

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ
ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΠΑΡΑΦΥΜΑΤΙΩΣΗ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΙΓΩΝ: ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ
ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑΣ ΤΩΝ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΣΚΟΠΟ
ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΤΟ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΩΝ ΖΩΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΟΛΥΧΡΟΝΗΣ Π. ΚΩΣΤΟΥΛΑΣ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

ΚΑΡΔΙΤΣΑ, 2006

Στην οικογένειά μου

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ
ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΠΑΡΑΦΥΜΑΤΙΩΣΗ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΙΓΩΝ: ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ
ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑΣ ΤΩΝ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΣΚΟΠΟ
ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΤΟ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΩΝ ΖΩΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΟΛΥΧΡΟΝΗΣ Π. ΚΩΣΤΟΥΛΑΣ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

ΚΑΡΔΙΤΣΑ, 2006

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναπλ. Καθηγητής
Καθηγητής
Επ. Καθηγητής
Καθηγητής
Καθηγήτρια
Αναπλ. Καθηγήτρια
Επ. Καθηγητής

Λ. Λεοντίδης
Η. Κυριαζάκης
Χ. Μπιλλίνης
Ι. Βλέμμας
Ε. Μπουρτζή-Χατζοπούλου
Α. Ρόδη-Μπουριέλ
Γ.Σ. Αμοιρίδης

Επιβλέπων
Μέλος Συμβ. Επιτροπής
Μέλος Συμβ. Επιτροπής
Μέλος Εξετ. Επιτροπής
Μέλος Εξετ. Επιτροπής
Μέλος Εξετ. Επιτροπής
Μέλος Εξετ. Επιτροπής

Περίληψη

Κεφάλαιο 1 - Εισαγωγή

Η εισαγωγή της παρούσας διατριβής διακρίνεται σε δύο μέρη.

Στο πρώτο μέρος γίνεται μια ανασκόπηση της σχετικής με την παραφυματίωση βιβλιογραφίας με έμφαση στην εξέλιξη της λοίμωξης στο ζώο, την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή και τις παρατηρούμενες αλλοιώσεις. Γίνεται σαφές ότι η αξιολόγηση της αξιοπιστίας των διαγνωστικών δοκιμών για τον εντοπισμό των προσβεβλημένων ζώων είναι εξαιρετικά δύσκολη.

Στο δεύτερο μέρος δίνονται αρχικά βασικές επιδημιολογικές έννοιες και ακολουθεί μια ανασκόπηση των υπάρχοντων μεθόδων αξιολόγησης της αξιοπιστίας των διαγνωστικών δοκιμών. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στα μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης που αποτελούν μεθόδους αξιολόγησης της αξιοπιστίας των διαγνωστικών δοκιμών χωρίς την προϋπόθεση της εκ των προτέρων γνώσης της πραγματικής κατανομής των υγιών και προσβεβλημένων ζώων. Αναλύεται η μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes που παρέχει διαφορετική δυναμική στα μοντέλα πρόγνωσης αφού επιτρέπει την ενσωμάτωση υπάρχοντων πληροφοριών στη διαδικασία επίλυσης. Η μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes εφαρμόστηκε στα μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης που αναπτύχθηκαν με σκοπό την αξιολόγηση της αξιοπιστίας τριών ευρύτατα χρησιμοποιούμενων διαγνωστικών δοκιμών για την παραφυματίωση, χωριστά σε αίγες και πρόβατα.

Κεφάλαιο 2 – Η κατά Bayes εκτίμηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας μιας ορολογικής δοκιμής τύπου ELISA και μιας μεθόδου καλλιέργειας κοπράνων για τη διάγνωση της παραφυματίωσης σε πρόβατα και αίγες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης στην Ελλάδα.

Ο σκοπός αυτού του τμήματος της διατριβής ήταν η εκτίμηση της ευαισθησίας (Eu) και της ειδικότητας (Ei) μιας ορολογικής δοκιμής (ELISA) και μιας μεθόδου καλλιέργειας κοπράνων (KK) για τη διάγνωση της παραφυματίωσης χωριστά σε κλινικά υγιή πρόβατα και αίγες προσβεβλημένων εκτροφών, με την εφαρμογή μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης. Η επίλυση των μοντέλων έγινε με τη μεθοδολογία κατά Bayes. Η πιθανότητα της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας ή εξάρτησης των αποτελεσμάτων των διαγνωστικών δοκιμών διερευνήθηκε με τη σύγκριση μοντέλων που υπέθεταν την ανεξαρτησία τους με μοντέλα που ελάμβαναν υπόψη την εξάρτηση τους, μεταξύ των υγιών και μεταξύ των προσβεβλημένων ζώων. Διενεργήθηκε, επίσης, ανάλυση των καμπύλων ROC για την ELISA και επιλέχθηκαν βέλτιστα κρίσιμα σημεία διάκρισης (κσδ) με βάση το σχετικό κόστος των σφαλμάτων κατάταξης της ELISA στα προσβεβλημένα και υγιή ζώα.

Δε διαπιστώθηκε εξάρτηση μεταξύ των Eu ή Ei των διαγνωστικών δοκιμών. Υποθέτοντας την υπό συνθήκη ανεξαρτησία τους οι διάμεσες τιμές και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας για την Eu_{ELISA} , Ei_{ELISA} , Eu_{KK} και Ei_{KK} , ήταν 62,5% (42,3-92,8%), 95% (90,2-98%), 7,9 % (2-17,3%) και 98% (95-99,7%) στις αίγες ενώ ήταν 37,3% (10,2-80%), 96,6% (93,2-98,7%), 15,8% (1,9-47,8%) και 97,3% (94,5-99,4%) στα πρόβατα. Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη ROC υπολογίστηκε 0,702 στα πρόβατα και

0,847 στις αίγες. Για την ELISA, η επιλογή του κ.σ.δ. πρέπει να γίνεται με βάση το είδος του ζώου αλλά και το σκοπό του διαγνωστικού ελέγχου. Για παράδειγμα, όταν το πραγματικό ποσοστό προσβολής είναι 20% και θεωρώντας ίσο ή πενταπλάσιο το κόστος του ψευδώς αρνητικού σε σχέση με το κόστος του ψευδώς θετικού αποτελέσματος, το κσδ ήταν 0,3 ή 0,05 στα πρόβατα και 0,6 ή 0,1 στις αίγες, αντίστοιχα. Η συνολική διακριτική ικανότητα της ELISA ήταν καλύτερη στις αίγες παρά στα πρόβατα. Η μείωση του κ.σ.δ. βελτίωσε την E_{ELISA} χωρίς να μειώσει σημαντικά την $E_{I_{ELISA}}$ και στα δύο είδη ζώων.

Κεφάλαιο 3 – Εκτίμηση κατά Bayes της ευαισθησίας και της ειδικότητας δύο μεθόδων καλλιέργειας κοπράνων για τη διάγνωση της παραφυματίωσης σε κλινικά υγιής αίγες και πρόβατα προσβεβλημένων εκτροφών με την εφαρμογή ενός ημι-εξαρτώμενου μοντέλου λανθάνουσας κατάστασης.

Οι σκοποί αυτού του τμήματος της διατριβής ήταν η σύγκριση του ποσοστού των απομονώσεων *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) μεταξύ της καλλιέργειας κοπράνων σε υπόστρωμα Herrold's Egg Yolk (HEYM) και σε υπόστρωμα Lowenstein-Jensen (LJ) και η εκτίμηση της E_u και της E_i των μεθόδων, χωριστά στις κλινικά υγιής αίγες και τα πρόβατα προσβεβλημένων εκτροφών, με τη χρήση μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης και μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes. Το HEYM υποστήριξε την ανάπτυξη του MAP σημαντικά ($P=0,04$) συχνότερα από το LJ ενώ η συμφωνία των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων ήταν πολύ φτωχή (ζυγισμένη τιμή $\kappa=0,062$ (95% διάστημα εμπιστοσύνης: $-0,098-0,222$)). Δε βρέθηκαν ενδείξεις εξάρτησης μεταξύ των E_u , αλλά οι E_i των δύο μεθόδων συσχετιζόνταν θετικά. Επομένως, για την ανάλυση υιοθετήθηκε ένα ημι-εξαρτώμενο μοντέλο που υπέθετε την ανεξαρτησία των E_u και λάμβανε υπόψη την εξάρτηση των E_i . Οι εκτιμήσεις αυτού του μοντέλου για της διάμεσες τιμές και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας (δ.α.) για τις $E_{u_{HEYM}}$, $E_{i_{HEYM}}$, $E_{u_{LJ}}$, $E_{i_{LJ}}$ ήταν 8,4%(0,8-37,1%), 96,7% (93,6-99,3%), 5,1%(0,3-22,9%), 98,6% (96,2-99,7%) στα πρόβατα ενώ ήταν 12,4% (4,1-29,9%), 98,7% (96,1-99,8%), 3,4% (0,2-14,2%), 98,2% (95,7-99,6%) στις αίγες, αντίστοιχα. Η παράλληλη ερμηνεία των αποτελεσμάτων των καλλιιεργειών στα δύο υποστρώματα είχε $E_{u_{\text{παρ}}}$ και $E_{i_{\text{παρ}}}$ 14,7%(2,7-44,7%) και 95,5%(92,1-98,3%) στα πρόβατα και 16,1%(6,2-36,3%) και 97,3%(94,2-99,1%) στις αίγες, αντίστοιχα. Οι E_u των καλλιιεργειών κοπράνων στις υποκλινικά προσβεβλημένες αίγες και πρόβατα ήταν χαμηλές ενώ οι E_i τους σχεδόν απόλυτες. Η ταυτόχρονη χρήση των δύο καλλιιεργειών και η παράλληλη ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους βελτίωσε την E_u με ελάχιστη απώλεια στην E_i και στα δύο είδη ζώων.

Κεφάλαιο 4 – Ο αριθμός των τοκετών δρα ως παράγων αλληλεπίδρασης στη σχέση της γονιμότητας με την υποκλινική παραφυματίωση των αιγών και προβάτων ελληνικών εκτροφών.

Ο σκοπός αυτού του τμήματος της διατριβής ήταν η διερεύνηση της σχέσης μεταξύ υποκλινικής λοίμωξης από MAP και της μη γέννησης ζωντανών αμνών ή εριφίων κατά την περίοδο τοκετών (Νοέμβριος 2001-Ιανουάριος 2002) που προηγήθηκε της

δειγματοληψίας (Απρίλιος – Μάιος 2002), σε 4 κοπάδια προβάτων ή/και αιγών (στο δείγμα 369 ζώα \geq 1,5 ετών). Από κάθε ζώο συλλέχθηκαν 10ml αίματος και 10 γραμμάρια κοπράνων από το απευθυσμένο. Οι συλλεχθέντες οροί εξετάστηκαν για την ύπαρξη αντισωμάτων κατά του MAP με μια ELISA και τα δείγματα κοπράνων καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα Herrold's egg-yolk εμπλουτισμένο με μυκοβακτήνη και αντιβιοτικά. Ένα ζώο θεωρήθηκε ως υποκλινικά προσβεβλημένο όταν ήταν ή οροθετικό ή θετικό στην καλλιέργεια κοπράνων. Το πραγματικό ποσοστό προσβολής υποκλινικά προσβεβλημένων ζώων, λαμβάνοντας υπόψη την Ευ και Ει της παράλληλης ερμηνείας των δύο διαγνωστικών δοκιμών ήταν 14 %(0,1-28%) και 35,9% (9,2-62,7%) στα πρόβατα και τις αίγες, αντίστοιχα. Η σχέση της γονιμότητας με την υποκλινική παραφυματίωση διερευνήθηκε με ιεραρχικά δομημένα μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης. Τα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα, έναντι των υγιών, είχαν σχετικό λόγο πιθανοτήτων (ΣΛΠ) για τη γέννηση ζωντανού απογόνου κατά την προηγούμενη περίοδο τοκετών ίσο με 5,4, αν είχαν πραγματοποιήσει στη ζωή τους έως και 3 τοκετούς, και ΣΛΠ ίσο με 0,05, αν είχαν περισσότερους από 6 τοκετούς, ενώ ο ΣΛΠ δεν ήταν σημαντικός για τα ζώα με ενδιάμεσο αριθμό τοκετών.

Κεφάλαιο 5 – Γενική συζήτηση

Σε αυτό το τμήμα συνοψίζονται τα ευρήματα αυτής της διατριβής και συζητούνται σε σχέση τόσο με τη προϋπάρχουσα δημοσιευμένη σχετική γνώση όσο και με την προοπτική συνέχισης της έρευνας στο μέλλον

**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY SCIENCE
LABORATORY OF EPIDEMIOLOGY, BIostatISTICS AND ANIMAL
HEALTH ECONOMICS**

**PARATUBERCULOSIS IN SHEEP AND GOATS: ESTIMATION OF THE
VALIDITY OF DIAGNOSTIC TESTS DEPENDING ON PURPOSE AND
PRODUCTION STAGE**

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF VETERINARY
SCIENCE**

**POLYCHRONIS P. KOSTOULAS
D.V.M.**

KARDITSA, GREECE, 2006

Summary

Chapter 1 - Introduction

The introductory chapter of this thesis is divided in two parts.

In the first part, the available literature on paratuberculosis is reviewed with particular emphasis on the progression of disease, the host immune response and lesions. It becomes evident that, based on current knowledge, the evaluation of diagnostics for paratuberculosis is largely hampered by the inability to discriminate between healthy and diseased individuals.

In the second part, the available methods of test-validation are presented with particular emphasis on latent-class methodology that does not require a priori knowledge of the true disease-status. Furthermore, the Bayesian methodology in latent-class models, which improves inferences by allowing the incorporation of prior information in the estimation procedure, is presented in detail. It has been applied to the research presented in this thesis for the evaluation of the validity of three diagnostic tests that are frequently employed both for the diagnosis of and the research on the epidemiology of paratuberculosis of sheep and goats.

Chapter 2 – Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in Greek dairy sheep and goats.

The aim of the research presented in this chapter was to estimate the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of a serum ELISA and a faecal culture (FC) method for the diagnosis of paratuberculosis separately in clinically healthy sheep and goats from infected flocks, by using latent-class models. The estimates were obtained by a Bayesian method. The possible dependence of diagnostic errors was investigated by comparing models where independence was assumed to models allowing for conditional dependence given the true disease status. Receiver Operating Characteristic analysis for the ELISA was done and optimized cut-off values based on the misclassification cost-term were determined.

No evidence of conditional dependence in either Se or Sp was found. Assuming independence, medians and 95% credible intervals for the Se_{ELISA} , Sp_{ELISA} , Se_{FC} and Sp_{FC} , were 62.5% (42.3-92.8%), 95% (90.2-98%), 7.9 % (2-17.3%) and 98 (95-99.7%) in goats and 37.3% (10.2-80%), 96.6% (93.2-98.7%), 15.8%(1.9-47.8%) and 97.3%(94.5-99.4%) in sheep. The Area Under the Curve was calculated 0.702 for sheep and 0.847 for goats. For the ELISA, there was a need for species- and purpose-specific cut-off selection. For instance, at 20% prevalence, assuming equal and five-fold cost of a false negative to a false positive test-result, the optimal cut-off was 0.3 and 0.05 in sheep while it was 0.6 and 0.1 in goats, respectively. The ELISA performed better in goats than in sheep. Lowering the cut-off improved the Se_{ELISA} without seriously compromising Sp in either species.

Chapter 3 – Application of a semi-dependent latent model in the bayesian estimation of the sensitivity and specificity of two faecal culture methods for diagnosis of paratuberculosis in sub-clinically infected Greek dairy sheep and goats.

The aim of the research presented in this chapter was to compare the frequency of isolation of MAP from faecal samples grown on Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM) or on Lowenstein-Jensen (LJ) medium and estimate the Se and Sp of the methods separately in clinically healthy sheep and goats from infected flocks, using latent-class models and bayesian estimation procedures. The HEYM supported growth of MAP significantly ($P=0.04$) better than the LJ method and their agreement was very poor (weighted kappa-value=0.062(95% CI: -0.098-0.222)). There was no evidence of dependence between the Se's whereas the Sp's were positively correlated. Thus, a semi-dependent model that assumed independence of Se's and accounted for the dependence of Sp's was adopted. Under this model, medians and 95% credible intervals for Se_{HEYM} , Sp_{HEYM} , Se_{LJ} , Sp_{LJ} were 8.4%(95%CI:0.8-37.1%), 96.7% (93.6-99.3%), 5.1%(0.3-22.9%), 98.6% (96.2-99.7%) in sheep while were 12.4% (4.1-29.9%), 98.7% (96.1-99.8%), 3.4% (0.2-14.2%), 98.2% (95.7-99.6%) in goats, respectively. Parallel interpretation of the results of the two methods resulted in Se_{par} , Sp_{par} of 14.7% (2.7-44.7%), 95.5% (92.1-98.3%) in sheep and 16.1% (6.2-36.3%) and 97.3% (94.2-99.1%) in goats. The Se's of culture in sub-clinically infected sheep and goats were low although the Sp's were almost absolute. The simultaneous use of the methods and parallel interpretation of the results improved the Se with minimal loss in Sp.

Chapter 4 – The association of sub-clinical paratuberculosis with the fertility of Greek dairy ewes and goats varies with parity.

The aim of the research presented in this chapter was to study the association of sub-clinical MAP infection with failing to produce a live offspring the season of lambing/kidding (November 2001 to January 2002) before testing (in April-May 2002), in 4 dairy-sheep and/or goat flocks in Greece (total sample consisting of 369 animals ≥ 1.5 yr old). From each selected animal 10 ml of blood and 10 gr of feces were obtained. The harvested sera were tested for antibodies to MAP with an ELISA; the feces were cultured on HEYM supplemented with mycobactin J and antibiotics. An animal was considered sub-clinically infected when found either seropositive or culture positive. The true prevalence of sub-clinically infected animals, adjusted for the Se and Sp of parallel testing, was 14% (0.1-28%) and 35.9% (9.2-62.7%) in sheep and goats, respectively. The association of fertility with sub-clinical paratuberculosis was investigated in random-effects logistic models. Sub-clinically infected animals (compared to uninfected) had OR for live offspring the previous year of 5.4 for parity <4 , OR = 0.05 for parity >6 , and a non-significant OR for the middle parity category.

Chapter 5 – General discussion

In this chapter the findings of this thesis are summarized and discussed with relevance to both the published before this research relevant knowledge and the future outlook to follow-up research activities.

Ευχαριστίες

Η διδακτορική μου διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Επιδημιολογίας, Βιοστατιστικής και Οικονομίας Ζωικής Παραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θεωρώ ύψιστη υποχρέωση μου να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο δάσκαλό μου και επιβλέποντα αυτής της διατριβής, Αναπληρωτή καθηγητή Λ. Λεοντίδη, για την ουσιαστική καθοδήγησή του και τα όσα ανιδιοτελώς μου προσέφερε. Η διαρκής επικοινωνία μαζί του γέννησε καινούς τρόπους σκέψης και εργασίας. Δε μπορώ ακόμα να λησμονήσω ότι μου εξασφάλισε την απαραίτητη οικονομική στήριξη για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο καθηγητή Χ. Μπιλλίνη, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για την διαρκή και υγιή συνεργασία, την πολύτιμη εμπειρία και την ποικιλότροπη βοήθεια που μου προσέφερε.

Ακόμα, ευχαριστώ πολύ τη συνάδελφο, συνεργάτιδα και φίλη κ. Μ. Φλώρου, για την ανεκτίμητη και ανιδιοτελή βοήθεια της, την ηθική υποστήριξη και την υπομονή της.

Θερμά ευχαριστώ και τη συνάδελφο, συνεργάτιδα και φίλη κ. Μ. Σοφία, για την κεφαλαιώδη συμβολή της, την ηθική στήριξη και την υπομονή της.

Ευχαριστίες θέλω να εκφράσω και στον Καθηγητή Σ. Λεοντίδη για την ουσιαστική συμμετοχή του στο διαγνωστικό έλεγχο των δειγμάτων αλλά και για τις πολύτιμες υποδείξεις κατά τη συγγραφή της διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ πολύ το συνάδελφο C. Επθε, για τη συμβολή του στην εφαρμογή των μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης.

Θέλω ακόμα να ευχαριστήσω το Επίκουρο καθηγητή Γ.Σ. Αμοιρίδη, για την ουσιαστική συμβολή του στην διερεύνηση της σχέσης μεταξύ παραφυματίωσης και γονιμότητας αιγών και προβάτων.

Ευχαριστώ ακόμα και το συνάδελφο κ. Θ. Καρατζίνο, για τη βοήθειά του στην επεξεργασία των δειγμάτων.

Τέλος οφείλω να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, που με τις επισημάνσεις τους συνέβαλαν στην αρτιότερη παρουσίαση της διδακτορικής μου διατριβής.

Οι απαραίτητοι οικονομικοί πόροι για την εκπόνηση της διατριβής αυτής προήλθαν από ανταγωνιστικό ερευνητικό πρόγραμμα της Ευρωπαϊκής Ένωσης (QLK2-CT-2001-00879).

