.89
6	15342	84	116.84	15258	15225.16
7	15252	170	155.91	15082	15096.09
8	15313	255	268.82	15058	15044.18
9	15492	375	428.27	15117	15063.73
10	15366	930	874.07	14436	14491.93

Hosmer and Lemeshow Goodness-of-Fit Test

Chi-Square	DF	Pr > ChiSq
48.8603	8	<.0001





2.3 – Considerações sobre os resultados obtidos

Foram obtidas três medidas estatísticas de ajuste do modelo (Deviance, Pearson e Hosmer/Lemeshow Test) e em todas elas os resultados demonstraram, numa primeira análise, deficiência quanto ao ajuste do modelo ($p < 0,05$). Neste sentido, Allison (2014) em seu trabalho, executa simulações para diferentes testes de ajuste para modelos com $N=100$ e $N=500$, encontrando grande variação nos resultados obtidos quanto à adequação dos testes ao fim proposto. Em sua conclusão afirma que qualquer teste de ajuste em modelos com tamanhos de amostras muito grandes, como é o caso do presente trabalho, pode não ser possível encontrar um valor-p maior do que 0,05.

A partir da análise gráfica do diagnóstico do modelo pode-se identificar alguns pontos extremos, que possam ter grande influência nos coeficientes ou no ajuste do modelo. Ainda, no modelo dos inquéritos soropidemiológicos, especificamente, é possível notar que, apesar da grande concentração das amostras em pontos de menor influência e alavancagem, dois pontos se destacam em quase todos os gráficos (posteriormente identificados como as observações 91999 e 92280). Entretanto, optou-se neste trabalho por não excluir quaisquer observações dado que foram todas obtidas diretamente dos experimentos e inquéritos.