

**Cuvinte cheie:** tuberculoza bovină, diagnostic pe animale în viață, diagnostic pe animale sacrificate.

## REZUMAT

Teza intitulată „**CERCETĂRI COMPARATIVE PRIVIND UTILIZAREA UNOR TESTE DE DIAGNOSTIC ÎN TUBERCULOZA BOVINĂ** ” este motivată științific și practic de următoarele aspecte:

- tuberculoza continuă să fie una din principalele boli la animale, atât din cauza pierderilor economice mari pe care le produce cât mai ales din cauza pericolului pe care îl reprezintă pentru sănătatea omului;
- deși ca urmare a aplicării măsurilor sanitare veterinare pentru prevenire și combatere tuberculoza bovină s-a redus considerabil, infecția tuberculoasă nu poate fi controlată cu maxim de eficiență datorită necunoașterii incidenței reale în rândul animalelor receptive;
- introducerea unor metode complementare de diagnostic ar putea constitui un suport mai rațional și mai fidel în ceea ce privește decizia de a îndruma la sacrificarea în abator a unui animal reagent la tuberculină, decât testele alergice privite la modul singular;
- diferențierea sensibilității specifice la tuberculină de reacțiile paraalergice și pseudoalergice a devenit o necesitate în condițiile în care în ultimele decenii s-a evidențiat un număr tot mai mare de unități și gospodării în care nu s-a confirmat tuberculoza la animalele reagente la tuberculinare.

Teza are 274 pagini și este structurată, în conformitate cu prevederile legale actuale, în două părți principale: prima parte intitulată „*Stadiul cunoașterii* “ cuprinde 92 pagini reprezentând 33,58 % din teză și partea a doua „*Cercetări proprii* ”, reprezentând 66,42 % din teză. Lucrarea cuprinde 35 tabele și 43 de figuri (grafice și fotografii), pentru o mai bună prezentare a conținutului. Bibliografia consultată cuprinde 236 de titluri din literatura de specialitate autohtonă și străină.

Prima parte - „*Stadiul cunoașterii*“, cuprinde două capitole, în care sunt prezentate succinct, informații din literatura de specialitate referitoare la subiectul tezei, date care au fost folosite pentru interpretarea și compararea rezultatelor obținute în partea a doua.

În primul capitol sunt prezentate date privind taxonomia genului *Mycobacterium* precum și caracterele morfologice, culturale, biochimice și de patogenitate ale micobacteriilor. Astfel, în cadrul genului *Mycobacterium* au fost descrise numeroase specii, care pot fi sistematizate în trei grupe: micobacterii patogene, micobacterii oportuniste și micobacterii saprofite. De asemenea, au fost descrise formele „L” bacteriene care sunt aspecte particulare ale bacteriilor caracterizate în esență prin forme granulare, sferice (sferoplaste), cu defect sau lipsa completă a peretelui celular și în același timp printr-o relativă rezistență față de factorii din mediul ambiant. S-au prezentat date referitoare la „factorii de virulență” ai micobacteriilor care sunt similari cu diferitele structuri antigenice prin care acestea se sustrag acțiunii antagoniste a mecanismelor de apărare ale gazdei reușind să supraviețuiască și să se multiplice îndeosebi la locul de pătrundere.

În capitolul al II-lea „Implicațiile genului *Mycobacterium* în patologia animală” este descrisă, pe baza literaturii consultate, infecția cu *Mycobacterium bovis*. S-a accentuat modul de transmitere a speciei *Mycobacterium bovis* de la bovine la alte specii domestice, convențional domestice sau sălbatice și la om. De asemenea au fost evidențiate modalitățile de diagnostic a tuberculozei bovine, ținând cont că există o diferență de principiu între modul în care se pune problema diagnosticului de tuberculoză la bovine, față de celelalte specii. Această diferență se referă la faptul că, pe câtă vreme la toate celelalte specii întâi apare suspiciunea de tuberculoză, în baza unor observații clinice sau necropsice, care suspiciune se impune apoi a fi verificată prin diverse alte examene, în cazul tuberculozei bovine este absolut necesar ca suspiciunea să apară în baza examenului alergic, efectuat în mod sistematic la toate bovinele (sănătoase), urmând ca rezultatele pozitive la testul alergic să fie apoi confirmate prin alte examene.