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Summary	9
Ευχαριστίες	12
Περιεχόμενα	13
Κεφάλαιο 1	15
1.1. Εισαγωγή στην παραφυματίωση	17
1.1.1. Αιτιολογία της νόσου	17
1.1.2. Ανοσολογία και Παθογένεια	18
1.1.3. Παθολογοανατομικά ευρήματα	20
1.1.4. Κλινικές εκδηλώσεις	23
1.2 Εισαγωγή στην Μεθοδολογία.....	24
1.2.1. Μέτρηση της νόσου – Διαγνωστικές δοκιμές.....	24
1.2.2. Διακριτική ικανότητα και αξιοπιστία των διαγνωστικών δοκιμών	25
1.2.3. Αξιοπιστία διαγνωστικών δοκιμών	27
1.2.4. Διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα.....	27
1.2.5. Μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης (Latent-class models).	31
1.2.6. Προϋποθέσεις για την εφαρμογή των μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης.....	36
1.2.7. Βαθμοί ελευθερίας και εκτίμηση των παραμέτρων	40
1.2.8. Μέθοδοι επίλυσης.....	41
1.2.9. Εκτίμηση της αξιοπιστίας διαγνωστικών δοκιμών που παίρνουν συνεχείς τιμές.....	44
1.2.10. Εκτίμηση της αξιοπιστίας συνδυασμού διαγνωστικών δοκιμών	47
1.2.11. Εκτίμηση του πραγματικού ποσοστού προσβολής.....	48
1.3. Υπόβαθρο και σκοπός της μελέτης	49
1.4. Βιβλιογραφία	53
Κεφάλαιο 2	61
2.1. Περίληψη.....	63
2.2. Εισαγωγή.....	64
2.3. Υλικά και μέθοδοι	65
2.3.1. Ορισμός της λοίμωξης από MAP	65
2.3.2. Υπό μελέτη πληθυσμός.....	65
2.3.3. Δειγματοληψία.....	66
2.3.4. Διαγνωστικές δοκιμές.....	66
2.3.5. Στατιστική ανάλυση.....	66
2.4. Αποτελέσματα	71
2.5. Συζήτηση	75
2.6. Παράρτημα	80
2.7. Βιβλιογραφία	84
Κεφάλαιο 3	87
3.1. Περίληψη.....	89
3.2. Εισαγωγή.....	90
3.3. Υλικά και μέθοδοι	91
3.3.1. Ορισμός της λοίμωξης.....	91
3.3.2. Υπό μελέτη πληθυσμός.....	91
3.3.3. Δειγματοληψία.....	91
3.3.4. Διαγνωστικές δοκιμές.....	91
3.3.5. Σύγκριση του ποσοστού των απομονώσεων του MAP και μέτρηση της συμφωνίας μεταξύ HEYM και LJ.....	92
3.3.6. Εκτίμηση κατά Bayes της Ευ και της Ει του HEYM και του LJ στα πρόβατα και τις αίγες	93
3.4. Αποτελέσματα	97
3.5. Συζήτηση	98
3.6. Παράρτημα	101
3.7. Βιβλιογραφία	103
Κεφάλαιο 4	106

4.1. Περίληψη.....	108
4.2. Εισαγωγή.....	109
4.3. Υλικά και μέθοδοι.....	109
4.3.1. Υπό μελέτη πληθυσμός.....	109
4.3.2. Δειγματοληψία.....	110
4.3.3. Διαγνωστικές δοκιμές.....	111
4.3.4 Στατιστική ανάλυση.....	112
4.4. Αποτελέσματα.....	114
4.5. Συζήτηση.....	115
4.6. Βιβλιογραφία.....	120
Κεφάλαιο 5	123
5.1. Γενική Συζήτηση.....	124
5.2. Προοπτικές μελλοντικής έρευνας.....	128
Παράρτημα	130
1. Κώδικας του λογισμικού WinBugs για την εκτίμηση των Ευ, των Ει και των πραγματικών ποσοστών προσβολής, κατόπιν της εφαρμογής δύο υπό συνθήκη ανεξάρτητων διαγνωστικών δοκιμών σε N πληθυσμούς (N=3).	131
2. Κώδικας του λογισμικού WinBugs για την εκτίμηση των Ευ, των Ει και των πραγματικών ποσοστών προσβολής, μετά από την εφαρμογή δύο υπό συνθήκη εξαρτημένων διαγνωστικών δοκιμών σε N πληθυσμούς (N=3).	132
3. Κώδικας του λογισμικού WinBugs για την εκτίμηση των Ευ, των Ει και των πραγματικών ποσοστών προσβολής, μετά από την εφαρμογή δύο διαγνωστικών δοκιμών με εξάρτηση των Ει και ανεξαρτησία των Ευ, σε N πληθυσμούς (N=3)	133
4. Παράδειγμα της χρήσης της αυτοτελούς λογισμικής μονάδας CODA στο περιβάλλον R για την εφαρμογή της μεθόδου των Raftery και Lewis.	135
5. Η κατανομή β.	136
Άρθρα στην αγγλική γλώσσα	138
1. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in Greek dairy sheep and goats.....	139
2. Application of a semi-dependent latent model in the Bayesian estimation of the sensitivity and specificity of two faecal-culture methods for diagnosis of paratuberculosis in sub-clinically infected Greek dairy sheep and goats.....	161
3. The association of sub-clinical paratuberculosis with the fertility of Greek dairy ewes and goats varies with parity.....	178

Κεφάλαιο 1

1. Εισαγωγή

Στα μέσα του δέκατου ένατου αιώνα, τα συχνά περιστατικά χολέρας είχαν αναστατώσει την πόλη του Λονδίνου. Αν και η αιτιολογία της νόσου ήταν εκείνη την περίοδο άγνωστη, ο John Snow υπέθεσε πως ο κύριος τρόπος μετάδοσης ήταν η επιμόλυνση των παροχών του νερού με κόπρανα (Snow, 1855). Βάσισε την υπόθεσή του στο γεγονός ότι το κύριο σύμπτωμα της νόσου ήταν η διάρροια, και ότι παρόλο που τα περισσότερα μέλη μιας οικογένειας προσβάλλονταν, δεν προσβάλλονταν οι γιατροί ή οι νοσοκόμες που τους περιέθαλπαν. Λίγο πριν την επιδημία του 1854, μια από τις επιχειρήσεις που παρείχαν νερό στα νοικοκυριά μετακίνησε το σημείο ύδρευσης από το κατώτερο στο ανώτερο τμήμα του ποταμού Τάμεση, όπου το νερό ήταν σαφώς λιγότερο μολυσμένο. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση των κρουσμάτων χολέρας στα νοικοκυριά που υδρεύονταν από τη συγκεκριμένη εταιρεία. Τα νοικοκυριά αυτά ήταν τυχαία καταναμημένα σε όλη την πόλη και δεν ανήκαν σε συγκεκριμένη κοινωνική τάξη. Ο John Snow κατέγραψε προσεκτικά τον αριθμό περιστατικών χολέρας, τον αριθμό των θανάτων και τον αριθμό των ανθρώπων σε κίνδυνο να νοσήσουν σε σχέση με τον προμηθευτή νερού. Όπως αναμενόταν, η θνητότητα ήταν υψηλότερη σε οικογένειες που προμηθεύονταν νερό από εταιρείες που είχαν την έδρα τους στο κατώτερο και προφανώς πιο μολυσμένο τμήμα του ποταμού.

Ο John Snow βάσισε την έρευνα και τα συμπεράσματά του σε ακριβείς και αξιόπιστες κλινικές παρατηρήσεις. Όπως τότε έτσι και σήμερα η αξιοπιστία των διαγνωστικών δοκιμών καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα των παρατηρήσεων και επομένως των συμπερασμάτων που προκύπτουν από τις επιδημιολογικές μελέτες. Προαπαιτήση της ορθής επιδημιολογικής διερεύνησης αλλά και της αποτελεσματικότητας των προγραμμάτων επιτήρησης και ελέγχου των νόσων είναι η ύπαρξη ορθά αξιολογημένων ως προς την αξιοπιστία τους διαγνωστικών δοκιμών.

Στην παραφυματίωση των αιγών και προβάτων, όπως θα δούμε στη συνέχεια, τα κλινικά προσβεβλημένα ζώα ανιχνεύονται από τις υπάρχουσες διαγνωστικές δοκιμές με αρκετή επιτυχία, όχι όμως και τα υποκλινικά προσβεβλημένα. Σε έναν πληθυσμό, όμως, ο αριθμός των κλινικά προσβεβλημένων ζώων είναι συνήθως σημαντικά μικρότερος από τον αριθμό των υποκλινικά προσβεβλημένων, με αποτέλεσμα το φαινομενικό ποσοστό προσβολής να υποεκτιμά το πραγματικό ποσοστό προσβολής. Για το λόγο αυτό, πολύ εύστοχα, οι Whitlock and Buergelt (1996), χαρακτήρισαν τα κλινικά προσβεβλημένα ζώα, ως την «κορυφή του παγόβουνου». Η μεγάλη δυσκολία για την ορθή εκτίμηση της αξιοπιστίας των διαγνωστικών δοκιμών στα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα είναι ακριβώς η αδυναμία μας να εντοπίσουμε τα ζώα αυτά. Λύση στο πρόβλημα αυτό δίνει η μεθοδολογία, οι βασικές αρχές τις οποίας παρουσιάζονται στο δεύτερο μέρος της εισαγωγής, που εφαρμόστηκε εκτενώς στην παρούσα διατριβή.

1.1. Εισαγωγή στην παραφυματίωση

1.1.1. Αιτιολογία της νόσου

Η παραφυματίωση ή νόσος του Johnne (paratuberculosis, Johnne's disease) είναι χρόνια μεταδοτική εντερίτιδα που χαρακτηρίζεται από προοδευτικά επιδεινούμενη διάρροια, απώλεια βάρους, και τελικά θάνατο. Αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους H. A. Johnne και L. Frothingham το 1895 (Johnne and Frothingham, 1895), παρόλο που ως κλινικό σύνδρομο ήταν γνωστή από τις αρχές του 1800. Ήδη από τις αρχές του 1900 η νόσος εμφανιζόταν σε αρκετές ευρωπαϊκές χώρες και στις Η.Π.Α (Chiodini et al., 1984). Σήμερα, η εξάπλωση της νόσου είναι παγκόσμια με κύριους ξενιστές τα διάφορα είδη μηρυκαστικών (Harris and Barletta, 2001).

Στην Ελλάδα, η παρουσία της νόσου επιβεβαιώθηκε με την ανίχνευση των χαρακτηριστικών παθολογοανατομικών αλλοιώσεων και την καλλιέργεια του υπεύθυνου μικροοργανισμού για πρώτη φορά το 1968 (Σμοκοβίτης, 1970; Leontides et al., 1975). Έκτοτε, είναι ένα από τα σπουδαιότερα νοσήματα των αιγών και των προβάτων στη χώρα μας που προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες διότι μειώνει την παραγωγικότητα των προσβεβλημένων ζώων (Δημαρέλλη, 1994).

Το 1910 ο F. W. Twort πέτυχε την καλλιέργεια του *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) στο εργαστήριο και την αναπαραγωγή της νόσου μετά από πειραματική μόλυνση βοοειδών (Twort and Ingram, 1912). Πρόκειται για έναν gram-θετικό, οξείαντοχο μικροοργανισμό για τον πολλαπλασιασμό του οποίου είναι απαραίτητος ο σίδηρος του ζώου ξενιστή (Kennedy and Benedictus, 2001). Ο μικροοργανισμός δεν παράγει φορείς του σιδήρου (μυκοβακτίνες) και επομένως χρειάζεται για την ανάπτυξή του *in vitro* την παροχή μυκοβακτινών. *In vivo* παράγει το δικό του ένζυμο, ρεδουκτάση του σιδήρου, που κινητοποιεί το σίδηρο του ξενιστή (Homuth et al., 1998). Διακρίνονται, με βάση (1) το διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξής τους στις καλλιέργειες και (2) το μοριακό πρότυπο χαρακτηρισμού, δύο τύποι στελεχών του MAP (Rienmann et al., 1979; Ris, et al., 1988). Η μία ομάδα περιλαμβάνει στελέχη που έχουν απομονωθεί αποκλειστικά από πρόβατα και αίγες και έχουν χαρακτηριστεί ως πρόβεια ή τύπου I στελέχη, ενώ η άλλη ομάδα περιλαμβάνει στελέχη τα οποία απομονώνονται κυρίως από βοοειδή και χαρακτηρίζονται ως βόεια ή τύπου II στελέχη (Collins et al., 1990; 1993; Whipple et al., 1990; De Lisle et al., 1992; Thoresen and Olsaker, 1994). Τα στελέχη τύπου II έχουν απομονωθεί και από αίγες και πρόβατα καθώς επίσης και από άλλα είδη μηρυκαστικών και μη μηρυκαστικών που μοιράζονται λειμώνες με βοοειδή (Rienmann et al., 1979; Ris et al., 1988; Greig et al., 1999; Beard et al., 2001; Stevenson et al., 2002). Τα στελέχη τύπου I χαρακτηρίζονται από βραδύτερη ανάπτυξη, οι αποικίες τους είναι μικρές, λείες, ομοιόμορφες και συνήθως έχουν πορτοκαλί-κίτρινο χρώμα. Τα στελέχη τύπου II σχηματίζουν αποικίες βραδείας ανάπτυξης με τραχεία εμφάνιση, ανομοιόμορφες και άχρωμες (Stevenson et al., 2002). Τελευταία περιγράφηκαν σε αίγες στελέχη ενδιάμεσα των τύπων I και II, τα στελέχη τύπου III, με ανάπτυξη όπως αυτή των στελεχών τύπου I. Τα στελέχη αυτά βρέθηκαν σε κοπάδια αιγών που γειτνιάζαν με κοπάδια προβάτων που ήταν προσβεβλημένα από στελέχη τύπου I (de Juan et al., 2005).

Από τα κατοικίδια ζώα το MAP έχει απομονωθεί εκτός από τα μηρυκαστικά και από τους χοίρους (Thoen et al., 1975). Επιπλέον, έχει απομονωθεί από πολλά είδη μηρυκαστικών της άγριας πανίδας, όπως είδη ελαφιού [*Odocoileus virginianus* από τους Chiodini and Vankruiningen (1983), *Cervus elaphus* και *Capreolus capreolus* από τους Sharp et al.(1995)], άγρια πρόβατα [*Ovis canadensis* από τους Williams et al.(1979)], τάρανδους [*Carvus nannodes* από τους Jessup et al. (1981)], βίσονες [*Bison bison* από τους Buergelt and Ginn (1999)]. Πρόσφατα, απομονώθηκε και από μονογαστρικά είδη της άγριας πανίδας, όπως από αγριοκούνελα [*Oryctolagus cuniculus* (Greig et al., 1997; 1999)], είδη πιθήκων (McClure et al., 1987), αγριόχοιρους (Machackova et al., 2003; Alvarez et al., 2005), αλεπούδες (*Vulpes vulpes*), ερμίνες (*Mustela erminea*), ασβούς (*Meles meles*), νυφίτσες (*Mustela nivalis*) καθώς και από αρπακτικά πτηνά (Beard et al.,1999; 2001), μύες (*Mus musculus*) και επίμυες (*Rattus norvegicus* και *Rattus rattus*) και τρωκτικά του δάσους (*Apodemus sylvaticus*) (Beard et al., 2001; Florou et al., 2005).

Σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στην εξάπλωση και δυσχεραίνει τις προσπάθειες ελέγχου της παραφυματίωσης είναι η ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στο εξωτερικό περιβάλλον. Το MAP επιβιώνει στο εξωτερικό περιβάλλον σε ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών για μεγάλο χρονικό διάστημα (Kennedy and Benedictus, 2001). Χαρακτηριστικά αναφέρεται η επιβίωσή του στο νερό για 9 μήνες (Lovell et al., 1954) και σε κόπρανα βοοειδών για 8 μήνες (Lovell, 1944) ή κατ' άλλους για 11 μήνες (Larsen et al., 1956). Σε μίγμα κοπράνων και ούρων βοοειδών επιβίωσε για λιγότερο από 1 μήνα (Larsen et al., 1956). Το όξινο έδαφος ευνοεί την επιβίωσή του και η συχνότητα της νόσου στα βοοειδή φαίνεται ότι είναι υψηλότερη σε όξινα εδάφη (Korecky, 1977; Johnson-Ifeorulundu and Kaneene, 1999), ενώ ίσως αυτοπεριορίζεται σε αλκαλικά εδάφη (Korecky, 1977). Ανάλογες παρατηρήσεις υπάρχουν και για τα πρόβατα (Michel and Bastanello, 2000; Reviriego et al., 2000).

1.1.2. Ανοσολογία και Παθογένεια

Η πιο σημαντική οδός μετάδοσης του μικροοργανισμού είναι μέσω του πεπτικού με την πρόσληψη μολυσμένης από κόπρανα τροφής (fecal-oral route) ή μολυσμένου γάλακτος ή πρωτογάλακτος (Chiodini et al., 1984; Thomas, 1983; Sweeny, 1996; Clarke 1997). Έχει αναφερθεί και η μετάδοση μέσω μολυσμένου σπέρματος (Streeter et al., 1995) καθώς και η in utero μετάδοση του μικροοργανισμού από έγκυα ζώα που βρίσκονταν στο τελικό κλινικό στάδιο (Seitz et al., 1989; Rohde and Shulaw, 1990). Πιστεύεται ότι τα ζώα ηλικίας μικρότερης των 30 ημερών είναι πιο ευαίσθητα στη μόλυνση, αν και η κλινική νόσος είναι εμφανής μετά από μακρά περίοδο επώασης (Hagan 1938; Rankin 1962; Chiodini et al., 1984).

Μετά τη μόλυνση, ο μηχανισμός εισόδου του μικροοργανισμού στα μακροφάγα δεν έχει πλήρως ξεκαθαριστεί. Πιστεύεται πως, εντός ωρών από την πρόσληψή του, ο μικροοργανισμός παραλαμβάνεται από τα Μ κύτταρα του επιθηλίου που καλύπτει τις πλάκες του Peyer (Monotami et al., 1988; Stabel, 2000; Whittington and Sergeant, 2001; Harris and Barletta, 2001; Siguroardottir et al., 2004). Ο τρόπος με τον οποίο το MAP προσκολλάται και εισέρχεται στα κύτταρα Μ δεν είναι γνωστός, αν και πρόσφατες μελέτες in vitro δείχνουν πως διαλυτά μόρια φιμπρονεκτίνης προσκολλώνται σε

πρωτεΐνες φορείς, τόσο στο μυκοβακτηρίδιο όσο και στο επιθήλιο του εντέρου, για να μεσολαβήσουν στην πρόσληψη (Secott et al., 2001). Στη συνέχεια οι μικροοργανισμοί ανευρίσκονται στα επιθηλιοειδή μακροφάγα και είναι ορατοί με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, όμως οι πρώτες αλλοιώσεις δεν είναι ορατές με το οπτικό μικροσκόπιο, για αρκετές βδομάδες έως και μήνες μετά τη λήψη ακόμα και υψηλών δόσεων μυκοβακτηριδίου από το στόμα (Whittington and Sergeant, 2001).

Η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή στη λοίμωξη από MAP θα μπορούσε να χαρακτηριστεί - όπως και για άλλα παθογόνα μυκοβακτηρίδια - ως παράδοξη. Δύο σημαντικά χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού είναι κρίσιμα για την εξέλιξη της λοίμωξης και εμποδίζουν την αποτελεσματική άμυνα του ξενιστή. Το πρώτο χαρακτηριστικό είναι η ικανότητα του μικροοργανισμού να «κρύβεται» (να «κρύβεται», να επιβιώνει και να αναπαράγεται μέσα στα μακροφάγα) από την ανοσολογική απάντηση εντός των μακροφάγων. Η ικανότητα αυτή είναι ουσιώδους σημασίας για την παθογένεια της παραφυματίωσης (Harris and Barletta, 2001; Sigurethardottir et al., 2004). Πιο συγκεκριμένα, τα παθογόνα μυκοβακτηρίδια έχουν την ειδική ικανότητα αποφυγής των CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων. Έτσι επιβιώνουν εντός των μακροφάγων προστατευμένα από την κυτταρική και χυμική ανοσολογική απάντηση του οργανισμού (Zubrick and Czuprynsky 1987; Monotami et al., 1988). Το δεύτερο χαρακτηριστικό είναι η ικανότητα του μικροοργανισμού να «παραπλανεί» τους ανοσολογικούς μηχανισμούς του οργανισμού του ξενιστή, κατά την εξέλιξη της λοίμωξης, με αποτέλεσμα τη μετάβαση από την προστατευτική κυτταρική στη μη προστατευτική χυμική ανοσολογική απάντηση (Valentin-Weigand et al., 1999; Coussens, 2001; 2004), για τα μυκοβακτηρίδια που βρίσκονται ενδοκυτταρικά.