Partea a II-a „*Cercetări proprii*” cuprinde patru capitole, concluziile generale și bibliografia, în care sunt prezentate și discutate rezultatele investigațiilor efectuate.

În capitolul al IV-lea este prezentat diagnosticul tuberculozei pe animalele în viață. Investigațiile epidemiologice în direcția tuberculozei bovine s-au efectuat în perioada 2000-2005. S-au prelucrat și valorificat o serie de date multianuale referitoare la evoluția tuberculozei bovine în județul Vaslui. Prelucrarea datelor s-a efectuat prin diverse metode matematice, de la simpla medie aritmetică a unor șiruri multianuale, până la formule consacrate în aprecierea valorii intrinsece a testului alergic (sensibilitate, specificitate) și în stabilirea unor indici epidemiologici : prevalența și incidența bolii.

Astfel, s-a stabilit că sensibilitatea testului alergic în perioada analizată a fost de 78,57%, specificitatea de 99,74%, în condițiile unei prevalențe de 0,0019% și a unei incidențe de 0,02%. Specificitatea foarte mare a testului alergic (99,74 %) pare verosimilă, în condițiile unei prevalențe reale foarte reduse a bolii în teritoriul analizat.

Diagnosticul de laborator al tuberculozei pe animalele în viață s-a realizat prin testul imunoenzimatic, procedeul sandwich pentru detectarea gamma- interferonului, testul glutaralhidei și reacția de fixare a complementului.

Testul imunoenzimatic EIA<sub>s</sub> –  $\gamma$  IFN reprezintă o posibilitate de exploatare pentru diagnostic care ar putea elimina un procent însemnat din erorile tuberculinării, evitând sacrificarea unor animale valoroase neinfectate sau menținerea în efectiv a unor vaci infectate cu *M. bovis*, cu infecție tuberculoasă în stadii incipiente, înainte de invadarea organismului și de răspândirea largă a micobacteriilor patogene în mediu.

Studiul a fost efectuat pe efectivele de bovine în vârstă de peste 6 luni care au fost supuse testului intradermotuberculinic simplu (IDR-TU).

Animalele reagente (pozitive și/sau dubioase) la IDR- TU au fost recontrolate după 15-30 de zile prin metoda imunoenzimatică de detecție a gamma-interferonului, procedeul sandwich (EIA<sub>s</sub>-  $\gamma$  IFN), folosind trusa omologată sub denumirea de „BOVIGAM - kit- EIA<sub>s</sub>”. De la aceste animale s-au recoltat probe de sânge pe anticoagulant (heparină), probele au fost apoi stimulate cu PPD bovin și PPD aviar. După incubarea culturilor de sânge integral la 37<sup>0</sup>C, timp de 16-24 de ore, s-a recoltat plasma. Pentru fiecare probă s-a luat în calcul un martor de control, nestimulat. Limfocitele stimulate separat cu PPD bovin și PPD aviar au eliberat gamma-interferonul, al cărui nivel de detecție a fost apreciat spectrofotometric în densitate optică (DO 450 nm). Materialul cercetat a constat în 743 probe sânge prelevate pe anticoagulant de la bovine reagente la testele alergice. În urma efectuării testului s-a constatat că un procent de 5,25 % dintre bovine au prezentat reacții pozitive la testul EIA<sub>s</sub>-  $\gamma$  IFN. Peste 26,51 % dintre ele au fost încadrate la categoria reactante aviare. Procentul relativ crescut de reacții pozitive la PPD aviar sugerează infecții cu micobacterii atipice, cele din complexul *M. avium* sau intervenția altor agenți etiologici care pot determina alte afecțiuni (echinococoză, fascioloză, bruceloză, leucoză etc.). Un număr de 8 (1,08%) animale au reacționat neconcludent.

În subcapitolul 4.3.2. sunt prezentate rezultatele obținute în urma efectuării testului glutaralhidei. Această metodă se bazează pe proprietatea acestei aldehide de a

polimeriza cu grupările aminice din structura proteinelor serice. Glutaraldehida diluată creează legături intermoleculare cu Ig G și cu fibrinogenul. Timpul de gelificare a sângelui în amestec cu glutaraldehida diluată este invers proporțional cu concentrația în Ig G și a fibrinogenului din sânge. Studiul s-a efectuat pe cele 168 de bovine reagente la testul EIA<sub>s</sub>- $\gamma$  IFN. Rezultatele au fost următoarele: 37,5 % din bovine au reacționat pozitiv la test, iar 17,26 % au fost dubioase.