Η ειδική ανοσολογική απάντηση του ζώου ξεκινά, όταν τα κρυμμένα στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων μυκοβακτηρίδια εκτεθούν στα T-λεμφοκύτταρα. Τα μακροφάγα ενεργοποιούνται, με μια αλληλουχία γεγονότων που δεν είναι πλήρως κατανοητή, και τελικά αναπτύσσεται ένας από τους βασικούς τύπους ανοσολογικής απάντησης: είτε η κυτταρικού τύπου μεσολαβούμενη από τα βοηθητικά λεμφοκύτταρα τύπου 1 (T_H1), είτε η χυμικού τύπου μεσολαβούμενη από τα βοηθητικά λεμφοκύτταρα τύπου 2 (T_H2). Η κυτταρικού τύπου ανοσολογική απάντηση είναι προστατευτική και περιορίζει την εξάπλωση της λοίμωξης στο έντερο του ζώου, ενώ η χυμικού τύπου ανοσολογική απάντηση είναι μη προστατευτική και συνήθως συνδέεται χρονικά με την εξάπλωση της λοίμωξης (Chiodini, 1996; Valentin-Weigand et al., 1999; Stabel, 2000; Harris and Barletta, 2001; Huda et al., 2003; Coussens, 2004). Η κυτταρικού τύπου ανοσολογική απάντηση χαρακτηρίζεται από έκκριση, μεταξύ άλλων κυτταροκινών, ιντερλευκίνης - 2 (IL-2) και γ-ιντεροφερόνης (IFN -γ). Παράλληλα, με την παραγωγή των T_H1, καταστέλλεται η διαφοροποίηση των CD4 + λεμφοκυττάρων σε T_H2 κύτταρα. Αυτή η καταστολή γίνεται με τη μεσολάβηση συγκεκριμένων κυτταροκινών, όπως της IFN -γ και της IL-2 (Coussens, 2004). Άρση της καταστολής θα οδηγήσει σε χυμικού τύπου ανοσολογική απάντηση μέσω των T_H2. Η χυμική ανοσολογική απάντηση χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών (παραγωγή αντισωμάτων). Για τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων σε τύπου T_H2 κύτταρα μεσολαβούν οι κυτταροκίνες IL-4, IL-5, IL-6 και IL- 10. Αυτές οι κυτταροκίνες με τη σειρά τους καταστέλλουν την παραγωγή των T_H1 λεμφοκυττάρων (Coussens, 2001). Κατά συνέπεια, η ανοσολογική απάντηση θα κυριαρχείται είτε από τύπου T_H1 είτε από τύπου T_H2 λεμφοκύτταρα. Η εξαρτώμενη από τα T_H1 ενεργοποίηση των

μακροφάγων είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική καταστροφή των μυκοβακτηριδίων που βρίσκονται ενδοκυτταρικά και επομένως δεν εκτίθενται στα αντισώματα που παράγονται κατά τη διάρκεια της μεσολαβούμενης από τα T_H2 χυμικής απάντησης.

Από τα προηγούμενα φαίνεται πως στο μολυσμένο ζώο οι δύο τύποι ανοσολογικής απάντησης βρίσκονται μάλλον σε μια δυναμική ισορροπία. Η ισορροπία θα μετατοπιστεί τελικά προς έναν τύπο ανοσολογικής απάντησης. Αρχικά, κυριαρχεί η κυτταρικού τύπου ανοσολογική απάντηση και το ανοσοποιητικό σύστημα είναι σε θέση να ελέγξει τη λοίμωξη. Στη φάση αυτή, είναι άγνωστο αν είναι εφικτή η ολοκληρωτική καταστροφή των μυκοβακτηριδίων, βέβαιο είναι όμως, πως, όσο κυριαρχεί η κυτταρική ανοσία ο αριθμός των μυκοβακτηριδίων στο μολυσμένο ζώο διατηρείται σε χαμηλό επίπεδο. Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής, η χυμική ανοσολογική απάντηση και επομένως η παραγωγή αντισωμάτων αναστέλλεται, η μόλυνση όμως βρίσκεται σε εξέλιξη (Chiodini, 1996). Σε κάποια χρονική στιγμή συμβαίνει η μετάβαση από την κυτταρική (T_H1) στη χυμική (T_H2) ανοσολογική απάντηση. Οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για την πτώση της κυτταρικής ανοσίας και τη μετάβαση στη χυμική είναι άγνωστοι (Coussens, 2004). Πιθανώς να αφορούν τη διαρκή έκθεση των ανοσοκυττάρων στο αντιγόνο που απελευθερώνεται από τα μολυσμένα μακροφάγα, την ανάπτυξη ή όχι πληθυσμών ρυθμιστικών κυττάρων ειδικών του αντιγόνου ή και γενετικούς παράγοντες του ξενιστή (Coussens, 2004). Για παράδειγμα, στους ανθρώπους κάποιες διαφορές στον έλεγχο της ανοσολογικής απάντησης σε μολύνσεις από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης έχουν αποδοθεί στη γενετική ποικιλομορφία των υποδοχέων για την IFN- γ (Altare et al., 1998). Σίγουρα χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση των παραγόντων που καθορίζουν την πορεία της ανοσολογικής απάντησης, η οποία μάλλον καθορίζεται από το συνδυασμό των προαναφερθέντων παραγόντων που αφορούν τον ξενιστή με παράγοντες που αφορούν τη λοιμικότητα των στελεχών του MAP (National Research Council, 2003).

Η παραπάνω περιγραφή της πορείας της ανοσολογικής απάντησης στηρίχθηκε σε πειραματικά δεδομένα προερχόμενα κυρίως από βοοειδή (Lepper et al., 1989; Huda et al., 2004; Coussens, 2004) και δευτερευόντως από πρόβατα (Reddacliff et al., 2003). Η πορεία της ανοσολογικής απάντησης μετά από φυσική λοίμωξη και σε σχέση με το στάδιο της λοίμωξης δεν έχει μελετηθεί. Οι ενδείξεις από τις πειραματικές μελέτες μπορούν να αποτελέσουν την απαρχή των ανάλογων μελετών σε φυσικά προσβεβλημένα ζώα.

Η διάρκεια της λοίμωξης και το είδος της ανοσολογικής απάντησης είναι σαφώς συνδεδεμένα με το είδος, την ένταση και το βαθμό διασποράς των παθολογοανατομικών αλλοιώσεων που περιγράφονται στη συνέχεια. Προφανώς, η στροφή από την κυτταρική στη χυμική ανοσολογική απάντηση και επομένως τη μη αποτελεσματική άμυνα του οργανισμού κατά των μυκοβακτηριδίων, που βρίσκονται ενδοκυτταρικά, συνεπάγεται και τη σταδιακή επιδείνωση και εξάπλωση των παθολογοανατομικών αλλοιώσεων.

1.1.3. Παθολογοανατομικά ευρήματα

Κατά τα αρχικά στάδια, όταν κυριαρχεί η κυτταρική ανοσολογική απάντηση, το έντερο του προσβεβλημένου ζώου εμφανίζεται μακροσκοπικά φυσιολογικό. Ακόμα και

ιστολογικά οι πρώτες αλλοιώσεις δεν είναι ορατές με το οπτικό μικροσκόπιο για αρκετές βδομάδες έως και μήνες (Whittington and Sergeant, 2001). Αργότερα, η λοίμωξη μπορεί να εντοπιστεί μόνο ιστολογικά ως παρουσία μικροσκοπικών κοκκιωμάτων από λεμφοκύτταρα και λίγα μακροφάγα, γνωστά ως η φυματιώδης μορφή των αλλοιώσεων. Κατά τα τελικά στάδια, η μετάβαση στη χυμική ανοσία, συχνά συνοδεύεται από μακροσκοπικές αλλοιώσεις που ιστολογικά χαρακτηρίζονται από διάχυτες αλλοιώσεις που βρίθουν μυκοβακτηριδίων και είναι γνωστές ως η λεπρωματώδης μορφή των αλλοιώσεων (Perez et al., 1996; 1997; Clarke et al., 1996; Stabel, 2000; Corpa et al., 2000).

Μακροσκοπικά, στις αίγες και τα πρόβατα, οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις εντοπίζονται στο έντερο και τα μεσεντέρια λεμφογάγγλια. Είναι όμως ιδιαίτερα ανεπτυγμένες στο τέλος της νήστιδας και τον ειλέο καθώς και στο τυφλό και στα πρόσθια τμήματα του κόλου. Παρατηρείται πάχυνση του βλεννογόνου του εντέρου που μπορεί να αφορά και τον υποβλεννογόνο. Η πάχυνση μπορεί να κυμαίνεται από απλή μικροκοκκώδη όψη («όψη βελούδου») του βλεννογόνου μέχρι και εγκάρσια πτύχωση. Τα μεσεντέρια λεμφογάγγλια είναι σταθερά διογκωμένα ωχρά και οιδηματικά. Μερικές φορές μπορεί να παρατηρηθούν εστίες νέκρωσης-τυροειδοποίησης και ασβεστοποίησης (Λεοντίδης, 1978). Επίσης, μπορεί να παρατηρείται πάχυνση των λεμφαγγείων με ή χωρίς οζίδια κατά τη διαδρομή τους («όψη κομβολογίου») ή πάχυνσή τους με ελικοειδή πορεία ώστε να καθίστανται ορατά στην εξωτερική επιφάνεια του εντέρου και το μεσεντέριο. Ιστολογικά, η ένταση και το εύρος των παρατηρούμενων αλλοιώσεων είναι ανάλογες του σταδίου εξέλιξης της λοίμωξης. Στο τελικό στάδιο η χαρακτηριστική αλλοίωση που σχηματίζεται μπορεί να έχει τη μορφή είτε μιας χρόνιας κοκκιωματώδους εντερίτιδας στην οποία τα επιθηλιοειδή μακροφάγα κύτταρα που διηθούν το βλεννογόνο και τον υποβλεννογόνο βρίθουν οξεάντοχων μικροοργανισμών (πολυβακιλλική-λεπρωματώδης αλλοίωση) είτε μιας λεμφοκυτταρικής διήθησης στην οποία σπανίζουν οι οξεάντοχοι μικροοργανισμοί και η οποία παρατηρείται στο 30% περίπου των προσβεβλημένων προβάτων (ψευδοβακιλλική ή φυματιώδης αλλοίωση).

Οι Perez and Little (1996) και Clarke (1997) στα πρόβατα και οι Corpa et al. (2000) και Khodakaram and Rashidi (2000) στις αίγες πρότειναν ένα σύστημα ταξινόμησης των ιστολογικών αλλοιώσεων σε 3 τύπους (που έχουν και υποτύπους). Πιο συγκεκριμένα:

Στα πρόβατα η ταξινόμηση συνοπτικά περιλαμβάνει:

1) Τις αλλοιώσεις τύπου 1 όπου παρατηρούνται μικρά κοκκίωματα που σχηματίζονται από μακροφάγα και εντοπίζονται αποκλειστικά στις πλάκες του Peyer της ειλεοτυφλικής μοίρας. Τα μυκοβακτηρίδια είναι διάσπαρτα και ελάχιστα ή απουσιάζουν εντελώς. Οι αλλοιώσεις αυτές παρατηρούνται κυρίως σε πρόβατα που μολύνθηκαν ως αμνοί και λειτούργησε η προστατευτική κυτταρική ανοσία.

2) Τις αλλοιώσεις τύπου 2 όπου εντοπίζονται κοκκίωματα και στο βλεννογόνο που σχετίζεται με τις πλάκες του Peyer. Μυκοβακτηρίδια ανευρίσκονται στην πλειοψηφία των ιστολογικών τομών.

3) Τις αλλοιώσεις τύπου 3 όπου εντοπίζονται κοκκίωματα και σε περιοχές του βλεννογόνου που δε σχετίζονται με τις πλάκες του Peyer. Οι αλλοιώσεις του τύπου αυτού διαιρούνται σε τρεις υπότυπους: α) τον υπότυπο 3^α όπου παρατηρούνται πολυεστιακά κοκκίωματα σε ποικίλες περιοχές του βλεννογόνου που δε συνδέονται σαφώς με το λεμφικό ιστό και δεν επηρεάζουν τη μορφολογία της προσβεβλημένης

περιοχής. Τα μυκοβακτηρίδια ανευρίσκονται στην πλειοψηφία των ιστολογικών τομών, β) τον υπότυπο 3^β όπου παρατηρείται μεγάλος αριθμός μακροφάγων διεσπαρμένος στο βλεννογόνο. Τα μυκοβακτηρίδια ανευρίσκονται πάντοτε στις ιστολογικές τομές, και γ) τον υπότυπο 3^γ όπου κυριαρχούν τα λεμφοκύτταρα με λίγα μακροφάγα διεσπαρμένα ανάμεσά τους. Τα μυκοβακτηρίδια είναι ελάχιστα ή απουσιάζουν εντελώς. Ο υποτύπος 3^β προσομοιάζει στην λεπρωματώδη μορφή αλλοιώσεων ενώ ο τύπος 3^γ στη φυματιώδη μορφή. Οι αλλοιώσεις τύπου 2 και 3 συνοδεύουν την μετάβαση στην ενηλικίωση και την αποτυχία των προστατευτικών αμυντικών μηχανισμών.

Στις αίγες η ταξινόμηση έγινε με βάση την ένταση των αλλοιώσεων στην τελική μοίρα του ειλεού και τα μεσεντέρια λεμφογαγγλεια και συνοπτικά περιλαμβάνει:

1) Τις αλλοιώσεις ήπιου βαθμού που χαρακτηρίζονται από εστιακές συγκεντρώσεις επιθηλιοειδών μακροφάγων, τα οποία βρίθουν μυκοβακτηριδίων, στο άνω τμήμα του βλεννογόνου και των λαχνών. Οι ίδιες συγκεντρώσεις ανευρίσκονται στην παραφλοιώδη ζώνη των μεσεντέριων λεμφογαγγλίων.

2) Τις αλλοιώσεις μέτριου βαθμού που χαρακτηρίζονται από διήθηση αρχικά της επιπολής και των εν τω βάθω στιβάδων του βλεννογόνου και τελικά όλου του βλεννογόνου από επιθηλιοειδή μακροφάγα και μερικά λεμφοκύτταρα, εωσινόφιλα και πλασμοκύτταρα. Οι λάχνες είναι ελαφρώς ατροφικές. Πολλά επιθηλιοειδή μακροφάγα βρίθουν μυκοβακτηριδίων. Επίσης υπάρχει σημαντική διήθηση των άνω στιβάδων του υποβλεννογόνιου με λεμφοκύτταρα περιφερικά των λεμφογαγγλίων. Επιπλέον, μικροκοκκιώματα επιθηλιοειδών μακροφάγων ανευρίσκονται στην παραφλοιώδη ζώνη και στους επιχείλιους λεμφόκολπους των μεσεντέριων λεμφογαγγλίων. Τα τελευταία περιέχουν μικρό αριθμό μικροοργανισμών.

3) Τις αλλοιώσεις έντονου βαθμού που χαρακτηρίζονται από διήθηση του βλεννογόνου, του υποβλεννογόνιου και ακόμα και του μυϊκού και του ορογόνου χιτώνα από πολλά επιθηλιοειδή μακροφάγα, λίγα γιγαντοκύτταρα και πολλά λεμφοκύτταρα, πλασμοκύτταρα, εωσινόφιλα και μερικές φορές λίγα ουδετερόφιλα. Ολόκληρος ο βλεννογόνος επικυριαρχείται από πληθώρα επιθηλιοειδών μακροφάγων που συμπιέζουν τις κρύπτες του Lieberkuhn. Οι λάχνες είναι ατροφικές. Τα επιθηλιοειδή μακροφάγα βρίθουν μικροοργανισμών. Επιπλέον, παρατηρείται λεμφογαγγειίτιδα με συγκέντρωση λεμφοκυττάρων, πλασμοκυττάρων και λίγων μακροφάγων περιμετρικά των λεμφογαγγλίων και ιδίως του ορογόνου. Στους μεσεντέριους λεμφαδένες, επιθηλιοειδή μακροφάγα και γιγαντοκύτταρα τύπου Langhans έχουν υποκαταστήσει την υποκαψική περιοχή και την περιοχή του φλοιού. Επίσης παρατηρούνται εστιακές έως και διάχυτες περιοχές νέκρωσης με ή χωρίς απασβέστωση. Λίγα μόνο επιθηλιοειδή κύτταρα και γιγαντοκύτταρα περιέχουν μικρό αριθμό μυκοβακτηριδίων.

Σε φυσικά μολυσμένες αίγες σπανίζουν οι εστιακές αλλοιώσεις ενώ η συχνότητα εμφάνισης διάχυτων αλλοιώσεων είναι υψηλή (Cogra et al., 2000) σε σχέση με αντίστοιχες μελέτες σε φυσικά μολυσμένα πρόβατα (Perez et al., 1996). Η παρατήρηση αυτή ίσως να σχετίζεται με τη διαφορετική ικανότητα των δύο ειδών να ελέγξουν αποτελεσματικά τη λοίμωξη (Cogra et al., 2000) και συμφωνεί με πρώιμες παρατηρήσεις στην Ελλάδα που κατέδειξαν την αυξημένη ευπάθεια των αιγών σε σχέση με τα πρόβατα (Xenos et al., 1984).

1.1.4. Κλινικές εκδηλώσεις

Με κριτήριο την προοδευτική ένταση των παρατηρούμενων συμπτωμάτων οι Whitlock and Buergelt (1996) πρότειναν την ταξινόμηση των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου στα βοοειδή, σε τέσσερα στάδια. Δυστυχώς, δεν έχει προταθεί ανάλογη ταξινόμηση των κλινικών εκδηλώσεων στις αίγες και τα πρόβατα. Συνοπτικά, και για την πληρότητα της παρουσίασης, αναφέρεται η προταθείσα ταξινόμηση με την επιφύλαξη της μη πλήρους αντιστοίχισης των κλινικών εκδηλώσεων, ιδιαίτερα στα στάδια πριν το τελικό, μεταξύ των βοοειδών, των προβάτων και των αιγών.

Στάδιο 1. Αφανής λοίμωξη

Τα ζώα στο στάδιο αυτό είναι προσβεβλημένα αλλά δεν παρουσιάζουν κανένα σύμπτωμα. Αμνοί και ερίφια καθώς και αρκετά νεαρά ενήλικα ζώα μιας προσβεβλημένης εκτροφής βρίσκονται στο στάδιο αυτό. Σε αυτό το στάδιο, τα προσβεβλημένα ζώα δεν ανιχνεύονται από τις κλινικές, κοπρανολογικές και ορολογικές διαγνωστικές δοκιμές. Μόνο η καλλιέργεια ή η ιστοπαθολογική εξέταση προσβεβλημένου ιστού ίσως να ανιχνεύσει ελάχιστα προσβεβλημένα ζώα.

Στάδιο 2. Υποκλινική νόσος

Τα περισσότερα ζώα στο στάδιο αυτό είναι ενήλικα. Δεν εκδηλώνουν κλινικά συμπτώματα αλλά μπορεί να έχουν ανιχνεύσιμα αντισώματα ή συνηθέστερα κυτταρικού τύπου ανοσολογική απάντηση. Συνήθως είναι αρνητικά στην καλλιέργεια κοπράνων αν και μερικά εκκρίνουν περιοδικά μικρό αριθμό μικροοργανισμών στα κόπρανα. Σε ένα μικρό ποσοστό (15%-25% των προσβεβλημένων ζώων) η νόσος μπορεί να ανιχνευθεί ή με καλλιέργεια κοπράνων και ιστών ή από την ανοσολογική απάντηση (χυμική ή καλύτερα σε αυτό το στάδιο κυτταρική) ή τέλος με ιστοπαθολογική εξέταση. Ο αριθμός των αιγών και των προβάτων του σταδίου αυτού που μεταβαίνουν στο επόμενο στάδιο, εξαρτάται από πλήθος παραγόντων. Για παράδειγμα, το ρυθμό απομάκρυνσης των ζώων από την εκτροφή λόγω μειωμένης παραγωγικότητας και αναπαραγωγικής ικανότητας που μπορεί να οφείλεται στην παραφυματίωση (Johnson-Ifearulundu et al., 2000) ή στο συνδυασμό παραφυματίωσης και άλλων παραγόντων (Chi et al., 2002).

Στάδιο 3. Κλινική νόσος

Τα αρχικά συμπτώματα του σταδίου αυτού είναι ασαφή και περιλαμβάνουν σημαντική πτώση της γαλακτοπαραγωγής, ξηρότητα του τριχώματος και σταδιακή απώλεια βάρους παρά τη διατήρηση της όρεξης. Ακολουθεί η εμφάνιση, αρχικά διαλείπουσας, διάρροιας. Κατά τη νεκροτομική εξέταση ανευρίσκονται μακροσκοπικές αλλοιώσεις στο έντερο, ιδίως στην τελική μοίρα του ειλεού και τα επιχώρια λεμφογάγγλια. Τα περισσότερα ζώα του σταδίου αυτού είναι θετικά στην καλλιέργεια κοπράνων και στις διαγνωστικές δοκιμές που ανιχνεύουν χυμική ανοσολογική απάντηση. Αν και ασύνηθες, ζώα αυτού του σταδίου μπορεί να παλινδρομήσουν στο στάδιο 2 και να παραμείνουν σε αυτό για αδιευκρίνιστο χρονικό διάστημα. Ο κανόνας, όμως, είναι η μετάβαση στο επόμενο στάδιο.

Στάδιο 4. Κλινική νόσος τελικού σταδίου

Χαρακτηρίζεται από την επιδείνωση των κλινικών συμπτωμάτων. Τα ζώα είναι ληθαργικά, αδύναμα, και απισχνασμένα. Εμφανίζεται διάμεσο οίδημα που οφείλεται

στην υποπρωτεϊναιμία, καχεξία και έντονη διάρροια. Στο στάδιο αυτό το MAP μπορεί να αναβρεθεί και να καλλιεργηθεί και από όργανα πέραν του εντέρου και κυρίως από το ήπαρ. Τα ζώα του σταδίου αυτού συνήθως καταλήγουν στο θάνατο.

1.2 Εισαγωγή στην Μεθοδολογία

1.2.1. Μέτρηση της νόσου – Διαγνωστικές δοκιμές

Η διάγνωση μιας νόσου γίνεται με τη χρήση ενός ή συνδυασμού περισσότερων διαγνωστικών κριτηρίων. Αυτά μπορεί να είναι: 1) τις κλινικές εκδηλώσεις, 2) η ανίχνευση του υπεύθυνου της νόσου παθογόνου παράγοντα 3) το αποτέλεσμα οποιονδήποτε άλλων διαγνωστικών δοκιμών ή 4) η διαπίστωση αλλοιώσεων χαρακτηριστικών της νόσου (Thrusfield, 1986). Επειδή ο ορισμός αυτός των διαγνωστικών κριτηρίων είναι από την οπτική γωνία ενός κλινικού κτηνιάτρου ο όρος διαγνωστικές δοκιμές αποδίδεται μόνο στις εργαστηριακές διαγνωστικές δοκιμές.

Εφεξής, οι έννοιες διαγνωστικό κριτήριο και διαγνωστική δοκιμή θα χρησιμοποιούνται ως ταυτόσημες. Με βάση έναν γενικό ορισμό, διαγνωστική δοκιμή θεωρείται κάθε διαδικασία ή τεχνική που έχει σκοπό να ανιχνεύσει τον παθογόνο παράγοντα, τις κλινικές εκδηλώσεις, τις αλλοιώσεις των ιστών ή τις ανοσολογικές αντιδράσεις (Gardner, 1995).

Ο παθογόνος παράγοντας, το σύμπτωμα, η αλλοίωση των ιστών ή η ανοσολογική αντίδραση είναι η μεταβλητή-στόχος για τη διαγνωστική δοκιμή. Η μεταβλητή-στόχος μπορεί να είναι ποιοτική ή ποσοτική. Η φύση αυτή της διαγνωστικής δοκιμής καθορίζει την κλίμακα μέτρησης. Για παράδειγμα, αν η διαγνωστική δοκιμή είναι η κλινική εξέταση, μια πιθανή μεταβλητή-στόχος για την παραφυματίωση είναι η διάρροια. Η διάρροια είναι ποιοτική μεταβλητή και η κλίμακα μέτρησής της μπορεί να έχει μόνο δύο τιμές, παρουσία ή όχι διάρροιας. Εναλλακτικά, η κλίμακα μέτρησης μπορεί να έχει διαβαθμίσεις: καθόλου, μέτρια και έντονη παρουσία διάρροιας. Το ίδιο ισχύει και για τη θρεπτική κατάσταση της προσβεβλημένης αίγας ή του προβάτου. Η θρεπτική κατάσταση μπορεί να είναι μια ακόμα ποιοτική μεταβλητή-στόχος της κλινικής εξέτασης όταν έχει δύο τιμές (καλή ή κακή θρεπτική κατάσταση) ή διαβαθμίσεις (άριστη, πολύ καλή, καλή, μέτρια και κακή θρεπτική κατάσταση). Αντίθετα, για τις ορολογικές δοκιμές, όπως μια ELISA, η μεταβλητή-στόχος (π.χ. συγκέντρωση αντισωμάτων κατά του MAP στο αίμα) είναι ποσοτική και έχει συνεχή κλίμακα μέτρησης (π.χ. οπτική πυκνότητα του δείγματος, ή, ορθότερα, λόγος της οπτικής πυκνότητας του δείγματος προς την οπτική πυκνότητα του θετικού μάρτυρα).

Σε κάθε περίπτωση βέβαια η φύση της διαγνωστικής δοκιμής και ο στόχος της μελέτης καθορίζουν την κλίμακα μέτρησης. Για παράδειγμα, όταν μας ενδιαφέρει αν τα ζώα απεκκρίνουν ή όχι το MAP η κλίμακα μέτρησης για την καλλιέργεια κοπράνων μπορεί να έχει δύο τιμές (ζώα θετικά ή αρνητικά στην καλλιέργεια κοπράνων). Αν μας ενδιαφέρει ο βαθμός απέκκρισης, η κλίμακα μέτρησης μπορεί να έχει διαβαθμίσεις (με βάση τον αριθμό των αποικιών στην καλλιέργεια κοπράνων τα ζώα κατατάσσονται σε αυτά που έχουν ήπια, μέτρια ή έντονη απέκκριση του μικροοργανισμού). Φυσικά, και

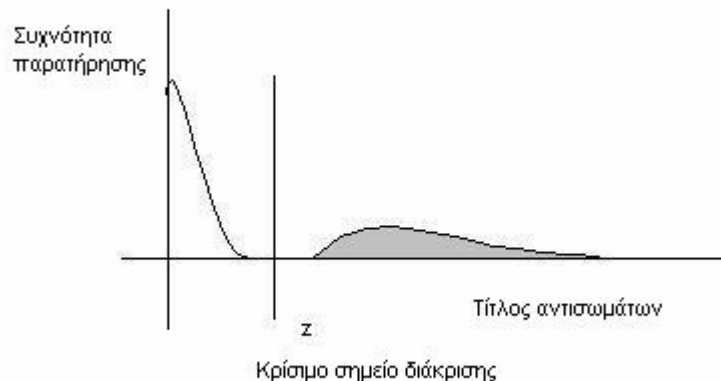
στις δύο περιπτώσεις, πρόκειται για μια ποιοτική μεταβλητή, που μετρά την συχνότητα νόσησης ανιχνεύοντας τον μικροοργανισμό στα κόπρανα.

1.2.2. Διακριτική ικανότητα και αξιοπιστία των διαγνωστικών δοκιμών

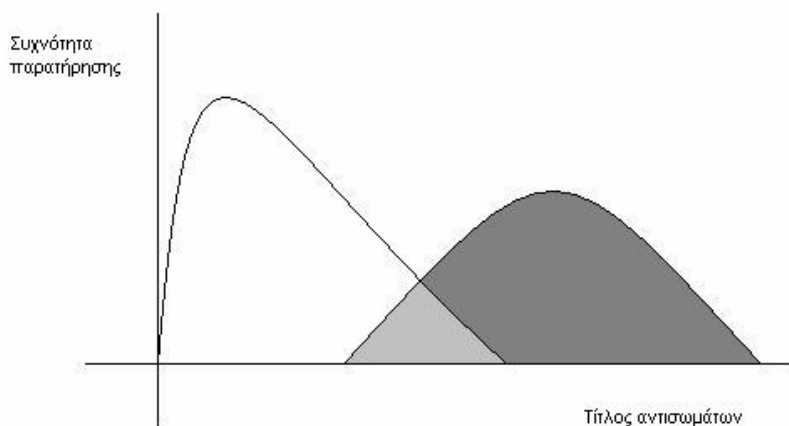
Όποια και αν είναι η κλίμακα μέτρησης της εν λόγω μεταβλητής, υπάρχει ένα εύρος αποτελεσμάτων για τη διαγνωστική δοκιμή. Προκειμένου μια διαγνωστική δοκιμή να διαχωρίζει τα προσβεβλημένα από τα υγιή ζώα, πρέπει να υπάρχει διαφορά στη συχνότητα κατανομής των τιμών μεταξύ των προσβεβλημένων και των υγιών ζώων. Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά αυτή, τόσο είναι δυναμικά καλύτερη και η διακριτική ικανότητα μίας διαγνωστικής δοκιμής.

Για παράδειγμα, αν η συχνότητα κατανομής του τίτλου αντισωμάτων για μία νόσο στα υγιή και στα μολυσμένα ζώα είναι όπως φαίνεται στην εικόνα 1.1, μια ορολογική διαγνωστική δοκιμή ανίχνευσης αντισωμάτων θα είναι αλάνθαστη, δεδομένου ότι δεν υπάρχει αλληλοκάλυψη μεταξύ των δύο κατανομών. Αυτή είναι η ιδανική περίπτωση. Συνήθως, οι δύο κατανομές αλληλοκαλύπτονται σε κάποιο βαθμό (εικόνα 1.2). Όσο μικρότερος είναι ο βαθμός αλληλοκάλυψης, τόσο καλύτερη είναι, εν δυνάμει, η διακριτική ικανότητα της διαγνωστικής δοκιμής.

Εικόνα 1.1. Η συχνότητα κατανομής του τίτλου αντισωμάτων για τα υγιή (λευκή περιοχή) και τα προσβεβλημένα ζώα (σκιασμένη περιοχή). Σε αυτή την περίπτωση, η διακριτική ικανότητα μιας διαγνωστικής δοκιμής που βασίζεται στην ανίχνευση των αντισωμάτων είναι η μέγιστη, αφού δεν υπάρχει αλληλοκάλυψη μεταξύ των δύο κατανομών.



Εικόνα 1.2. Η συχνότητα κατανομής του τίτλου αντισωμάτων για τα υγιή (λευκή περιοχή) και τα μολυσμένα ζώα (έντονα σκιασμένη περιοχή). Η διακριτική ικανότητα μιας διαγνωστικής δοκιμής που βασίζεται στην ανίχνευση των αντισωμάτων είναι μικρότερη από την περίπτωση της εικόνας 1.1, αφού οι δύο κατανομές αλληλοκαλύπτονται (ελαφρώς σκιασμένη περιοχή) σε κάποιο βαθμό.

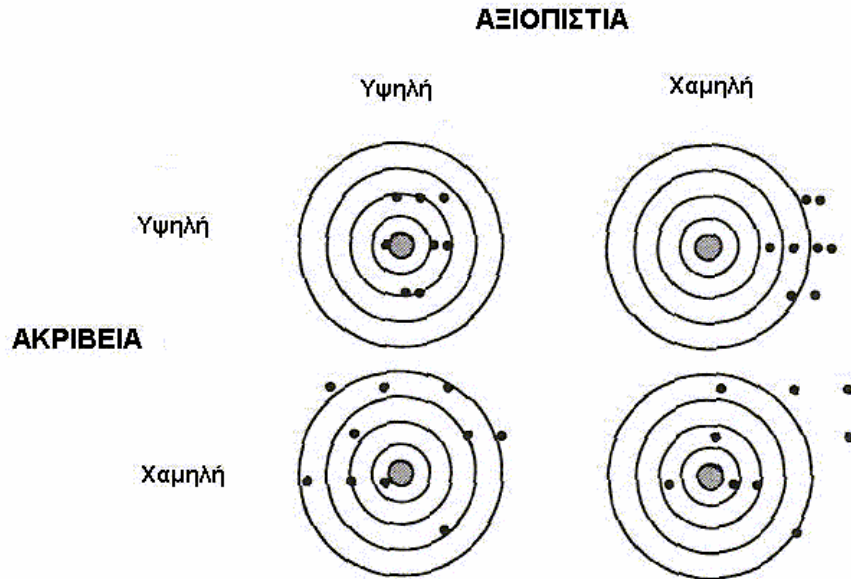


Μια διαγνωστική δοκιμή αξιολογείται συνήθως με βάση την αξιοπιστία (validity) και την ακρίβειά (accuracy) της. Στη βιβλιογραφία υπάρχει έντονη ασάφεια και σύγχυση ως προς τη χρήση των δύο εννοιών που συχνά θεωρούνται εσφαλμένα ταυτόσημες. Είναι όμως σαφώς διακριτές έννοιες που ορίζονται από τους Toma et al. (1999) όπως ακολούθως αναφέρεται. Στην εικόνα 1.3 αναπαριστώνται οι δύο έννοιες σχηματικά.

Η αξιοπιστία είναι ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ του αποτελέσματος της διαγνωστικής δοκιμής και της πραγματικής τιμής. Η αξιοπιστία εξαρτάται από το συστηματικό σφάλμα. Όταν τα αποτελέσματα των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων ενός δείγματος δεν κατανέμονται ομοιόμορφα γύρω από την πραγματική τιμή, το σφάλμα είναι συστηματικό. Όσο περισσότερο ή λιγότερο απέχει το συστηματικό σφάλμα από την πραγματική τιμή, τόσο μικρότερη ή μεγαλύτερη, αντίστοιχα, είναι η αξιοπιστία της διαγνωστικής δοκιμής (εικόνα 1.3).

Η ακρίβεια (συνώνυμη έννοια είναι η επαναληψιμότητα) είναι μέτρο της ικανότητας της διαγνωστικής δοκιμής να δίνει ίδια αποτελέσματα σε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στο ίδιο δείγμα. Πρόκειται για ένα μέτρο του τυχαίου σφάλματος. Όταν τα αποτελέσματα των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων ενός δείγματος κατανέμονται ομοιόμορφα γύρω από την πραγματική τιμή και η διασπορά τους είναι μικρή (μεγάλη), η ακρίβεια της διαγνωστικής δοκιμής είναι μεγάλη (μικρή) (εικόνα 1.3).

Εικόνα 1.3. Η αξιοπιστία και η ακρίβεια μίας διαγνωστικής δοκιμής, η οποία απεικονίζεται ως η σκοπευτική ικανότητα ενός σκοπευτή σε επαναλαμβανόμενες βολές (τροποποιημένο από Thrusfield, (1986)).



1.2.3. Αξιοπιστία διαγνωστικών δοκιμών

Η αξιοπιστία μιας διαγνωστικής δοκιμής εξαρτάται από την ικανότητά της να μετρήσει σωστά αυτό που πρέπει να μετρά, χωρίς να επηρεάζεται από συστηματικά σφάλματα. Όταν η μέτρηση μιας διαγνωστικής δοκιμής χρησιμοποιείται για την ερμηνεία του αποτελέσματος ως θετικού ή αρνητικού (π.χ. η θετική καλλιέργεια κοπράνων ερμηνεύεται ως απέκκριση MAP και ένδειξη προσβολής του ζώου από παραφυματίωση ή όχι σε αντίθετη περίπτωση), η αξιοπιστία της εκτιμάται με βάση τη διαγνωστική ευαισθησία (Eu) και ειδικότητα (Ei) (1.2.6). Στην κτηνιατρική, όπου τα αποτελέσματα των περισσότερων διαγνωστικών δοκιμών συνήθως κατηγοριοποιούνται σε θετικά ή αρνητικά με βάση μια συγκεκριμένη τιμή, η Eu και η Ei χρησιμοποιούνται ευρέως ως μέτρα της αξιοπιστίας των διαγνωστικών δοκιμών.

1.2.4. Διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα.

Η Eu μιας διαγνωστικής δοκιμής είναι η πιθανότητα που έχει να κατατάξει ως θετικά τα προσβεβλημένα ζώα. Η Ei μιας διαγνωστικής δοκιμής είναι η πιθανότητα που έχει να κατατάξει ως αρνητικά τα υγιή ζώα (Thrusfield, 1986).

Έστω ότι μια διαγνωστική δοκιμή κατατάσσει κάποια ζώα που είναι προσβεβλημένα, ορθά ως θετικά (α), και κάποια άλλα, εσφαλμένα ως αρνητικά (γ).

Αντιστοίχως, ορθά κατατάσσει κάποια υγιή ζώα ως αρνητικά (δ) και εσφαλμένα κάποια ως θετικά (β). Τα τέσσερα αυτά πιθανά αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1. Κατάταξη των θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων μιας διαγνωστικής δοκιμής σε σχέση με την πραγματική κατανομή των προσβεβλημένων και υγιών ζώων.

	Προσβεβλημένα ζώα	Υγιή ζώα	Σύνολο
Αποτέλεσμα διαγνωστικής δοκιμής			
+	a	β	$a+\beta$
-	γ	δ	$\gamma+\delta$
Σύνολο	$a+\gamma$	$\beta+\delta$	$a+\beta+\gamma+\delta$

Με βάση την κατάταξη του Πίνακα 1.1, η E_v και η E_t της διαγνωστικής δοκιμής υπολογίζονται ως:

$$E_v = \frac{a}{a + \gamma} \quad (1.1)$$

και

$$E_t = \frac{\delta}{\beta + \delta} \quad (1.2)$$

και το πραγματικό ποσοστό προσβολής (ως πραγματικό ποσοστό προσβολής ορίζεται το ποσοστό των προσβεβλημένων από συγκεκριμένη νόσο ζώων στον πληθυσμό, ή, αλλιώς, η πιθανότητα ένα τυχαία επιλεγμένο ζώο από τον πληθυσμό να έχει τη συγκεκριμένη νόσο) ($\Pi\Pi$) ως:

$$\Pi\Pi = \frac{a + \gamma}{a + \beta + \gamma + \delta} \quad (1.3)$$

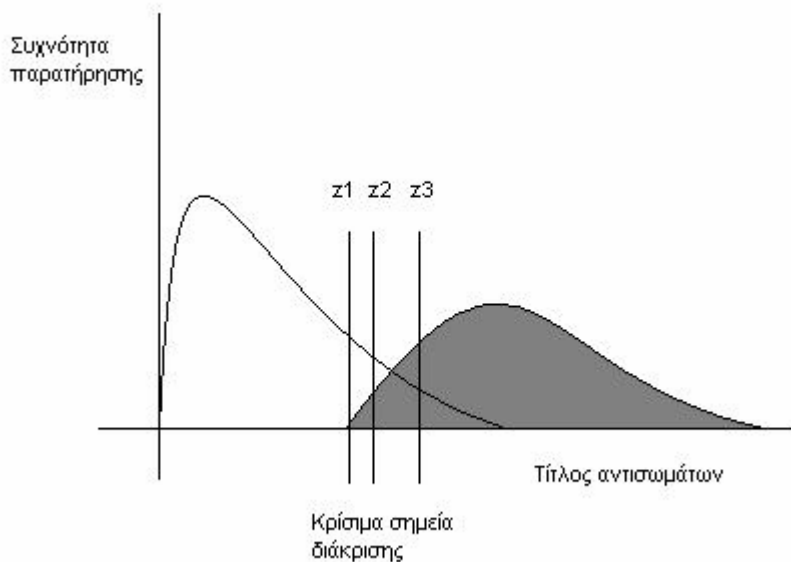
ενώ το φαινομενικό ποσοστό προσβολής (ως φαινομενικό ποσοστό προσβολής ορίζεται το ποσοστό των ζώων που κατατάσσονται ως προσβεβλημένα από μια διαγνωστική δοκιμή, ή, αλλιώς, η πιθανότητα ένα τυχαία επιλεγμένο ζώο από τον πληθυσμό να καταταγεί ως θετικό σε μια διαγνωστική δοκιμή για μια συγκεκριμένη νόσο) ($\Phi\Pi\Pi$), που υπολογίζεται με βάση τα αποτελέσματα της διαγνωστικής δοκιμής, ως:

$$\Phi\Pi\Pi = \frac{a + \beta}{a + \beta + \gamma + \delta} \quad (1.4)$$

Η E_v και E_t διαγνωστικών δοκιμών που παίρνουν συνεχείς τιμές, όπως π.χ. μια ορολογική δοκιμή ELISA για τη διάγνωση της παραφυματίωσης των αιγών και

προβάτων, εξαρτάται αφενός από την κατανομή των τιμών της μεταβλητής στόχος στα προσβεβλημένα και υγιή ζώα και αφετέρου από την επιλογή του κρίσιμου σημείου διάκρισης (κσδ). Προφανώς, όταν δεν υπάρχει αλληλοκάλυψη των κατανομών των τιμών μεταξύ των υγιών και προσβεβλημένων ζώων είναι αυτονόητη η επιλογή ενός κσδ που διαχωρίζει πλήρως τις δύο κατανομές και επομένως αποδίδει E_u και E_i 100% (εικόνα 1.1). Όταν όμως, όπως συνήθως, υπάρχει κάποιος βαθμός αλληλοκάλυψης των δύο κατανομών η E_u και η E_i της διαγνωστικής δοκιμής συνδέονται αντιστρόφως ανάλογα και οι τιμές τους εξαρτώνται από την επιλογή κσδ. Στην εικόνα 1.4, μετακίνηση του κσδ από αριστερά προς τα δεξιά (από z_1 , σε z_2 και z_3) αυξάνει την E_i και μειώνει την E_u .

Εικόνα 1.4. Η συχνότητα κατανομής του τίτλου αντισωμάτων για τα υγιή (λευκή περιοχή) και τα προσβεβλημένα ζώα (σκιασμένη περιοχή). Τα z_1 , z_2 , z_3 αντιστοιχούν σε υποθετικά κρίσιμα σημεία διάκρισης (κσδ). Μετατόπιση του κσδ από αριστερά προς τα δεξιά έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της E_i και τη μείωση της E_u .