Animalele reacționate pozitiv la tuberculinare au reacționat pozitiv și la testul glutaraldehidei, doar că timpul de gelificare a sângelui a fost diferit. Testul glutaraldehidei a fost dubios (cu gelificare între 12 – 13 minute) la un număr de 29 de bovine reacționate pozitiv la tuberculinare. S-a observat că un procent de 45,24% din bovinele testate au reacționat negativ la testul glutaraldehidei. S-ar putea concluziona că testul glutaraldehidei nu depistează bovinele tuberculoase în fazele incipiente de boală.

Datorită faptului că este totuși un test extrem de simplu, poate fi utilizat în paralel cu tuberculina și interpretat în contextul datelor epidemiologice.

Reacția de fixare a complementului a fost un alt test utilizat pentru diagnosticul animalelor în viață. Studiul s-a efectuat pe cele 168 de bovine reagente la testul EIA<sub>s</sub>- $\gamma$  IFN. Analiza datelor demonstrează că 7,14 % din animale au reacționat pozitiv, 45,24 % au fost dubioase.

Din cele 76 animale reacționate dubios la RFC, 60 au fost pozitive la testul glutaraldehidei .

Cele 12 animale reacționate pozitiv la RFC au reacționat pozitiv și la testul glutaraldehidei, gelificând sângele în primele 6 minute – 7 cazuri, iar restul între 7 și 10 și mai mult de 10 minute. Procentul destul de mare (45,24%) de bovine tuberculinoreagente care au avut o reacție dubioasă la R.F.C. sugerează reacții pseudoalergice și paraalergice la tuberculinare, precum și o activitate anticomplementară a serurilor testate.

O parte din animalele de la care s-au recoltat probe de sânge pentru testele descrise anterior au fost sacrificate de control în abator, examinându-se carcasele și organele și recoltându-se probe pentru diagnosticul de laborator al tuberculozei. Din cele 168 de bovine luate în studiu, s-a diagnosticat tuberculoză în urma diagnosticului complex de laborator la numai 11 animale (6,55 %).

În concluzie, prin utilizarea concomitentă a testului alergic, testul glutaraldehidei, al RFC- ului și a testului imunoenzimatic ELISA, se poate proceda cu mai

mult discernământ în ceea ce privește destinarea spre tăiere a animalelor reacționate pozitiv, decât în situația utilizării numai a tuberculinării, ca test de depistare.

În capitolul al V-lea este prezentat diagnosticul tuberculozei pe animalele sacrificate. În perioada 2000-2005, s-au examinat 69 de probe în vederea examenelor anatomopatologice, bacteriologice, histopatologice și a bioprobei pe cobai.

Examenul anatomopatologic s-a efectuat pe probe provenite de la bovinele sacrificate în abator ( 57 bovine tuberculo-reagente și 12 bovine tuberculo-negative). De la acestea s-au prelevat nodulii limfatici ai capului, gâtului, toracelui, mediastinali, mezenterici precum și ai organelor interne: cordul, pulmonii, ficatul, splina, rinichii, glanda mamară, organele genitale care s-au examinat pentru evidențierea leziunilor macroscopice. S-au depistat leziuni nodulare cenușii sau galben pal, cu consistența fermă și centrul cazeos- gălbui, uscat, neîncapsulate, neenuclate și de diferite dimensiuni, cu diametrul între 0,5- 3 cm la un număr de 11 (15,94%) cazuri S-au mai constatat și noduli cu consistența mărită, chiar duri datorită proceselor de calcificare. Pe de altă parte, la cele 3 cazuri de animale tuberculino-negative care au fost confirmate prin examene de laborator, au fost decelate leziuni vizibile pentru tuberculoza bovină în limfonoduri și în organele parenchimotoase.

De asemenea, 15 (21,74%) probe limfonoduri și organe au provenit de la bovine reacționate pozitiv la testul ELISA. La acestea s-au semnalat modificări atribuite tuberculozei bovine în limfonoduri și organe la un număr de 7 (46,66 %) bovine.