Για τον υπολογισμό της E_u και της E_i είναι προϋπόθεση η εκ των προτέρων γνώση της κατανομής των προσβεβλημένων ($\alpha+\gamma$) και των υγιών ($\beta+\delta$) ζώων στον πληθυσμό ($\alpha+\beta+\gamma+\delta$). Συχνά, όταν αυτή δεν υπάρχει, χρησιμοποιούνται οι κατανομές που προκύπτουν από τα αποτελέσματα μιας διαγνωστικής δοκιμής αναφοράς που, συχνά λανθασμένα, θεωρείται αλάνθαστη (ότι έχει, δηλαδή, τέλεια E_u και E_i) ενώ δεν είναι (Epoie et al., 2000; Greiner and Gardner, 2000). Εάν τα σφάλματα της διαγνωστικής δοκιμής αναφοράς είναι γνωστά, η E_u και η E_i της νέας διαγνωστικής δοκιμής μπορούν να υπολογιστούν χωρίς σφάλμα (Gart and Buck, 1966; Staquet et al., 1981), συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των δύο διαγνωστικών δοκιμών (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2. Οι συνδυασμοί (α, β, γ και δ) των θετικών και των αρνητικών αποτελεσμάτων της διαγνωστικής δοκιμής αναφοράς και της νέας διαγνωστικής δοκιμής, μετά την ταυτόχρονη εφαρμογή τους σε έναν πληθυσμό ν ζώων.

		Διαγνωστική δοκιμή αναφοράς		
		+	-	
Νέα διαγνωστική δοκιμή +	α	β	η=α+β	
Νέα διαγνωστική δοκιμή -	γ	δ	θ=γ+δ	
		ε=α+γ	ζ=β+δ	ν=α+β+γ+δ

Αν $E_{\nu_{\alpha\alpha\phi}}$ και $E_{I_{\alpha\alpha\phi}}$ είναι η E_{ν} και η E_I της διαγνωστικής δοκιμής αναφοράς, η ευαισθησία ($E_{\nu_{\delta\delta}}$) και η ειδικότητα ($E_{I_{\delta\delta}}$) της νέας διαγνωστικής δοκιμής υπολογίζονται ως:

$$E_{\nu_{\delta\delta}} = \frac{\eta E_{I_{\alpha\alpha\phi}} - \beta}{\nu(E_{I_{\alpha\alpha\phi}} - 1) + \varepsilon} \quad (1.5)$$

και

$$E_{I_{\delta\delta}} = \frac{\theta E_{\nu_{\alpha\alpha\phi}} - \gamma}{\nu E_{\nu_{\alpha\alpha\phi}} - \varepsilon} \quad (1.6)$$

και το πραγματικό ποσοστό προσβολής (ΠΠΠ) ως:

$$\text{ΠΠΠ} = \frac{\nu(E_{I_{\alpha\alpha\phi}} - 1) + \varepsilon}{\nu(E_{\nu_{\alpha\alpha\phi}} + E_{I_{\alpha\alpha\phi}} - 1)} \quad (1.7)$$

Οι τύποι (1.5)-(1.7) ισχύουν μόνο για υπό συνθήκη ανεξάρτητες διαγνωστικές δοκιμές. Ο όρος «υπό συνθήκη ανεξαρτησία», σημαίνει πως υπάρχει ανεξαρτησία υπό τη συνθήκη της ισχύος μίας συγκεκριμένης κατάστασης, εν προκειμένω, της υγείας ή μη των ζώων. Όταν οι διαγνωστικές δοκιμές είναι υπό συνθήκη ανεξάρτητες, η E_{ν} της μίας δεν εξαρτάται από το αν τα αποτελέσματα της άλλης είναι θετικά ή αρνητικά στον ίδιο πληθυσμό προσβεβλημένων ζώων (Gardner et al., 2000). Αντίστοιχα, ορίζεται και η υπό συνθήκη ανεξαρτησία για την E_I δύο διαγνωστικών δοκιμών σε έναν πληθυσμό υγιών ζώων. Για παράδειγμα, αν μια διαγνωστική δοκιμή με E_{ν} (ή, αντίστοιχα, E_I) 90% εφαρμοστεί σε 100 προσβεβλημένα (ή υγιή) ζώα, 10 ζώα απ' αυτά αναμένουμε να καταταγούν εσφαλμένα ως αρνητικά (ή θετικά). Αν μια δεύτερη διαγνωστική δοκιμή με E_{ν} (ή E_I) 80% κατατάξει ορθά 8 απ' αυτά τα 10 ζώα ως προσβεβλημένα (ή υγιή), οι δύο αυτές διαγνωστικές δοκιμές θεωρούνται υπό συνθήκη ανεξάρτητες μεταξύ τους στον πληθυσμό των προσβεβλημένων (ή υγιών) ζώων. Δηλαδή, τα αποτελέσματα της μίας διαγνωστικής δοκιμής δε μας δίνουν καμία πληροφορία για το πιθανό αποτέλεσμα της άλλης διαγνωστικής δοκιμής στον πληθυσμό των προσβεβλημένων (ή υγιών) ζώων (Gardner et al., 2000; Enoe et al., 2000; Toft et al., 2005). Υπό συνθήκη εξάρτηση δύο

διαγνωστικών δοκιμών υπάρχει, όταν η Ευ (ή Ει) της μιας διαγνωστικής δοκιμής είναι διαφορετική ανάμεσα στα προσβεβλημένα (ή υγιή) ζώα που είναι θετικά (ή αρνητικά) στην άλλη διαγνωστική δοκιμή και σε εκείνα τα οποία η άλλη διαγνωστική δοκιμή έχει εσφαλμένα κατατάξει ως αρνητικά (ή θετικά) (Gardner et al., 2000; Enoe et al., 2001; Georgiadis et al., 2003; Toft et al., 2005). Δηλαδή, σε συνέχεια του προηγούμενου παραδείγματος, αν η δεύτερη διαγνωστική δοκιμή κατατάξει ορθά μόνο 2 από τα 10 ζώα, ως προσβεβλημένα (ή υγιή), οι δύο αυτές διαγνωστικές δοκιμές εμφανίζουν εξάρτηση, και μάλιστα θετική, των αποτελεσμάτων τους στον πληθυσμό των προσβεβλημένων (ή υγιών) ζώων. Εν ολίγοις, η πιθανότητα να κάνουν μαζί λάθος στον ίδιο πληθυσμό προσβεβλημένων (ή υγιών) ζώων είναι μεγαλύτερη από αυτή που οφείλεται σε τυχαίους παράγοντες.

Δυστυχώς, όμως, η εκ των προτέρων γνώση των κατανομών υγιών και προσβεβλημένων ζώων ή η ύπαρξη διαγνωστικών δοκιμών αναφοράς με γνωστή αξιοπιστία σπανίως υπάρχει. Μέθοδοι εκτίμησης της Ευ και της Ει που δεν απαιτούν την εκ των προτέρων γνώση των κατανομών υγιών και προσβεβλημένων ζώων αποτελούν μια εξαιρετική εναλλακτική επιλογή. Οι μέθοδοι αυτοί, που περιγράφονται διεξοδικά στη συνέχεια, είναι γνωστές ως μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης.

1.2.5. Μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης (Latent-class models).

Τα μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης αρχικά θεωρούν άγνωστο αν κάθε ζώο είναι προσβεβλημένο ή υγιές, παρά το ότι η πραγματική του κατάσταση είναι συγκεκριμένη και δεδομένη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται και ο όρος λανθάνουσα κατάσταση: κατάσταση που τα μοντέλα αυτά θεωρούν άγνωστη αλλά είναι υπαρκτή και συγκεκριμένη για κάθε ζώο.

Η εκτίμηση της Ευ και της Ει με τη χρήση αυτών των μοντέλων προϋποθέτει την ταυτόχρονη εφαρμογή δύο ή περισσότερων διαγνωστικών δοκιμών σε έναν ή περισσότερους πληθυσμούς ζώων με διαφορετικό πραγματικό ποσοστό προσβολής. Οι Hui and Walter (1980) εκτίμησαν την Ευ και την Ει δύο υπό συνθήκη ανεξάρτητων διαγνωστικών δοκιμών, μετά από την ταυτόχρονη εφαρμογή τους σε άτομα προερχόμενα από δύο πληθυσμούς με διαφορετικό πραγματικό ποσοστό προσβολής. Αργότερα, οι Walter and Irwig (1988) περιέγραψαν εκτενώς την εφαρμογή των μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης και σε άλλες συνθήκες, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση ενός πληθυσμού και τριών διαγνωστικών δοκιμών. Πρόσφατα, οι Enoe et al. (2001), εφάρμοσαν την παραπάνω μεθοδολογία για την εκτίμηση της εναισθησίας και της ειδικότητας δύο διαγνωστικών δοκιμών σε περισσότερους από δύο πληθυσμούς.

Το πρότυπο μοντέλο των Hui and Walter καθώς και τα μεταγενέστερα και παρεμφερή μοντέλα έχουν εφαρμοστεί στη στατιστική έρευνα (Vacek, 1985; Walter and Irwig, 1988; Johnson et al., 2001) και στην ιατρική (Walter et al., 1991; de Bock et al., 1994; Mahoney et al., 1998; Rybicki et al., 1998). Εντούτοις, τελευταία μόνο χρησιμοποιήθηκαν στην κτηνιατρική (Agger et al., 1997; Enoe et al., 1997; Georgiadis et al., 1998; 2003; Enoe et al., 2000; 2001; Branscum et al., 2005).

Η μεθοδολογία επίλυσης των μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης στηρίζεται στην εξισορρόπηση μεταξύ των διαθέσιμων και των απαιτούμενων πληροφοριών, ή αλλιώς, των βαθμών ελευθερίας με τον αριθμό των προς εκτίμηση παραμέτρων.

Διαθέσιμες πληροφορίες είναι οι συνδυασμοί των αποτελεσμάτων των διαγνωστικών δοκιμών σε κάθε πληθυσμό. Οι προς εκτίμηση παράμετροι είναι οι E_u και οι E_i των διαγνωστικών δοκιμών και το πραγματικό ποσοστό προσβολής σε κάθε πληθυσμό.

1.2.5.1. Το πρότυπο μοντέλο των Hui and Walter (1980)

Η εφαρμογή δύο διαγνωστικών δοκιμών για τον εντοπισμό του ίδιου νοσήματος στα ζώα ενός πληθυσμού μας δίνει τέσσερις πιθανούς συνδυασμούς αποτελεσμάτων που συνοπτικά παρουσιάζονται στον πίνακα 1.3.

Πίνακας 1.3. Οι συνδυασμοί (α, β, γ και δ) των θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων δύο διαγνωστικών δοκιμών μετά την ταυτόχρονη εφαρμογή τους σε έναν πληθυσμό n ζώων.

		Διαγνωστική δοκιμή 1		
		+	-	
Διαγνωστική δοκιμή 2	+	α	β	$\eta = \alpha + \beta$
	-	γ	δ	$\theta = \gamma + \delta$
		$\varepsilon = \alpha + \gamma$	$\zeta = \beta + \delta$	$\nu = \alpha + \beta + \gamma + \delta$

Οι προς εκτίμηση παράμετροι είναι πέντε. Η E_u και η E_i της κάθε διαγνωστικής δοκιμής και το πραγματικό ποσοστό προσβολής στον πληθυσμό. Ένας 2×2 πίνακας, όπως ο 1.3, μας δίνει, όμως, μόνο 3 βαθμούς ελευθερίας, επειδή, όταν είναι γνωστό το n και οι τιμές τριών οποιονδήποτε κελιών, μπορεί να υπολογιστεί η τιμή του τέταρτου κελιού. Επομένως δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός των αγνώστων παραμέτρων.

Οι Hui and Walter (1980) εφάρμοσαν δύο διαγνωστικές δοκιμές ταυτόχρονα σε άτομα δύο πληθυσμών με διαφορετικό πραγματικό ποσοστό προσβολής. Με τον τρόπο αυτό σχηματίστηκαν δύο 2×2 πίνακες, ένας για κάθε πληθυσμό, που έδωσαν συνολικά έξι βαθμούς ελευθερίας (Πίνακας 1.4). Έξι ήταν επίσης και οι προς εκτίμηση παράμετροι (η E_u και η E_i της κάθε διαγνωστικής δοκιμής και το πραγματικό ποσοστό προσβολής σε κάθε πληθυσμό) ίσες, δηλαδή, με τον αριθμό των βαθμών ελευθερίας και επομένως ήταν δυνατή η εκτίμησή τους.

Πίνακας 1.4. Οι συνδυασμοί των θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων δύο διαγνωστικών δοκιμών μετά την ταυτόχρονη εφαρμογή τους στα άτομα δύο πληθυσμών με διαφορετικό πραγματικό ποσοστό προσβολής.

		Διαγνωστική δοκιμή 1		
		+	-	
Διαγνωστική δοκιμή 2	+	α_1	β_1	$\eta_1 = \alpha_1 + \beta_1$
	-	γ_1	δ_1	$\theta_1 = \gamma_1 + \delta_1$
		$\varepsilon_1 = \alpha_1 + \gamma_1$	$\zeta_1 = \beta_1 + \delta_1$	ν_1

Πληθυσμός 2		Διαγνωστική δοκιμή 1		
		+	-	
Διαγνωστική δοκιμή 2 +	α_2	β_2	$\eta_2 = \alpha_2 + \beta_2$	
-	γ_2	δ_2	$\theta_2 = \gamma_2 + \delta_2$	
	$\varepsilon_2 = \alpha_2 + \gamma_2$	$\zeta_2 = \beta_2 + \delta_2$	ν_2	

Οι εκτιμήσεις μεγίστης πιθανοφάνειας που έδωσαν οι Hui and Walter (1980) για την E_u και την E_i των δύο διαγνωστικών δοκιμών και για τα πραγματικά ποσοστά προσβολής των δύο πληθυσμών ήταν:

$$E_{u_1} = \frac{(\eta_1 \varepsilon_2 - \varepsilon_1 \eta_2) / \nu_1 \nu_2 + \alpha_2 / \nu_2 - \alpha_1 / \nu_1 + \Phi}{2(\varepsilon_2 / \nu_2 - \varepsilon_1 / \nu_1)} \quad (1.8)$$

$$E_{u_2} = \frac{(\eta_2 \varepsilon_1 - \varepsilon_2 \eta_1) / \nu_1 \nu_2 + \alpha_2 / \nu_2 - \alpha_1 / \nu_1 + \Phi}{2(\eta_2 / \nu_2 - \eta_1 / \nu_1)} \quad (1.9)$$

$$E_{i_1} = \frac{(\zeta_1 \theta_2 - \theta_1 \zeta_2) / \nu_1 \nu_2 + \delta_1 / \nu_1 - \delta_2 / \nu_2 + \Phi}{2(\varepsilon_2 / \nu_2 - \varepsilon_1 / \nu_1)} \quad (1.10)$$

$$E_{i_2} = \frac{(\zeta_2 \theta_1 - \theta_2 \zeta_1) / \nu_1 \nu_2 + \delta_1 / \nu_1 - \delta_2 / \nu_2 + \Phi}{2(\eta_2 / \nu_2 - \eta_1 / \nu_1)} \quad (1.11)$$

$$\hat{\Pi}_1 = 0.5 - \left\{ \frac{(\eta_1 / \nu_1)(\varepsilon_1 / \nu_1 - \varepsilon_2 / \nu_2) + (\varepsilon_1 / \nu_1)(\eta_1 / \nu_1 - \eta_2 / \nu_2) + \alpha_2 / \nu_2 - \alpha_1 / \nu_1}{2\Phi} \right\} \quad (1.12)$$

$$\hat{\Pi}_2 = 0.5 - \left\{ \frac{(\eta_2 / \nu_2)(\varepsilon_1 / \nu_1 - \varepsilon_2 / \nu_2) + (\varepsilon_2 / \nu_2)(\eta_1 / \nu_1 - \eta_2 / \nu_2) + \alpha_2 / \nu_2 - \alpha_1 / \nu_1}{2\Phi} \right\} \quad (1.13)$$

με Φ :

$$\Phi = \pm \left[\left(\frac{\eta_1 \varepsilon_2 - \eta_2 \varepsilon_1}{\nu_1 \nu_2} + \frac{\alpha_1}{\nu_1} - \frac{\alpha_2}{\nu_2} \right)^2 - 4 \left(\frac{\eta_1}{\nu_1} - \frac{\eta_2}{\nu_2} \right) \left(\frac{\alpha_1 \varepsilon_2 - \alpha_2 \varepsilon_1}{\nu_1 \nu_2} \right) \right]^{0.5} \quad (1.14)$$

όπου E_{u_1} , E_{i_1} , E_{u_2} , E_{i_2} η E_u και η E_i των διαγνωστικών δοκιμών 1 και 2, και Π_1 , Π_2 το πραγματικό ποσοστό προσβολής στον πληθυσμό 1 και 2, αντίστοιχα.

Οι δύο πληθυσμοί είναι απολύτως απαραίτητοι για την εξισορρόπηση των βαθμών ελευθερίας με τις προς εκτίμηση παραμέτρους. Η προσθήκη περισσότερων πληθυσμών αυξάνει τους βαθμούς ελευθερίας και βελτιστοποιεί τις εκτιμήσεις του μοντέλου (Enoe et al., 2000; Toft et al., 2005). Πρόσφατα, περιγράφηκαν μοντέλα που εκτιμούν την E_u και την E_i δύο διαγνωστικών δοκιμών μετά την ταυτόχρονη εφαρμογή τους σε περισσότερους από δύο πληθυσμούς (Enoe et al., 2001; Nielsen et al., 2002c; Κεφάλαιο 2).

1.2.5.2. Γενική δομή των δεδομένων στα μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης

Για κάθε πληθυσμό i ($i=1,2,\dots,n$), ο αριθμός των παρατηρήσεων $\alpha_i, \beta_i, \gamma_i, \delta_i$, για κάθε συνδυασμό αποτελεσμάτων των δύο διαγνωστικών δοκιμών του πίνακα 1.4, προκύπτει από την κατά μέρη άθροιση των αντίστοιχων παρατηρήσεων στα υγιή και προσβεβλημένα ζώα. Η κατανομή των παρατηρήσεων αυτών είναι μη ορατή ή λανθάνουσα (Πίνακα 1.5).

Πίνακας 1.5. Οι λανθάνοντες (μη ορατοί) συνδυασμοί των αποτελεσμάτων δύο διαγνωστικών δοκιμών στα υγιή (H) και προσβεβλημένα ζώα (D) κάθε πληθυσμού i .

Υγιή ζώα			
		Διαγνωστική δοκιμή 1	
		(+)	(-)
Διαγνωστική δοκιμή 2 (+)	α_{Hi}		β_{Hi}
	(-) γ_{Hi}		δ_{Hi}
Προσβεβλημένα ζώα			
		Διαγνωστική δοκιμή 1	
		(+)	(-)
Διαγνωστική δοκιμή 2 (+)	α_{Di}		β_{Di}
	(-) γ_{Di}		δ_{Di}

Οι αντίστοιχες πιθανότητες εμφάνισης των συνδυασμών του Πίνακα 1.5 εκφρασμένες σε σχέση με την E_u και την E_i των δύο διαγνωστικών δοκιμών και το πραγματικό ποσοστό προσβολής ($E_{u1}, E_{u2}, E_{i1}, E_{i2}$ και Π_i , αντίστοιχα) φαίνονται στον πίνακα 1.6.

Πίνακας 1.6. Οι πιθανότητες παρατήρησης των λανθανόντων δεδομένων του πίνακα 1.5 σε κάθε πληθυσμό i .

Υγιή ζώα			
	Διαγνωστική δοκιμή 1		
	(+)	(-)	
Διαγνωστική δοκιμή 2	(+)	$(1-\Pi_i)*(1-E_{11})*(1-E_{12})$	$(1-\Pi_i)*(1-E_{11})*E_{12}$
	(-)	$(1-\Pi_i)*E_{11}*(1-E_{12})$	$(1-\Pi_i)*E_{11}*E_{12}$
Προσβεβλημένα ζώα			
	Διαγνωστική δοκιμή 1		
	(+)	(-)	
Διαγνωστική δοκιμή 2	(+)	$\Pi_i*E_{11}*E_{12}$	$\Pi_i*E_{11}*(1-E_{12})$
	(-)	$\Pi_i*(1-E_{11})*E_{12}$	$\Pi_i*(1-E_{11})*(1-E_{12})$

Εμφανή σε κάθε πληθυσμό i είναι τα δεδομένα που προκύπτουν από την κατά μέρη άθροιση των δεδομένων του πίνακα 1.5. Ομοίως, προκύπτουν και οι παρατηρούμενες πιθανότητες εμφάνισης, που για κάθε πληθυσμό i είναι όπως φαίνονται στον πίνακα 1.7

Πίνακας 1.7. Οι πιθανότητες παρατήρησης των συνδυασμών των αποτελεσμάτων δύο διαγνωστικών δοκιμών σε κάθε πληθυσμό i .

Πληθυσμός i			
	Διαγνωστική δοκιμή 1		
	(+)	(-)	
Διαγνωστική δοκιμή 2	(+)	$\Pi_i E_{11} E_{12} + (1 - \Pi_i)(1 - E_{11})(1 - E_{12})$	$\Pi_i E_{11}(1 - E_{12}) + (1 - \Pi_i)(1 - E_{11})E_{12}$
	(-)	$\Pi_i(1 - E_{11})E_{12} + (1 - \Pi_i)E_{11}(1 - E_{12})$	$\Pi_i(1 - E_{11})(1 - E_{12}) + (1 - \Pi_i)E_{11}E_{12}$

Οι εκτιμήσεις της E_{11} και της E_{12} των διαγνωστικών δοκιμών καθώς και του πραγματικού ποσοστού προσβολής σε κάθε πληθυσμό i στηρίζονται είτε στις παρατηρούμενες πιθανότητες του πίνακα 1.7 είτε στις πιθανότητες των λανθανόντων δεδομένων του πίνακα 1.6. Η επιλογή εξαρτάται από τη μεθοδολογία επίλυσης (μεγίστης πιθανοφάνειας ή κατά Bayes) και τον αλγόριθμο ή το δειγματολόγητο (προκειμένου για τη μεθοδολογία εκτίμησης κατά Bayes) που θα χρησιμοποιηθεί.

1.2.6. Προϋποθέσεις για την εφαρμογή των μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης

Για την χρήση των μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης πρέπει να ισχύουν οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

1. Το πραγματικό ποσοστό προσβολής μεταξύ των πληθυσμών να διαφέρει.
2. Η Ευ και η Ει της κάθε διαγνωστικής δοκιμής να μην διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών.
3. Τα αποτελέσματα των διαγνωστικών δοκιμών να είναι υπό συνθήκη ανεξάρτητα μεταξύ τους ή όταν υπάρχει εξάρτηση αυτή να λαμβάνεται υπόψη.

Η ισχύς των προϋποθέσεων αυτών πρέπει να διερευνάται πριν τη χρήση των μοντέλων με τις μεθόδους που περιγράφονται αναλυτικά ακολούθως.

1.2.6.1. Προϋπόθεση της διαφοράς στο πραγματικό ποσοστό προσβολής μεταξύ των πληθυσμών

Όταν δεν ισχύει η προϋπόθεση της διαφοράς στο πραγματικό ποσοστό προσβολής μεταξύ των πληθυσμών, οι δύο ή περισσότεροι πληθυσμοί είναι στην ουσία ένας ή λιγότεροι από τους αρχικά υποθεθέντες με αποτέλεσμα να μειώνονται οι βαθμοί ελευθερίας του μοντέλου. Γι αυτό η επιλογή των πληθυσμών πρέπει να εξασφαλίζει το διαφορετικό πραγματικό ποσοστό προσβολής σε κάθε πληθυσμό. Ταυτόχρονα η επιλογή πρέπει να στηρίζεται σε έναν παράγοντα που δεν αλληλεπιδρά με κάποια ή κάποιες από τις διαγνωστικές δοκιμές έτσι ώστε να μην παραβιάζεται η προϋπόθεση της όμοιας Ευ και Ει μεταξύ των πληθυσμών (Enoe et al., 2000; Gardner et al., 2000; Nielsen et al., 2002c; Toft et al., 2005). Για παράδειγμα, το πραγματικό ποσοστό προσβολής από την παραφυματίωση ίσως να είναι διαφορετικό μεταξύ ζώων ηλικίας μεγαλύτερης και μικρότερης των 2 ετών. Το ίδιο, όμως, πιθανώς ισχύει και για την Ευ και την Ει των διαγνωστικών δοκιμών. Επομένως, η επιλογή των πληθυσμών με βάση την ηλικία θα ήταν στη συγκεκριμένη περίπτωση λάθος. Κριτήρια επιλογής πληθυσμών που είναι μη βιολογικοί παράγοντες, όπως διαφορετικά κοπάδια ή περιοχές μεταξύ των οποίων δεν υπάρχει κανείς προφανής λόγος παραβίασης της συνθήκης της όμοιας Ευ και Ει ενώ είναι πιθανό το πραγματικό ποσοστό προσβολής να διαφέρει (Enoe et al., 2000; 2001; Nielsen et al., 2002c; Toft et al., 2005), συνήθως προτιμώνται.

Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά μεταξύ των πραγματικών ποσοστών προσβολής των πληθυσμών τόσο μικρότερη είναι η διακύμανση των εκτιμώμενων παραμέτρων (Enoe et al., 2000; Toft et al., 2005). Το κέρδος αυτό στην ακρίβεια των εκτιμήσεων, σε ορισμένες ειδικές περιπτώσεις, επιδρά αρνητικά στην ισχύ της προϋπόθεσης της όμοιας Ευ και Ει μεταξύ των πληθυσμών, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση χρόνιων νοσημάτων. Στην παραφυματίωση, για παράδειγμα, η Ευ των διαγνωστικών δοκιμών φαίνεται ότι εξαρτάται από την κατανομή των κλινικών σταδίων της νόσου (Ridge et al., 1991; Sockett et al., 1992; Collins and Sockett, 1993; Sergeant et al., 2003) και πως διαφορές στο πραγματικό ποσοστό προσβολής συνήθως συσχετίζονται με διαφορετική κατανομή των κλινικών σταδίων της νόσου. Λογικά, λοιπόν, οι μεγάλες διαφορές των πραγματικών ποσοστών προσβολής μπορεί να συσχετίζονται με διαφορές στην Ευ των διαγνωστικών δοκιμών (Greiner and Gardner, 2000; Brenner and Gefeller, 1997). Σε κάθε περίπτωση η ισχύς της προϋπόθεσης της όμοιας Ευ και Ει πρέπει να ελέγχεται όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

1.2.7.2. Προϋπόθεση της όμοιας Ευ και Ει μεταξύ των πληθυσμών

Η ισχύς της προϋπόθεσης αυτής διασφαλίζει ότι η προσθήκη κάθε επιπλέον πληθυσμού προσθέτει τρεις επιπλέον βαθμούς ελευθερίας και έναν μόνο άγνωστο (το πραγματικό ποσοστό προσβολής του νέου πληθυσμού) αφού η Ευ και η Ει κάθε διαγνωστικής δοκιμής είναι ίδια ανάμεσα στους πληθυσμούς (Enoe et al., 2000; Johnson et al., 2001; Toft et al., 2005). Διαφορετικά, η προσθήκη ενός επιπλέον πληθυσμού θα προσέθετε τρεις επιπλέον βαθμούς ελευθερίας και περισσότερες της μιας νέες παραμέτρους προς εκτίμηση.

Για τη διερεύνηση της υπόθεσης της σταθερής Ευ και Ει έχει προταθεί η ξεχωριστή ανάλυση για κάθε πληθυσμό. Αν οι εκτιμήσεις σε κάθε πληθυσμό χωριστά δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους και με τις εκτιμήσεις από την ανάλυση όλων των πληθυσμών η προϋπόθεση αυτή ισχύει (Georgiadis et al., 2003). Η σύγκριση αυτή είναι εφικτή μόνο με τη χρήση μεθοδολογίας επίλυσης κατά Bayes (1.2.8) επειδή κατά την ξεχωριστή ανάλυση των πληθυσμών οι βαθμοί ελευθερίας είναι τρεις και οι παράμετροι πέντε. Η μεθοδολογία σύγκρισης αναπτύχθηκε σε μοντέλα δύο πληθυσμών όπου εφαρμόστηκαν δύο διαγνωστικές δοκιμές (Georgiadis et al., 2003) και πρόσφατα εξειδικεύτηκε περαιτέρω σε μοντέλα τριών πληθυσμών και δύο διαγνωστικών δοκιμών (Κεφάλαια 2 & 3).

1.2.6.3. Υπό συνθήκη ανεξαρτησία των διαγνωστικών δοκιμών.

Όπως νωρίτερα περιγράφηκε αναλυτικά, δύο διαγνωστικές δοκιμές είναι υπό συνθήκη ανεξάρτητες όταν το αποτέλεσμα της μιας διαγνωστικής δοκιμής δε μας δίνει καμία πληροφορία για το πιθανό αποτέλεσμα της άλλης στα υγιή και στα προσβεβλημένα ζώα. Κατά την εφαρμογή των μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης, όταν οι δύο διαγνωστικές δοκιμές δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους, οι εκτιμήσεις που προκύπτουν υποθέτοντας πως ισχύει η υπό συνθήκη ανεξαρτησία τους διαφέρουν από την πραγματική τους Ευ και Ει. Το μέγεθος της διαφοράς εξαρτάται από το βαθμό εξάρτησης (Gardner et al., 2000; Enoe et al., 2001; Branscum et al., 2005; Toft et al., 2005). Για το λόγο αυτό, η ισχύς αυτής της προϋπόθεσης πρέπει πάντα να ελέγχεται. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ μοντέλων που υποθέτουν την υπό συνθήκη ανεξαρτησία των διαγνωστικών δοκιμών με μοντέλα που λαμβάνουν υπόψη την πιθανότητα της υπό συνθήκη εξάρτησης.

Η πιθανότητα της υπό συνθήκη εξάρτησης των διαγνωστικών δοκιμών λαμβάνεται υπόψη με την προσθήκη ενός συντελεστή συσχέτισης των Ευ (γ_{E_D}) και των Ει (γ_{E_I}) των διαγνωστικών δοκιμών. Όταν υπάρχει υπό συνθήκη εξάρτηση των διαγνωστικών δοκιμών, οι πίνακες 1.6 και 1.7 διαμορφώνονται στους πίνακες 1.8 και 1.9, αντίστοιχα.

Η βαρύτητα της εξάρτησης δύο διαγνωστικών δοκιμών και επομένως και οι τιμές των συντελεστών γ_{E_D} και γ_{E_I} εξαρτώνται από τις πραγματικές τιμές της Ευ και της Ει, αντίστοιχα (Vacek 1985; Dendukuri and Joseph 2001; Branscum et al., 2005; Κεφάλαιο 2 & 3). Το εύρος των τιμών των συντελεστών έχει ως όρια (Gardner et al., 2000):

$$\max(-(1-E_{v1})*(1-E_{v2}), -E_{v1}*E_{v2}) \leq \gamma_{E_{v0}} \leq \min(E_{v1}*(1-E_{v2}), E_{v2}*(1-E_{v1})) \quad (1.15)$$

και

$$\max(-(1-E_{l1})*(1-E_{l2}), -E_{l1}*E_{l2}) \leq \gamma_{E_{l1}} \leq \min(E_{l1}*(1-E_{l2}), E_{l2}*(1-E_{l1})) \quad (1.16)$$

Πίνακας 1.8. Οι πιθανότητες παρατήρησης των λανθανόντων δεδομένων του πίνακα 1.5 σε κάθε πληθυσμό i όταν οι δύο διαγνωστικές δοκιμές είναι υπό συνθήκη εξαρτημένες.

Υγιή ζώα		
	Διαγνωστική δοκιμή 1	
	(+)	(-)
Διαγνωστική δοκιμή 2 (+)	$(1-\Pi_i)*((1-E_{l1})*(1-E_{l2}) + \gamma_{E_{l0}})$	$(1-\Pi_i)*((1-E_{l1})*E_{l2} - \gamma_{E_{l0}})$
(-)	$(1-\Pi_i)*(E_{l1}*(1-E_{l2}) - \gamma_{E_{l1}})$	$(1-\Pi_i)*(E_{l1}*E_{l2} + \gamma_{E_{l1}})$
Ασθενή ζώα		
	Διαγνωστική δοκιμή 1	
	(+)	(-)
Διαγνωστική δοκιμή 2 (+)	$\Pi_i*(E_{v1}*E_{v2} + \gamma_{E_{v0}})$	$\Pi_i*(E_{v1}*(1-E_{v2}) - \gamma_{E_{v0}})$
(-)	$\Pi_i*((1-E_{v1})*E_{v2} - \gamma_{E_{v1}})$	$\Pi_i*((1-E_{v1})*(1-E_{v2}) + \gamma_{E_{v1}})$

Πίνακας 1.9. Η κατά μέρη άθροιση των πιθανοτήτων παρατήρησης των συνδυασμών των διαγνωστικών δοκιμών στα υγιή και προσβεβλημένα ζώα του πίνακα 1.8, όταν οι δύο διαγνωστικές δοκιμές είναι υπό συνθήκη εξαρτημένες, σε κάθε πληθυσμό i .

Πληθυσμός i		
	Διαγνωστική δοκιμή 1	
	(+)	(-)
Διαγνωστική δοκιμή 2 (+)	$\Pi_i*(E_{v1}*E_{v2} + \gamma_{E_{v0}}) + (1-\Pi_i)*((1-E_{l1})*(1-E_{l2}) + \gamma_{E_{l0}})$	$\Pi_i*((E_{v1}*(1-E_{v2}) - \gamma_{E_{v0}}) + (1-\Pi_i)*((1-E_{l1})*E_{l2} - \gamma_{E_{l1}})$
(-)	$\Pi_i*((1-E_{v1})*E_{v2} - \gamma_{E_{v1}}) + (1-\Pi_i)*(E_{l1}*(1-E_{l2}) - \gamma_{E_{l1}})$	$\Pi_i*((1-E_{v1})*(1-E_{v2}) + \gamma_{E_{v1}}) + (1-\Pi_i)*(E_{l1}*E_{l2} + \gamma_{E_{l1}})$

Η μηδενική τιμή των συντελεστών, που αντιστοιχεί στη μη συσχέτιση των αποτελεσμάτων, συνεπάγεται την ισχύ της προϋπόθεσης της ανεξαρτησίας των δύο διαγνωστικών δοκιμών για τα προσβεβλημένα (ή υγιή) ζώα (Gardner et al., 2000). Αν

$\gamma_{Ei} > 0$ (ή $\gamma_{Ei} > 0$), τότε υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της E_u (ή E_i) των διαγνωστικών δοκιμών. Θετική συσχέτιση μεταξύ της E_u (ή E_i) δύο διαγνωστικών δοκιμών σημαίνει πως η E_u (E_i) της μιας διαγνωστικής δοκιμής είναι μικρότερη στον υποπληθυσμό των ψευδώς αρνητικών (ή ψευδώς θετικών) ζώων στην άλλη διαγνωστική δοκιμή ή απλούστερα ότι οι δύο διαγνωστικές δοκιμές συμφωνούν στα ψευδώς αρνητικά (ή θετικά) αποτελέσματα σε ποσοστό μεγαλύτερο από αυτό που θα αναμένονταν λόγω τύχης (Gardner et al., 2000). Δύο διαγνωστικές δοκιμές μπορεί να εμφανίζουν συσχέτιση των αποτελεσμάτων τους μεταξύ μόνο των προσβεβλημένων ή μόνο των υγιών ζώων και όχι απαραίτητα μεταξύ και των δύο (Κεφάλαιο 3). Συνηθέστερα υπάρχει θετική παρά αρνητική συσχέτιση μεταξύ των διαγνωστικών δοκιμών (Gardner et al., 2000; Georgiadis et al., 2003). Διαγνωστικές δοκιμές με πολύ υψηλή E_u (ή E_i), και επομένως μικρό σφάλμα κατάταξης στα προσβεβλημένα (ή υγιή) ζώα, είναι πρακτικά ανεξάρτητες. Για παράδειγμα, με αντικατάσταση στον τύπο 1.16, δύο διαγνωστικές δοκιμές με $E_i = 0.98$ έχουν μέγιστο και ελάχιστο όριο του συντελεστή εξάρτησης για τα υγιή ζώα $-0,0004$ και $0,02$, αντίστοιχα. Ακόμα και η μέγιστη δυνατή τιμή, το $0,02$, είναι πολύ μικρή. Σε αυτή την περίπτωση, η εκτίμηση της E_i των διαγνωστικών δοκιμών χωρίς να ληφθεί υπόψη η σχέση εξάρτησης προσεγγίζει την πραγματική τιμή.

Διαγνωστικές δοκιμές που βασίζονται σε διαφορετικές βιολογικές αρχές συγκεντρώνουν περισσότερες πιθανότητες να είναι υπό συνθήκη ανεξάρτητες ή να εμφανίζουν μια ασθενή σχέση εξάρτησης από διαγνωστικές δοκιμές που στηρίζονται στην ίδια βιολογική αρχή (Gardner et al., 2000; Nielsen et al., 2002c; Georgiadis et al., 2003; Toft et al., 2005; Branscum et al., 2005). Για παράδειγμα, η ELISA και η ανίχνευση με καλλιέργεια κοπράνων της απέκκρισης του MAP είναι πιθανότατα ανεξάρτητες μεταξύ τους, αφού η μια ανιχνεύει τη χυμική ανοσολογική απάντηση του ξενιστή, ενώ η άλλη την απέκκριση του MAP με τα κόπρανα (Nielsen et al., 2002c; Κεφάλαιο 2). Αντίθετα, αν οι διαγνωστικές δοκιμές στηρίζονται στην ίδια βιολογική αρχή (π.χ. ανίχνευση αντισωμάτων), η πιθανότητα της υπό συνθήκη εξάρτησης των αποτελεσμάτων τους είναι μέτρια ως μεγάλη, όπως είναι για παράδειγμα η εξάρτηση των αποτελεσμάτων της ELISA, της σύνδεσης του συμπληρώματος και της ανοσοδιάχυσης σε άγαρ στην διάγνωση της παραφυματίωσης (Gardner et al., 2000). Αυτό ισχύει σε μεγαλύτερο βαθμό σε διαγνωστικές δοκιμές που στηρίζονται όχι μόνο στην ίδια βιολογική αρχή αλλά και στην ίδια βασική μεθοδολογία, όπως στην περίπτωση τριών διαφορετικών δοκιμών ELISA (Gardner et al., 2000). Βέβαια, οι γενικές αυτές αρχές δεν επιβεβαιώθηκαν πάντα από τα ευρήματα όλων των μελετών, όπως στην περίπτωση της ELISA και της σύνδεσης συμπληρώματος για τη διάγνωση της λοίμωξης χοίρων με *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Enoe et al., 2001) όπου τα σφάλματα των δύο δοκιμών ήταν ανεξάρτητα. Σε κάθε περίπτωση, η ισχύς της προϋπόθεσης της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας των διαγνωστικών δοκιμών πρέπει να ελέγχεται κατά την εκτίμηση της E_u και της E_i τους. Αν δεν ισχύει, πρέπει να προτιμώνται μοντέλα που λαμβάνουν υπόψη την υπό συνθήκη εξάρτηση των διαγνωστικών δοκιμών, μεταξύ είτε των προσβεβλημένων, είτε των υγιών ζώων (Κεφάλαιο 3), είτε και των δύο (Gardner et al., 2000; Branscum et al., 2005; Toft et al., 2005).

Η μέθοδος διερεύνησης της ισχύος της υπόθεσης της ανεξαρτησίας εξαρτάται από τη μεθοδολογία επίλυσης που χρησιμοποιείται. Εάν χρησιμοποιείται η μεθοδολογία προσδιορισμού των λύσεων μεγίστης πιθανοφάνειας, υπολογίζεται ο λογάριθμος πιθανοφάνειας του μοντέλου που υποθέτει την υπό συνθήκη ανεξαρτησία των

διαγνωστικών δοκιμών ($\Delta\Pi_A$) και του μοντέλου που υποθέτει την υπό συνθήκη εξάρτησή τους ($\Delta\Pi_E$). Η διαφορά μεταξύ των δύο λογαρίθμων πιθανοφάνειας αξιολογείται με βάση την τιμή του λόγου πιθανοφάνειας $LR = 2 * (\Delta\Pi_A - \Delta\Pi_E)$, που ακολουθεί χ^2 - κατανομή με δύο βαθμούς ελευθερίας. Οι βαθμοί ελευθερίας ισούνται με τη διαφορά στον αριθμό των παραμέτρων ανάμεσα στα δύο μοντέλα και είναι δύο επειδή υπάρχουν δύο επιπλέον παράμετροι, οι γ_{E0} και γ_{E1} , στο μοντέλο της εξάρτησης. Η μη στατιστικά σημαντική διαφορά καταδεικνύει πως τα δύο μοντέλα ταιριάζουν στα δεδομένα εξίσου καλά, και επομένως η υπόθεση της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας των διαγνωστικών δοκιμών δεν μπορεί να απορριφθεί (Enoe et al., 2001; Nielsen et al., 2002c; Enoe et al., 2003). Όταν χρησιμοποιείται η μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes υπάρχει μεγαλύτερη ευελιξία στον έλεγχο της υπόθεσης που μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:

α) Ο πρώτος τρόπος περιλαμβάνει τον υπολογισμό των τιμών γ_{E0} και γ_{E1} και των 95% διαστημάτων αξιοπιστίας τους από το μοντέλο εξάρτησης. Αν τα διαστήματα αξιοπιστίας για τους συντελεστές αυτού δεν περιλαμβάνουν το μηδέν, οι διαγνωστικές δοκιμές θεωρούνται υπό συνθήκη εξαρτημένες. Σε αντίθετη περίπτωση, δεν μπορεί να απορριφθεί η υπόθεση της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας τους (Gardner et al., 2000).

β) Ο δεύτερος τρόπος περιλαμβάνει τη σύγκριση των μοντέλων της υπό συνθήκη εξάρτησης και ανεξαρτησίας. Υπολογίζεται το κριτήριο απόκλισης (Deviance Information Criterion, DIC) των εκτιμήσεων από τα δεδομένα. Το μοντέλο με το χαμηλότερο κριτήριο απόκλισης είναι αυτό που ταιριάζει καλύτερα στα δεδομένα. Σημαντικές θεωρούνται διαφορές στην τιμή του DIC μεγαλύτερες του 2 (Spiegelhalter et al., 2002).