La probele analizate provenite de la bovine reacționate pozitiv la testul EIAs-  $\gamma$  IFN, a fost consemnată prezența chiștilor de *Echinococcus granulosus*, în diferite stadii și de diferite dimensiuni, la un număr de 6 (40 %) probe. Alte modificări constatate la probele examinate au fost : prezența de focare de antracoză în limfonodulii bronhici și mediastinali la un număr de 11(15,94 %) probe, distrofie hepatică și renală la un număr de 5 (7,25 %) probe.

În subcapitolul 5.2. sunt prezentate rezultatele obținute în urma examenului bacterioscopic efectuat din secțiunile de organe și țesuturi din fiecare zonă în care au fost constatate congestii, infiltrații, cazeificări, densificări, prin amprente pe lame prin presare.

Preparatele au fost apoi uscate, fixate și colorate prin tehnici de colorare la cald (metoda Ziehl – Neelsen) sau prin tehnica de colorare fluorescentă cu auramină-rodamină.

La examenul microscopic al preparatelor prin colorația Ziehl- Neelsen, micobacteriile (bacili alcool-acidorezistenți ) au apărut sub formă de bastonașe drepte sau

ușor curbate cu lungimi de 1- 4  $\mu\text{m}$  și lățime de 0,3 până la 0,6  $\mu\text{m}$ , bacili de tip bovin fiind mai scurți s-au colorat în roșu strălucitor și au prezentat granulație. În preparatele executate din leziuni tuberculoase vechi s-au mai identificat și alte forme: coci, cocobacili, pseudomicelii.

Microscopia în lumină fluorescentă a fost utilizată pentru selectarea lamelor cu micobacteriile acido-rezistente și a servit la garantarea existenței micobacteriilor în produsele patologice folosite pentru bioprobă și tipizare. Examenul bacterioscopic s-a efectuat la cele 69 probe analizate în laborator pe 386 lame și a fost pozitiv la 14 (20,29 %) din cele 69 de probe analizate, toate probele fiind confirmate prin examenul histopatologic. Se pot înregistra rezultate fals negative (din cauză că leziunile sunt sărace în bacili) sau fals pozitive (în leziuni pot apărea alte specii ale genului *Mycobacterium*, oportuniste sau ambientale).

Cultivarea micobacteriilor s-a evidențiat în subcapitolul 5.3. - „*Examenul bacteriologic*”. Examenul cultural a constat în pregătirea materialelor patologice și a mediilor de cultură, însămânțarea acestora, incubarea lor urmată de lecturarea și bacterioscopia culturilor. Pentru izolarea micobacteriilor s-a utilizat mediul Löwenstein-Jensen cu și fără glicerină. S-au însămânțat pentru fiecare probă cercetată câte 4 tuburi cu mediu Löwenstein - Jensen (2 cu glicerină și 2 fără glicerină).

Culturile de *M. bovis* au devenit vizibile după 50 zile de la însămânțare în 78,57% din cazuri. Coloniile au prezentat o creștere disgonică (colonii mici, ușor bombate, izolate), de tip S (cu suprafață și margini netede și lucitoare), nepigmentate.

Examenul cultural s-a efectuat la un număr de 50 probe:

- 28 ( 56 %) probe provenite din pulmon și limfonodurile aferente;
- 20 (40 %) probe provenite din limfonodurile capului, toracelui, mezenterici, hepatici, iliaci și din ficat, splină, rinichi, pulmon, aparatul genital;
- 2 ( 4 %) probe din leziuni de la cobaii cu bioproba pozitivă.

Pe unele medii (21,43%) au apărut colonii cu creștere eugonică, adică după 10 zile de la incubare, cu aspect neted, rotunde, alb-gălbui.

Mediile inoculate cu probe suspecte a conține *M. avium* s-au incubat la 42<sup>o</sup> C. S-a observat că tulpinile cu creștere eugonică au continuat să se dezvolte și la această

temperatură. În urma examenului cultural pe 200 tuburi s-au izolat 14 (7%) tulpini bacteriene.

Examenul bacteriologic a oferit rezultate pozitive în plus față de examenul bacterioscopic, permițând obținerea într-o formă prelucrabilă a preparatelor pentru testele de identificare : testul niacinei, testul catalazei și testul nitrat-reductazei .

Testele speciale pentru identificarea micobacteriilor s-au efectuat la cele 14 tulpini izolate la examenul bacteriologic.

S-a observat la examinarea caracterelor biochimice că 9 tulpini (64,29 %) au fost catalazo-pozitive, 5 tulpini (35,71 %) au fost catalazo-negative, toate cele 14 tulpini nu au redus nitrații și au dat un rezultat negativ la testul niacinei. Dintre tulpinile care au reacționat pozitiv la testul catalazei, 3 (33,33%) au fost intens pozitive.

Un alt aspect abordat în diagnosticul tuberculozei bovine a fost examenul histopatologic. Probele prelevate în acest scop au fost: limfonodurile capului, ale tractusului respirator precum și alte limfonoduri și organe care au prezentat modificări macroscopice. Imediat după recoltare, probele au fost fixate în formol 10%. Fixarea probelor a fost urmată de spălarea lor, includerea în parafină, microtomia, etalarea și lipirea secțiunilor pe lamă, deparafinarea și hidratarea secțiunilor.

Metodele de colorare a secțiunilor de țesuturi etalate pe lamă au fost : hematoxilină - eozină - albastru metil (HEA) și Ziehl- Neelsen modificată (care permite evidențierea structurii histopatologice a țesutului și a bacililor acido- alcoolorezistenți).

Toate probele (69) primite în laborator pentru diagnosticul tuberculozei bovine au fost cercetate din punct de vedere histopatologic, pentru fiecare probă executându-se cel puțin două lame din fiecare secțiune.

La probele cu diagnostic de tuberculoză confirmat, s-au constatat aspecte morfologice patognomonice bolii: granulomul tuberculos constând într-o zonă centrală de necroză înconjurată de celule epitelioid și celule gigante multinucleate de tip Langhans aflate la periferia plăcii de celule epitelioid.

În stadiile incipiente ale infecției tuberculoase la examenul histopatologic s-au evidențiat aglomerări de macrofage, limfocite și fibroblaste .

Modificările histopatologice caracteristice pentru tuberculoza bovină asigură certitudinea diagnosticului încă din fazele timpurii ale bolii. În viitor, datorită valorii de diagnostic a examenului histopatologic prin metoda de colorare Ziehl-Neelsen modificată,

s-ar putea ca acesta să aibă valoare decizională în stabilirea diagnosticului, fără să mai fie necesară bioproba, reducând astfel perioada de emiteră a buletinului de analiză.

Bioproba (subcapitolul 5.6.) pe cobai reprezintă metoda standard pentru confirmarea diagnosticului de tuberculoză bovină. Inocularea la cobai pune în evidență numai bacili aparținând speciilor *M.tuberculosis* și *M.bovis*, socotindu-se că pentru *M.bovis* inocularea la cobai este o metodă mai eficace decât însămânțarea.

Bioprobele s-au executat din materialul patologic supus prelucrării pentru îmbogățirea germenilor odată cu efectuarea însămânțărilor pe mediul Löwenstein-Jensen cât și la apariția coloniilor pe acest mediu.

S-au inoculat câte 2 cobai tineri masculi în greutate de peste 300 g. Cu 7-10 zile înainte de inoculare, cobaii s-au termometrat (valori normale: 37,8 - 39,2 °C).

Infecția experimentală s-a realizat prin inocularea cobailor pe cale subcutanată, în pliul iei, cu câte 1 ml din inoculul pregătit, după o prealabilă depilare și dezinfecție a pielii cu tinctură de iod. Animalele inoculate au fost ținute sub observație o perioadă de 60 de zile, timp în care s-au urmărit zilnic.

La 21 zile de la inoculare, s-a efectuat examenul clinic al cobailor prin palparea limfocentrului de la locul de inoculare. S-a observat că acesta este hipertrofiat la aproximativ 50% din cobai. Acest lot de cobai a fost supus unui examen alergic prin test unic, prin inocularea intradermică a tuberculinei PPD în doză de 0,1 ml diluție 1/5. Citirea s-a făcut la 24-48 ore, apreciindu-se dimensiunea și caracterele edemului. Cobaii care la finalul experimentului au prezentat leziuni caracteristice de tuberculoză, au răspuns pozitiv, în procent de 100%, la reacția alergică, prin apariția la locul de inoculare a unui edem însoțit de eritem.