Όπως προαναφέρθηκε η σχέση εξάρτησης μπορεί να αφορά είτε τα υγιή είτε τα προσβεβλημένα ζώα είτε και τα δύο. Με τον τρόπο (α) είναι δυνατή η διερεύνηση της σχέσης εξάρτησης χωριστά στα υγιή και τα προσβεβλημένα ζώα, ενώ με τον τρόπο (β) παρέχεται ένα μέτρο της συνολικής καταλληλότητας του μοντέλου. Συνήθως, τα συμπεράσματα και με τους δύο τρόπους είναι ίδια. Όμως, υπάρχει η πιθανότητα μια σχέση εξάρτησης μόνο μεταξύ των προσβεβλημένων ζώων να χαθεί όταν εκτιμάται η συνολική καταλληλότητα των μοντέλων με τον τρόπο (β), και έτσι να υιοθετηθεί εσφαλμένα το μοντέλο ανεξαρτησίας. Σε αυτή την περίπτωση, το καταλληλότερο μοντέλο θα ήταν ένα μεικτό μοντέλο ανεξαρτησίας μεταξύ των υγιών ζώων και εξάρτησης μεταξύ των προσβεβλημένων (Κεφάλαιο 3).

1.2.7. Βαθμοί ελευθερίας και εκτίμηση των παραμέτρων

Η εκτίμηση της E_u και της E_i προϋποθέτει ότι τα δεδομένα παρέχουν βαθμούς ελευθερίας ίσους ή περισσότερους από τον αριθμό των προς εκτίμηση παραμέτρων (Enoe et al., 2000; Toft et al., 2005). Είναι ορθή πρακτική για τη στατιστική συμπερασματολογία οι βαθμοί ελευθερίας να είναι περισσότεροι από τις παραμέτρους (Toft et al., 2005). Επομένως, στην περίπτωση των δύο υπό συνθήκη ανεξάρτητων διαγνωστικών δοκιμών, αντί των ελάχιστα απαιτούμενων δύο πληθυσμών θα ήταν ορθότερο να χρησιμοποιούνται τρεις (Κεφάλαια 2 & 3) ή περισσότεροι πληθυσμοί (Enoe et al., 2001; Nielsen et al., 2002c). Όταν οι διαγνωστικές δοκιμές είναι υπό συνθήκη

ανεξάρτητες, κάθε πληθυσμός παρέχει τρεις επιπλέον βαθμούς ελευθερίας και μια επιπλέον άγνωστη παράμετρο, που είναι το πραγματικό ποσοστό προσβολής του πληθυσμού. Συνεπώς, η προσθήκη κάθε επιπλέον πληθυσμού, προσθέτει δύο παραπάνω βαθμούς ελευθερίας από τις άγνωστες παραμέτρους. Συνοπτικά, οι βαθμοί ελευθερίας είναι λιγότεροι από τις παραμέτρους όταν τα δεδομένα αφορούν την εφαρμογή μίας ή δύο διαγνωστικών δοκιμών σε έναν πληθυσμό, ενώ είναι ίσοι ή περισσότεροι από τις παραμέτρους όταν τα δεδομένα αφορούν την εφαρμογή δύο ή περισσότερων ανεξάρτητων διαγνωστικών δοκιμών σε δύο ή περισσότερους πληθυσμούς (Branscum et al., 2005).

Όταν, όμως, υπάρχει υπό συνθήκη εξάρτηση μεταξύ των διαγνωστικών δοκιμών, η προσθήκη πλέον των 2 πληθυσμών, αν και προσθέτει βαθμούς ελευθερίας στο σύστημα των εξισώσεων, δυσχεραίνει τη λύση τους, επειδή εντός του κάθε επιπλέον πληθυσμού πέραν του πραγματικού ποσοστού προσβολής πρέπει να εκτιμηθούν και οι δύο συντελεστές συσχέτισης των E_u και E_i (Georgiadis et al., 2003; Branscum et al., 2005; Toft et al., 2005). Αν και έχουν προταθεί μοντέλα εξάρτησης και τρόποι προσδιορισμού των λύσεων μεγίστης πιθανοφάνειας (Enoe et al., 2001; Nielsen et al., 2002c; Enoe et al., 2003), στην περίπτωση της υπό συνθήκη εξάρτησης των διαγνωστικών δοκιμών, προτιμότερη είναι η χρήση της μεθοδολογίας επίλυσης κατά Bayes. Η διαφορετική μεθοδολογία επίλυσης δε λύνει το πρόβλημα, αλλά επιτρέπει την εισαγωγή - εκτός των δεδομένων - και εκ των προτέρων πληροφοριών για κάποιες από τις προς εκτίμηση παραμέτρους, βελτιστοποιώντας έτσι τις εκτιμήσεις (Joseph et al., 1995; Johnson et al., 2001; Enoe et al., 2000; Branscum et al., 2005).

1.2.8. Μέθοδοι επίλυσης

1.2.8.1. Προσδιορισμός των τιμών μεγίστης πιθανοφάνειας

Οι τιμές μεγίστης πιθανοφάνειας για τις παραμέτρους είναι αυτές που είναι πιο πιθανό να έχουν δώσει τα δεδομένα και υπολογίζονται μέσα από τη μεγιστοποίηση της τιμής της συνάρτησης πιθανοφάνειας των δεδομένων (Tanner, 1996). Οι εκτιμήσεις μεγίστης πιθανοφάνειας και τα τυπικά σφάλματά τους υπολογίζονται είτε με τον αλγόριθμο Newton-Raphson (Tanner, 1996) είτε με τον αλγόριθμο Expectation-Maximization (Dempster et al., 1977). Ο τελευταίος αξιοποιεί καλύτερα τη λανθάνουσα δομή των δεδομένων (Enoe et al., 2000). Όταν το μέγεθος του δείγματος είναι μεγάλο, οι εκτιμήσεις μεγίστης πιθανοφάνειας βρίσκονται πολύ κοντά στις πραγματικές τιμές των παραμέτρων και τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους είναι μικρά. Οι Enoe et al. (2000; 2001; 2003) περιέγραψαν αναλυτικά και εφάρμοσαν τη μεθοδολογία προσδιορισμού των λύσεων μεγίστης πιθανοφάνειας.

1.2.8.2. Μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes

Η μεθοδολογία εκτίμησης των παραμέτρων κατά Bayes θεωρεί τις παραμέτρους τυχαίες μεταβλητές. Επιτρέπει τον ορισμό εκ των προτέρων κατανομών $f(\theta)$ (priors) που μπορεί να παρέχουν κάποιες πληροφορίες για τις προς εκτίμηση παραμέτρους, και υπολογίζει τις εκ των υστέρων (posteriors) κατανομές $f(\theta|y)$ των παραμέτρων ως το

γινόμενο των εκ των προτέρων κατανομών $f(\theta)$ με την πιθανοφάνεια των δεδομένων $f(y/\theta)$ (1.17). Από την εκ των υστέρων κατανομή γίνονται εκτιμήσεις για τα μέτρα κεντρικής τάσης και διασποράς των παραμέτρων.

$$f(\theta / y) = f(y / \theta) * f(\theta) \quad (1.17)$$

Η μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes θεωρείται ως πιο «πιθανοθεωρητική» προσέγγιση σε σχέση με τον προσδιορισμό των τιμών μεγίστης πιθανοφάνειας (Ntzoufras, 1999). Το βασικό πλεονέκτημά της είναι ότι μπορεί να συμπεριλάβει πληροφορία ειδικών (όπως εμπειρογνομόνων και επιστημόνων που άπτονται του υπό μελέτη αντικειμένου) ή αποτελέσματα άλλων μελετών για τις προς εκτίμηση παραμέτρους, μέσα από τον ορισμό εκ των προτέρων κατανομών (Joseph et al., 1995; Johnson et al., 2001; Enoe et al., 2000; Toft et al., 2005; Branscum et al., 2005). Οι εκ των υστέρων κατανομές που προκύπτουν για τις παραμέτρους εξαρτώνται από τον ορισμό των εκ των προτέρων κατανομών και την πιθανοφάνεια των δεδομένων. Η εξάρτηση από τις εκ των προτέρων κατανομές είναι ισχυρότερη όσο μικρότερος είναι ο αριθμός των δεδομένων (Enoe et al., 2000; Johnson et al., 2001). Για το λόγο αυτό, η επιλογή των εκ των προτέρων κατανομών πρέπει να είναι ιδιαίτερα προσεκτική και να στηρίζεται σε γνώμη ειδικών ή προηγούμενες μελέτες, ιδίως όταν ο αριθμός των δεδομένων είναι μικρός. Σε κάθε περίπτωση, η επίδραση στις εκτιμήσεις της χρήσης διαφορετικών εκ των προτέρων κατανομών πρέπει να αξιολογείται. Η διαδικασία αξιολόγησης της επίδρασης των εκ των προτέρων κατανομών στις εκτιμήσεις καλείται ανάλυση ευαισθησίας και περιγράφεται στη συνέχεια. Αν οι εισαγόμενες εκ των προτέρων πληροφορίες είναι αστήρικτες, το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου μπορεί να μετατραπεί στο μεγαλύτερο μειονέκτημά της.

Η εισαγωγή εκ των προτέρων πληροφοριών γίνεται με την εισαγωγή κατανομών. Συνήθως, για τον ορισμό των εκ των προτέρων κατανομών επιλέγεται μια ομάδα εύχρηστων κατανομών, όπως οι βήτα (β) κατανομές (Johnson and Gastwirth, 1991; Joseph et al., 1995; Mendoza-Blanco et al., 1996; Enoe et al., 2000; Johnson et al., 2001; Georgiadis et al., 2003, Branscum et al., 2005). Οι β κατανομές ορίζονται από τις παραμέτρους α και β (Be (a,b)). Η χρήση των β κατανομών, αφενός απλουστεύει τις υπολογιστικές διαδικασίες, αφετέρου επειδή οι κατανομές είναι αρκετά ευέλικτες σχηματικά, ενδεχόμενες αλλαγές των δύο παραμέτρων α και β εξασφαλίζουν πληθώρα διαφορετικών μορφών (Joseph et al., 1995; Enoe et al., 2000; Branscum et al., 2005). Η Be (1,1) αντιστοιχεί στην εκ των προτέρων κατανομή που δεν παρέχει καμία πληροφορία και αποδίδει την ίδια πιθανότητα εμφάνισης κάθε τιμής στο εύρος από μηδέν έως ένα (ομοιογενής κατανομή). Αυτή η κατανομή χρησιμοποιείται για τις παραμέτρους για τις οποίες δεν είναι διαθέσιμη η γνώμη ειδικών, ή δεν υπάρχουν προηγούμενες μελέτες, ή, τέλος, στην περίπτωση που δεν επιθυμούμε την εισαγωγή εκ των προτέρων πληροφοριών (Johnson and Gastwirth, 1991; Gastwirth et al., 1991; Geisser and Johnson 1992; Mendoza-Blanco et al., 1996; Johnson and Pearson 1999; Enoe et al., 2000; Johnson et al., 2001). Η ανάλυση με τη μεθοδολογία κατά Bayes μπορεί να γίνει χωρίς την εισαγωγή καμίας απολύτως πληροφορίας για τις παραμέτρους, με τη χρήση αυτής της κατανομής για όλες τις παραμέτρους. Στην περίπτωση αυτή, οι εκ των υστέρων κατανομές εξαρτώνται μόνο από την πιθανοφάνεια των δεδομένων.

Για τον ορισμό μιας β κατανομής, απαιτείται αρχικά ο καθορισμός δύο ή τριών χαρακτηριστικών που επιθυμούμε για την κατανομή. Η συνήθης διαδικασία είναι η ακόλουθη: Πρώτα επιλέγεται η πιο πιθανή τιμή (mode) για την παράμετρο. Ακολούθως, η τιμή για την οποία είμαστε 95% βέβαιοι πως η παράμετρος που μας ενδιαφέρει δε θα την υπερβεί ή/και η ελάχιστη αναμενόμενη τιμή. Οι τιμές αυτές αντιστοιχούν στο 95ο ή/και στο 5ο εκατοστημόριο της β κατανομής, αντίστοιχα (Joseph et al., 1995; Enoe et al., 2000; Johnson et al., 2001; Branscum et al., 2005). Εναλλακτικά, έχει προταθεί και ο ορισμός της β κατανομής με βάση τον αναμενόμενο μέσο όρο και την τυπική απόκλιση ή τη διακύμανση, ή το μέσο όρο και την πιο πιθανή τιμή (Joseph et al., 1995). Στη συνέχεια, με βάση τις προσδιορισθείσες τιμές και τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, ορίζονται οι παράμετροι α και β της β κατανομής που ικανοποιούν της ορισθείσες συνθήκες. Η κατανομή που τελικά προκύπτει αναπαρίσταται γραφικά. Αν η μορφή της δεν ικανοποιεί, η διαδικασία επαναλαμβάνεται με άλλο τύπο κατανομής.

Μετά τον ορισμό των εκ των προτέρων κατανομών ακολουθεί η λύση των εξισώσεων (Joseph et al., 1995; Dendukuri and Joseph, 2001). Εδώ υπεισέρχεται η δειγματοληψία κατά Gibbs. Ο εν λόγω δειγματολήπτης είναι μια επαναληπτική διαδικασία δύο σταδίων. Αρχικά επιλέγονται τιμές για τις παραμέτρους, οι οποίες μπορεί να είναι οι καλύτερες προβλέψεις του ειδικού για την τιμή της παραμέτρου ή απλά τυχαία επιλεγμένες τιμές από τις εκ των προτέρων κατανομές. Με βάση τις τιμές αυτές, διαμορφώνονται οι προσωρινές ή υπό συνθήκη εκ των υστέρων κατανομές των παραμέτρων. Στη συνέχεια, μια τυχαία τιμή από τις κατανομές αυτές επιλέγεται για κάθε παράμετρο, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αρχική τιμή στον επόμενο κύκλο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Οι τυχαίες τιμές που κάθε φορά προκύπτουν από τις υπό συνθήκη εκ των υστέρων κατανομές των παραμέτρων, σχηματίζουν τελικά την εκ των υστέρων κατανομή για την κάθε παράμετρο. Για τις τελικές εκτιμήσεις των μέτρων κεντρικής τάσης και διασποράς χρησιμοποιούνται οι τιμές όταν έχει επέλθει σύγκλιση τιμών. Οι πρώτες τιμές που απορρίπτονται υπάγονται στην επονομαζόμενη φάση προσαρμογής της αλυσίδας Monte Carlo ή MC («burn-in» phase) (Johnson et al., 2000; Ntzoufras, 1999).

Οι τιμές των παραμέτρων που υπολογίζονται με τη μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes, δεν είναι αποδεκτές παρά μόνο όταν έχει ελεγχθεί η σύγκλιση τιμών. Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ελέγχου επιμέρους στοιχείων της υπολογιστικής διαδικασίας που παρέχουν ενδείξεις ότι έχει επέλθει η σύγκλιση τιμών. Επειδή οι μέθοδοι αυτές ελέγχουν αλλά δεν αποδεικνύουν τη σύγκλιση, καμία δεν πρέπει να θεωρείται αλάνθαστη και ο έλεγχος της σύγκλισης πρέπει να βασίζεται σε συνδυασμό δύο ή περισσότερων μεθόδων (Best et al., 1995). Οι βασικές μέθοδοι ελέγχου της σύγκλισης τιμών (Best et al., 1995; Spiegelhalter et al., 1996; 2003) είναι:

- (α) Έλεγχος της πορείας των τιμών των εκ των υστέρων κατανομών.
- (β) Έλεγχος των αυτοσυσχετίσεων (autocorrelations check).
- (γ) Οπτικός έλεγχος των εκ των υστέρων κατανομών.
- (δ) Μέθοδος των Gelman and Rubin (Gelman and Rubin, 1992).
- (ε) Μέθοδος Raftery and Lewis (Raftery and Lewis, 1992).

Από τις παραπάνω μόνο η μέθοδος των Raftery and Lewis μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον υπολογισμό του αριθμού των επαναλήψεων που απαιτούνται για τον υπολογισμό συγκεκριμένου εκατοστημορίου της εκ των υστέρων κατανομής στο

επιθυμητό επίπεδο ακρίβειας. Προφανώς, όσο μεγαλύτερη είναι η επιθυμητή ακρίβεια, τόσο μεγαλύτερος είναι και ο αριθμός των επαναλήψεων που απαιτείται. Επίσης, όλα τα εκατοστημόρια δε χρειάζονται τον ίδιο αριθμό επαναλήψεων για το ίδιο επίπεδο ακρίβειας (Raftery and Lewis, 1992; Best et al., 1995). Εκατοστημόρια στα άκρα της εκ των υστέρων κατανομής, όπως το 5° ή το 95°, συνήθως χρειάζονται μικρότερο αριθμό επαναλήψεων από εκατοστημόρια στη μέση της εκ των υστέρων κατανομής, για την ίδια ακρίβεια. Γι' αυτόν το λόγο, καλό είναι να αξιολογείται ο απαιτούμενος αριθμός επαναλήψεων, τόσο σε ακραία εκατοστημόρια (π.χ. 2.5° και 97,5°) όσο και στη διάμεση τιμή (50° εκατοστημόριο) (Κεφάλαια 2 & 3).

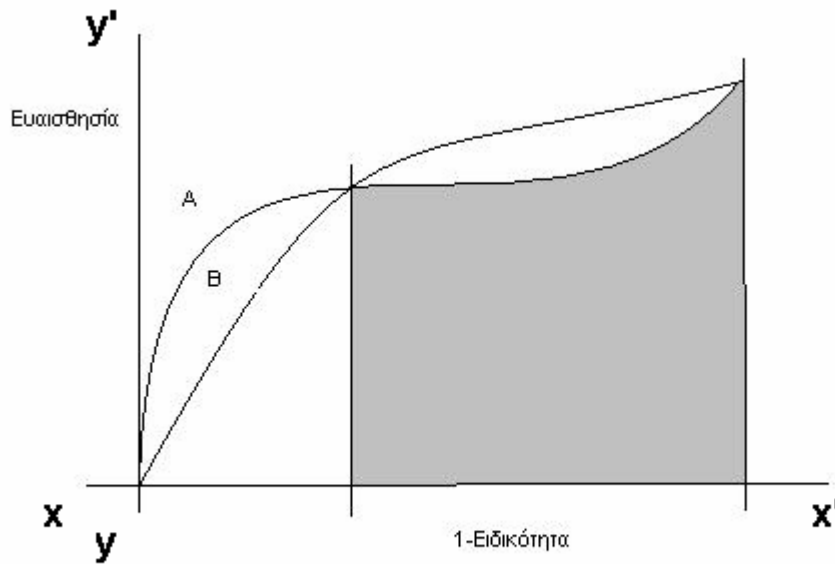
Η επίλυση με τη μεθοδολογία κατά Bayes δεν ολοκληρώνεται πριν την ανάλυση ευαισθησίας. Ελέγχεται πόσο αλλάζουν οι εκ των υστέρων κατανομές με τη χρήση διαφορετικών εκ των προτέρων κατανομών. Αν τα αποτελέσματα είναι πολύ διαφορετικά με την αλλαγή των εκ των προτέρων κατανομών, οι εκτιμήσεις είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στις αλλαγές αυτές και επιβάλλεται να παρατίθενται οι εκτιμήσεις των παραμέτρων που προκύπτουν από τη χρήση κάθε διαφορετικού συνδυασμού εκ των προτέρων κατανομών (Joseph et al., 1995; Gardner, 2002; Toft et al., 2005).

1.2.9. Εκτίμηση της αξιοπιστίας διαγνωστικών δοκιμών που παίρνουν συνεχείς τιμές

Όπως προαναφέρθηκε η Ευ και Ει διαγνωστικών δοκιμών που παίρνουν συνεχείς τιμές, όπως, π.χ., μια ορολογική δοκιμή ELISA για τη διάγνωση της παραφυματίωσης των αιγών και προβάτων, εξαρτάται, αφενός από την κατανομή των τιμών της μεταβλητής-στόχου στα προσβεβλημένα και υγιή ζώα, και αφετέρου από την επιλογή του κ.σ.δ. Προφανώς, όταν δεν υπάρχει αλληλοκάλυψη των κατανομών των τιμών μεταξύ των υγιών και των προσβεβλημένων ζώων, είναι αυτονόητη η επιλογή ενός κ.σ.δ. που διαχωρίζει πλήρως τις δύο κατανομές, και επομένως αποδίδει Ευ και Ει 100%. Όταν τμήματα της περιοχής των δύο κατανομών αλληλοκαλύπτονται, η Ευ και η Ει της διαγνωστικής δοκιμής συνδέονται αντιστρόφως ανάλογα και οι τιμές τους εξαρτώνται από την επιλογή κ.σ.δ.