Nu s-au semnalat reacții alergice nespecifice la cobaii care au prezentat bioproba negativă.

Bioproba s-a efectuat pentru 48 de probe primite în laborator în perioada luată în studiu. La probele primite de la animale tuberculo-negative, bioproba pe cobai s-a efectuat la 3 dintre probe, adică la cele care au avut modificări anatomopatologice și histopatologice care au dus la suspiciunea diagnosticului de tuberculoză.

La cobaii examinați în urma inoculării de produse patologice, s-a observat că organul cel mai afectat a fost splina. Aceasta a fost mult mărită în volum, cu parenchimul granulat, cu zone de necroză de culoare alb-cenușie, de dimensiuni variabile, cu margini neregulate.



Al doilea organ afectat, ca incidență și grad de extindere a leziunilor a fost ficatul, în care au fost decelate focare necrotice alb-cenușii sau alb-gălbui, de dimensiuni variabile, cu margini neregulate.

Limfonodurile regionale s-au mărit în volum, pe secțiune s-au constatat noduli cazeoși alb-cenușii sau alb-gălbui, bine delimitați. Consistența limfonodurilor a fost fermă în cele mai multe cazuri. S-a observat însă că uneori aceasta a fost mult redusă, cu aspect cazeo-purulent, datorită existenței în inocul a unor bacterii contaminante.

Specificitatea leziunilor cobailor a fost verificată prin efectuarea examenului microscopic pentru evidențierea bacililor acido-alcoolorezistenți, cu morfologia caracteristică pentru *M. bovis*. Prin efectuarea frotiurilor din leziunile cobailor s-a decelat un număr mai mare de bacili acido-alcoolorezistenți decât în leziunile limfonodulare corespunzătoare ale bovinelor.

Subcapitolul 5.7. cuprinde studiul statistic al activității de supraveghere bovină prin examene de laborator, pe animale sacrificate. Astfel, în perioada 2000-2005, s-au sacrificat pentru precizarea diagnosticului un număr de 57 (29,28%) de bovine tuberculino-reagente din totalul bovinelor depistate pozitiv la testul alergic. Din cele 69 de probe analizate, boala s-a confirmat la 11 animale, reprezentând 15,94 % procent mediu de contaminare pe întreaga perioadă de studiu. S-a constatat o rată de confirmare de 0,11 % (2/18) în 2001, de 0,36 % (5/14) în 2002, de 0,40 % (2/5) în 2003 și de 0,22% (2/9) în 2004. Distribuția pe structuri de proprietate a fost următoarea :

- 50,72 % din probe proveneau din colectivități. Rata de confirmare în aceste efective a fost de 0,20 % ( 7/35 animale) ;
- 49,28 % dintre probe au provenit de la animale din gospodăriile populației, cu o rată de confirmare de 0,12 % (4/34).

Capitolul al VI-lea cuprinde o schemă de diagnostic extinsă utilizată în diagnosticul tuberculozei la un număr de 33 bovine care se referă atât la diagnosticul infecției pe animalele în viață cât și la diagnosticul pe animalele sacrificate. Testele utilizate au fost: testele alergice (unic și comparativ simultan), testul imunoenzimatic EIA<sub>s</sub>- $\gamma$  IFN, testul glutaraldehidei, reacția de fixare a complementului, examenul anatomopatologic, examenul histopatologic, examenul bacterioscopic, examenul bacteriologic, infecția experimentală pe cobai. În funcție de rezultatele obținute la aceste teste s-a apreciat sensibilitatea și specificitatea fiecărui test de diagnostic pe animalele în viață:

- teste alergice:
  - sensibilitate - 71.43%
  - specificitate - 60.00%
- testul imunoenzimatic EIA<sub>s</sub> -y IFN
  - sensibilitate - 80.00%
  - specificitate - 62.50%
- testul glutaraldehidei
  - sensibilitate - 80.00%
  - specificitate - 50.50%
- reacția de fixare a complementului
  - sensibilitate - 77.77%
  - specificitate - 77.77%

Pentru a stabili valoarea testelor utilizate în diagnosticul tuberculozei în prezenta lucrare s-a calculat specificitatea, sensibilitatea, valoarea predictivă pozitivă și valoarea predictivă negativă a testului. De asemenea pentru a se compara testele s-a calculat statistic indicele de concordanță Kappa Cohen care s-a estimat folosind un program statistic.

Tot pentru compararea testelor s-a calculat frecvența celor patru categorii de rezultate și modul de distribuție a rezultatelor dubioase furnizate de cele cinci teste, în comparație cu rezultatul diagnosticului complex de laborator.

**Testul unic și cel comparativ simultan**, la cele 33 de animale examinate, au furnizat trei categorii de rezultate: 9 (27,27%) rezultate pozitive, 8 (24,24%) rezultate negative și 16 (48,48%) rezultate dubioase. Dintre acestea, în urma efectuării testului de diagnostic complex, 11 (33,33%) au fost confirmate ca fiind pozitive iar 22 (66,66%) au fost negative. S-au constatat un număr de 4 rezultate fals pozitive și 2 rezultate fals negative. Din cele 16 rezultate dubioase, 4 au fost pozitive iar 12 au fost negative. Valoarea predictivă pozitivă și cea negativă au avut valori de 0,56 și, respectiv 0,75. Valoarea indicelui de concordanță K Cohen atunci când s-a comparat rezultatele testelor alergice cu rezultatele finale a fost de 0,30. Există o corelație pozitivă slabă între cele două seturi de rezultate.

Și în cazul **testului imunoenzimatic** s-au constatat un număr de 15 (45,45%) rezultate dubioase (este vorba de probele care au reacționat ca reactant aviar). De asemenea au fost identificate trei (9,09%) rezultate fals pozitive și două (6,06%) rezultate fals

negative. Valorile predictive pozitive și negative au fost de 0,72 respectiv 0,71. În cazul probelor dubioase proporția rezultatelor pozitive a fost mult mai mică în comparație cu testele alergice. Valoarea indicelui de concordanță a fost de 0,43 sugerând o corelație pozitivă moderată între rezultatele diagnosticului complex de laborator și rezultatele testului imunoenzimatic.

**Reacția de fixare a complementului** utilizată pentru diagnosticarea tuberculozei a furnizat la cele 33 de bovine supuse examenului complex 9 (27,27%) rezultate pozitive, 9 (27,27%) rezultate negative și 15 (45,45%) rezultate dubioase. Din cele 15 rezultate dubioase numai două (13,33%) au fost pozitive. Reține atenția proporția mică a rezultatelor fals pozitive (2) și fals negative (2), situație care se reflectă și în valorile parametrilor epidemiologici și statistici folosiți pentru caracterizarea testelor .

La **testul glutaralhidei**, din cele 33 de cazuri, 15 (45,45%) au fost pozitive, 9 (27,27%) au fost negative și 9 (27,27%) au fost dubioase. La acest test s-a înregistrat un număr mare de rezultate fals pozitive (7 din 15) ceea ce a condus la obținerea unei specificități de numai 50%. Rezultatele obținute, comparate cu rezultatele diagnosticului complex de laborator a condus la obținerea unui coeficient K Cohen de 0,28 caracteristic unei corelații nesemnificative.

Comparând rezultatele obținute se poate concluziona că, în condițiile studiului efectuat, pe baza valorilor parametrilor calculați, cele mai bune teste s-au dovedit a fi testul imunoenzimatic, reacția de fixare a complementului și testul glutaralhidei care se remarcă prin proporția mică a rezultatelor false, numărul mic al rezultatelor pozitive cuprinse în categoria rezultatelor dubioase, specificitatea și sensibilitatea ridicată.

Specificitatea și sensibilitatea testelor alergice arată că acestea au furnizat rezultate comparabile cu celelalte teste dar există un număr mare de teste dubioase din care în urma diagnosticului complex de laborator 25 % s-au dovedit a fi pozitive.

În ceea ce privește valorile predictive negative și pozitive, valorile mici obținute sunt normale dacă se are în vedere prevalența redusă a tuberculozei în populația de bovine investigată.

Rezultatele acestui studiu asupra sensibilității și specificității testelor de diagnostic a tuberculozei bovine sugerează că prin utilizarea concomitentă a testului alergic, a testului glutaralhidei, a RFC- ului și a testului imunoenzimatic ELISA se poate proceda cu mai mult discernământ în ceea ce privește destinarea spre tăiere a animalelor reacționate pozitiv, decât în situația utilizării numai a tuberculinării, ca test de depistare.