Η καμπύλη ROC (Receiver Operating Characteristic curve) αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '50 για την ανάλυση της ανίχνευσης σημάτων στις τεχνικές επιστήμες και χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην ιατρική προς το τέλος της δεκαετίας του '60 για την αξιολόγηση των συσκευών απεικόνισης (ακτινοδιαγνωστική). Η ανάλυση καμπυλών ROC, αν και είναι ακόμα περιορισμένη στην ιατρική και την κτηνιατρική επιστήμη (Greiner et. al., 2000), χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για την αξιολόγηση των διαγνωστικών δοκιμών (Henderson, 1993; Zweig and Campbell, 1993; Schulzer, 1994; Smith, 1995). Για την κατασκευή της καμπύλης ROC αρχικά εκτιμώνται η Ευ και η Ει σε μια σειρά από κ.σ.δ. Η καμπύλη ROC είναι το γράφημα του ποσοστού των ορθώς θετικών αποτελεσμάτων (Ευ) στον άξονα των y προς το ποσοστό των ψευδώς θετικών (1- Ει) στον άξονα των x για τα ζεύγη τιμών Ευ και Ει που προκύπτουν από κάθε κ.σ.δ. (εικόνα 1.5).

Εικόνα 1.5. Δύο καμπύλες ROC, A και B, για δύο ορολογικές δοκιμές. Κάθε καμπύλη προέκυψε από τη γραφική παράσταση του ποσοστού των ψευδώς θετικών (1-Ei) προς το ποσοστό των ορθώς θετικών (Eu) αποτελεσμάτων της κάθε δοκιμής σε μια σειρά από κ.σ.δ. Το εμβαδό της περιοχής κάτω από την καμπύλη A δε διαφέρει από αυτό της καμπύλης B. Διαφέρουν όμως τα τμηματικά εμβαδά των καμπύλων A και B που βρίσκονται δεξιά του σημείου τομής τους. Στο σημείο τομής τους οι ορολογικές δοκιμές έχουν ίδια Eu και Ei.



Όπως η Eu και η Ei, έτσι και η καμπύλη ROC μιας διαγνωστικής δοκιμής αφορά συγκεκριμένο πληθυσμό (Kraemer, 1992; Smith, 1995; Greiner et. al., 2000) και μπορεί να είναι διαφορετικής μορφής σε διαφορετικούς πληθυσμούς (Zweig, 1993; Greiner and Gardner, 2000).

Το εμβαδόν της περιοχής κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve - AUC) είναι ένα μέτρο της συνολικής διακριτικής ικανότητας μιας διαγνωστικής δοκιμής. Μια αλάνθαστη διαγνωστική δοκιμή έχει εμβαδόν ίσο με 1, ενώ μια δοκιμή, τα αποτελέσματα της οποίας είναι καθαρά θέμα τύχης (π.χ. το στρίψιμο ενός νομίσματος) και, επομένως, δε μας δίνουν καμία πληροφορία για τη νόσο, έχει εμβαδόν ίσο με 0,5. Ο πιο απλός υπολογισμός του εμβαδού της καμπύλης ROC γίνεται με τον τραπεζοειδή κανόνα (Zweig and Campbell, 1993) ενώ υπάρχουν και μέθοδοι εξομάλυνσης της καμπύλης ROC και υπολογισμού του εμβαδού με παραμετρικό τρόπο (Obuchowski, 1994; 1997). Προφανώς, όσο μεγαλύτερο είναι το εμβαδόν, τόσο καλύτερη είναι και η συνολική διακριτική ικανότητα της διαγνωστικής δοκιμής. Σύμφωνα με μια αυθαίρετη κατάταξη (Swets, 1988), με βάση την καμπύλη ROC, μια διαγνωστική δοκιμή δεν παρέχει καμία πληροφορία όταν έχει $AUC=0.5$, ενώ έχει χαμηλή, μέτρια και υψηλή διακριτική ικανότητα όταν έχει $0.5 < AUC \leq 0.7$, $0.7 < AUC \leq 0.9$ και $0.9 < AUC < 1$, αντίστοιχα. Το εμβαδόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση της διακριτικής ικανότητας των διαγνωστικών δοκιμών. Η σύγκριση αυτή λαμβάνει υπόψη εξίσου όλες τις τιμές Eu και

Ει που προκύπτουν από τα πιθανά κ.σ.δ. Εάν το εμβαδόν δύο διαγνωστικών δοκιμών δεν διαφέρει συνολικά, αλλά διαφοροποιείται το τμηματικό εμβαδόν που αφορά την περιοχή διαγνωστικού ενδιαφέροντος προτείνεται η σύγκριση των τμηματικών εμβαδών (εικόνα 1.5) (Greiner et al., 2000).

Η κατασκευή μιας καμπύλης ROC που προϋποθέτει τη γνώση της Ευ και της Ει της διαγνωστικής δοκιμής σε μια σειρά από κ.σ.δ. μπορεί να διευκολυνθεί με τη χρήση μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης (Nielsen et al., 2002c; Κεφάλαιο 2). Σε αυτή την περίπτωση, ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται στον έλεγχο της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας των διαγνωστικών δοκιμών που πρέπει να λαμβάνει χώρα σε κάθε θεωρούμενο κ.σ.δ., αφού με την αλλαγή του κ.σ.δ. είναι πιθανό να εμφανιστεί σχέση εξάρτησης μεταξύ των δύο διαγνωστικών δοκιμών (Κεφάλαιο 2).

Το σημείο της καμπύλης που βρίσκεται πιο κοντά στην πάνω αριστερή γωνία του τετραγώνου με εμβαδόν 1, μεγιστοποιεί ταυτόχρονα την Ευ και την Ει της διαγνωστικής δοκιμής. Στο σημείο αυτό ελαχιστοποιείται συνολικά το ποσοστό των σφαλμάτων κατάταξης (ποσοστό ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων) της διαγνωστικής δοκιμής. Η επιλογή της συγκεκριμένης τιμής ως κ.σ.δ. είναι η καταλληλότερη όταν δε γνωρίζουμε εκ των προτέρων τίποτα σε σχέση με το αναμενόμενο πραγματικό ποσοστό προσβολής στον πληθυσμό και το κόστος των σφαλμάτων κατάταξης (ως κόστος θεωρείται το επιδημιολογικό και το οικονομικό κόστος των σφαλμάτων κατάταξης της διαγνωστικής δοκιμής). Όταν μπορούμε να λάβουμε υπόψη τις παραμέτρους αυτές υπολογίζουμε το κριτήριο βελτιστοποίησης (Σ) του κ.σ.δ. που είναι:

$$\Sigma = \frac{(1 - \Pi)}{\Pi} * \Lambda K \quad (1.18)$$

όπου Π το πραγματικό ποσοστό προσβολής στον πληθυσμό και ΛK ο λόγος κόστους ίσος με:

$$\Lambda K = \frac{K_{FP} - K_{TN}}{K_{FN} - K_{TP}} \quad (1.19)$$

όπου K_{FP} , K_{FN} , K_{TP} και K_{TN} το κόστος του ψευδώς θετικού, ψευδώς αρνητικού, αληθώς θετικού και αληθώς αρνητικού αποτελέσματος. Αν υποθέσουμε πως τα αληθή αποτελέσματα δεν έχουν κόστος $K_{TP} = 0$ και $K_{TN} = 0$, ο τύπος (1.19) απλοποιείται στο σχετικό κόστος των ψευδών αποτελεσμάτων:

$$\Lambda K = \frac{K_{FP}}{K_{FN}} \quad (1.20)$$

Το βέλτιστο κ.σ.δ. είναι εκείνο που δίνει τη μικρότερη τιμή Σ .

1.2.10. Εκτίμηση της αξιοπιστίας συνδυασμού διαγνωστικών δοκιμών

Η Ευ και Ει μπορούν να αφορούν είτε μια μόνο διαγνωστική δοκιμή είτε τη συνδυασμένη εφαρμογή και ερμηνεία δύο ή περισσότερων διαγνωστικών δοκιμών. Σε αυτή την περίπτωση, η συνολική ευαισθησία και η ειδικότητα της διαγνωστικής διαδικασίας εξαρτώνται από τον τρόπο ερμηνείας των αποτελεσμάτων των διαγνωστικών δοκιμών.

1.2.10.1. Ερμηνεία διαγνωστικών δοκιμών σε σειρά

Με βάση αυτόν τον τρόπο ερμηνείας ένα ζώο κατατάσσεται ως θετικό μόνο αν βρεθεί θετικό σε όλες τις διαγνωστικές δοκιμές, και ως αρνητικό σε κάθε άλλη περίπτωση. Η συνολική Ευ είναι μειωμένη και η συνολική Ει αυξημένη. Η συνολική Ευ και Ει της ερμηνείας δύο διαγνωστικών δοκιμών σε σειρά δίνεται από:

$$E\upsilon_s = E\upsilon_1 E\upsilon_2 \quad (1.23)$$

και

$$E\iota_s = 1 - (1 - E\iota_1)(1 - E\iota_2) \quad (1.24)$$

αντίστοιχα.

1.2.10.2. Παράλληλη ερμηνεία διαγνωστικών δοκιμών

Με βάση αυτόν τον τρόπο ερμηνείας ένα ζώο κατατάσσεται ως θετικό αν βρεθεί θετικό τουλάχιστον σε μία από τις διαγνωστικές δοκιμές. Η συνολική Ευ αυξάνεται, ενώ η συνολική Ει μειώνεται. Η συνολική Ευ και Ει της ερμηνείας δύο διαγνωστικών δοκιμών σε σειρά δίνεται από:

$$E\upsilon_p = 1 - (1 - E\upsilon_1)(1 - E\upsilon_2) \quad (1.25)$$

και:

$$E\iota_p = E\iota_1 E\iota_2 \quad (1.26)$$

αντίστοιχα.

Οι εξισώσεις (1.23)-(1.26) αφορούν υπό συνθήκη ανεξάρτητες διαγνωστικές δοκιμές. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η υπό συνθήκη εξάρτηση των διαγνωστικών δοκιμών κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους σε σειρά ή παράλληλα, για να μην υποεκτιμάται αλλά ούτε και να υπερεκτιμάται η συνολική Ευ και Ει. Λαμβάνοντας υπόψη την πιθανή υπό συνθήκη εξάρτηση δύο διαγνωστικών δοκιμών, η συνολική διαγνωστική Ευ και Ει τους όταν ερμηνεύονται σε σειρά είναι:

$$E\upsilon_s = E\upsilon_1 E\upsilon_2 + \gamma_{E\upsilon} \quad (1.27)$$

και

$$E\iota_s = 1 - (1 - E\iota_1)(1 - E\iota_2) - \gamma_{E\iota} \quad (1.28)$$

και όταν ερμηνεύονται παράλληλα είναι:

$$E\nu_p = 1 - (1 - E\nu_1)(1 - E\nu_2) - \gamma_{E\nu} \quad (1.29)$$

και

$$E\iota_p = E\iota_1 E\iota_2 + \gamma_{E\iota} \quad (1.30)$$

(Gardner et al., 2000; Smith and Slenning, 2000). Για να μεγιστοποιείται η επιθυμητή παράμετρος ($E\nu$ ή $E\iota$), είναι προφανές από τις εξισώσεις 1.27-1.30, ότι πρέπει να συνδυάζονται υπό συνθήκη ανεξάρτητες διαγνωστικές δοκιμές (Gardner et al., 2000).

1.2.11. Εκτίμηση του πραγματικού ποσοστού προσβολής

Όταν είναι γνωστές η $E\nu$ και η $E\iota$ της διαγνωστικής δοκιμής, οι Rogan και Gladen (1978) έδωσαν τη μαθηματική σχέση που συνδέει το πραγματικό ποσοστό προσβολής ($\Pi\Pi$) και το φαινομενικό ποσοστό προσβολής ($\Phi\Pi\Pi$):

$$\Pi\Pi = \frac{\Phi\Pi\Pi + E\iota - 1}{E\nu + E\iota - 1} \quad (1.31)$$

Έτσι, όταν το AP έχει υπολογιστεί μετά την εφαρμογή μιας διαγνωστικής δοκιμής με γνωστή ευαισθησία ($E\nu$) και ειδικότητα ($E\iota$), είναι δυνατό από τη σχέση 1.31. να εκτιμηθεί το $\Pi\Pi$.

Η διακύμανση του $\Pi\Pi$ είναι:

$$\text{var}_{\Pi\Pi} = \frac{\Phi\Pi\Pi(1 - \Phi\Pi\Pi)}{nJ^2} \quad (1.32)$$

(Greiner και Gardner, 2000),
με

$$J = E\nu + E\iota - 1 \quad (1.33)$$

γνωστό και ως Youden's index (Youden, 1950). Αλλιώς, η διακύμανση του $\Pi\Pi$ είναι ίση με $1/J^2$ φορές τη διακύμανση του $\Phi\Pi\Pi$ (Greiner και Gardner, 2000). Πράγματι, αν:

$$\text{var}_{\Phi\Pi\Pi} = \frac{\Phi\Pi\Pi(1 - \Phi\Pi\Pi)}{n} \quad (1.34)$$

τότε η (1.32) γράφεται και:

$$\text{var}_{\Pi\Pi} = \frac{\text{var}_{\Phi\Pi\Pi}}{J^2} \quad (1.35)$$

Με βάση τις εξισώσεις (1.31) και (1.35), μπορούν να υπολογισθούν το ΠΠ και η διακύμανσή του από το AP, τη διακύμανσή του, την Ευ και την Ει της διαγνωστικής δοκιμής (Greiner and Gardner, 2000).

1.3. Υπόβαθρο και σκοπός της μελέτης

Η αξιοπιστία των ορολογικών δοκιμών ELISA που ανιχνεύουν τη χυμική ανοσολογική απάντηση του ξενιστή στη λοίμωξη από MAP, έχει στο παρελθόν αξιολογηθεί στα βοοειδή (Collins et al., 1991; Sockett et al., 1992; Sweeney et al., 1995), στα πρόβατα και τις αίγες κυρίως με μεθόδους που βασίζονταν σε μη αλάνθαστες (χωρίς τέλεια Ευ και Ει) δοκιμές αναφοράς. Αναλυτικότερα στα πρόβατα, οι Hilbink et al. (1994), βασιζόμενοι μόνο σε ζώα θετικά στην ιστοπαθολογική εξέταση, υπολόγισαν την Ευ της ELISA (PARACHEK[®], CSL Ltd, Parkville) ίση με 98%. Βασιζόμενοι σε ζώα προερχόμενα από περιοχές που θεωρούνταν απαλλαγμένες της νόσου υπολόγισαν την Ει ίση με 99%. Οι Dubash et al. (1995) υπολόγισαν την Ευ και Ει της ίδιας ELISA σε 45% και 98%. Θεώρησαν ως προσβεβλημένα πρόβατα τα οποία ήταν θετικά στην καλλιέργεια κοπράνων ή στην ιστοπαθολογική εξέταση ή στην εξέταση επιχρισμάτων του εντερικού βλεννογόνου προερχόμενα από την περιοχή του ειλεού. Ως υγιή θεωρήθηκαν τα πρόβατα που προέρχονταν από περιοχές που θεωρούνταν απαλλαγμένες της νόσου. Για την ίδια ELISA, οι Hope et al. (2001) εκτίμησαν την Ευ σε 44,5% και την Ει σε 98,8% χρησιμοποιώντας αντίστοιχα δείγματα ζώων θετικών στην ιστοπαθολογική εξέταση του ειλεού και δείγματα ζώων προερχομένων από απαλλαγμένες περιοχές. Ομοίως, οι Sergeant et al. (2003) υπολόγισαν την Ευ μιας δοκιμής ELISA, που αρχικά προτάθηκε από τους Yokomizo et al. (1983, 1985), ίση με 41,5% και την Ει ίση με 95%. Στις αίγες, οι Molina et al. (1991) υπολόγισαν την Ευ δύο δοκιμών ELISA, που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριό τους, ίση με 88,2% και 87,5% και την Ει ίση με 95,2% και 93,6%, αντίστοιχα. Οι Rajukumar et al. (2001) εκτίμησαν την Ευ και την Ει μιας άλλης ELISA του δικού τους εργαστηρίου, σε 81,8% και 90,6%. Και στις δύο αυτές μελέτες η κατάταξη των ζώων σε υγιή και προσβεβλημένα βασίστηκε στην επιβεβαίωση της λοίμωξης με MAP με την καλλιέργεια κοπράνων ή την εξέταση επιχρισμάτων κοπράνων ή το αποτέλεσμα της ιστοπαθολογικής εξέτασης. Οι Whittington et al. (2003), ελέγχοντας δείγματα αιγών προερχομένων από περιοχές θεωρούμενες απαλλαγμένες από τη νόσο, υπολόγισαν την Ει δύο δοκιμών ELISA [PARACHEK[®], CSL Ltd, Parkville και αυτής που αναπτύχθηκε από τους Yokomizo et al. (1983; 1985)] ίση με 99,8% και 99,7%, αντίστοιχα. Η αξιοπιστία της καλλιέργειας κοπράνων, αν και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των δοκιμών ELISA στα πρόβατα και τις αίγες, δεν έχει εκτιμηθεί παρά μόνο στα βοοειδή. Οι Whitlock et al. (2000) υπολόγισαν την Ευ της καλλιέργειας κοπράνων σε Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM) ίση με 42%. Η εκτίμηση αυτή αφορούσε την πρώτη καλλιέργεια σε μια σειρά επαναλαμβανόμενων ελέγχων κάθε ζώου και στηρίχτηκε στην επιβεβαίωση της λοίμωξης με βάση το θετικό αποτέλεσμα στην ίδια την καλλιέργεια κοπράνων σε ένα τουλάχιστον δείγμα των επαναλαμβανόμενων ελέγχων.

Όλες οι προαναφερθείσες εκτιμήσεις βασίστηκαν σε διαγνωστικές δοκιμές αναφοράς που εσφαλμένα θεωρήθηκαν αλάνθαστες και γι αυτό κατά την διαδικασία εκτίμησης της αξιοπιστίας των νέων διαγνωστικών δοκιμών, δεν λήφθηκε υπόψη η μη τέλεια Ευ και Ει τους. Οι δοκιμές αναφοράς δεν είναι αλάνθαστες κυρίως γιατί δεν

ανιχνεύουν επιτυχώς όλες τις λανθάνουσες μορφές της λοίμωξης (Nielsen et al., 2002c), επειδή (i) στην περίπτωση της καλλιέργειας κοπράνων, η απέκκριση δε συμβαίνει κατά το αρχικό στάδιο της λοίμωξης ενώ στα μεταγενέστερα στάδια μπορεί να είναι διαλείπουσα ή να κατανέμεται ανομοιόμορφα στην μάζα των κοπράνων ή ο αριθμός των μικροοργανισμών στα δείγματα των κοπράνων να είναι μικρός και επομένως μη ανιχνεύσιμος (Whittington and Sergeant, 2001), (ii) στην περίπτωση της καλλιέργειας ιστών ο αριθμός των μικροοργανισμών στο εξεταζόμενο δείγμα να είναι μικρός και επομένως μη ανιχνεύσιμος και (iii) στην περίπτωση της ιστοπαθολογικής εξέτασης τα μυκοβακτηρίδια δεν έχουν προκαλέσει ακόμα ανιχνεύσιμες παθολογοανατομικές αλλοιώσεις (Whittington et al., 1999). Οι αδυναμίες αυτές έγιναν εμφανείς όταν οι νέες διαγνωστικές δοκιμές εφαρμόστηκαν στα ζώα που ήταν αρνητικά στις δοκιμές αναφοράς. Χαρακτηριστικά, οι Collins et al. (1991) διαπίστωσαν ότι 14,7% των αρνητικών στην καλλιέργεια κοπράνων βοοειδών ήταν θετικά στην ELISA (HerdCheck, IDEXX). Οι Hilbink et al. (1994) βρήκαν 29% των αρνητικών στην ιστοπαθολογική εξέταση προβάτων θετικά στην ELISA. Οι Whittington et al. (1999), σε μία σύγκριση διαγνωστικών δοκιμών ανίχνευσης του MAP, βρήκαν θετικά στην καλλιέργεια ιστών και κοπράνων (σε τρία διαφορετικά υποστρώματα BACTEC 12B, Middlebrook 7H10 και 7H11) το 32% και 17%, αντίστοιχα, των προβάτων που ήταν αρνητικά στην ιστοπαθολογική εξέταση. Οι Sergeant et al. (2003) αν και δεν εξέτασαν πρόβατα αρνητικά στην ιστοπαθολογική εξέταση, συζήτησαν εκτενώς την πιθανότητα να έχει η ιστοπαθολογική εξέταση τόσο Ευ όσο και Ει μικρότερη από 100%, ειδικά στα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα. Οι Whitlock et al. (2000) αναθεώρησαν την αρχική τους εκτίμηση του 45% για την Ευ της καλλιέργειας κοπράνων σε 25% όταν τα ζώα που ήταν θετικά στην ιστοπαθολογική εξέταση κατά τη σφαγή αλλά αρνητικά στην επαναλαμβανόμενη καλλιέργεια κοπράνων υπολογίστηκαν ως θετικά στον υπολογισμό της Ευ.

Διαφορετικά στελέχη MAP φαίνεται να κυριαρχούν στα πρόβατα και τις αίγες. Η συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών που απομονώνονται από τα πρόβατα ανήκουν στον πρόβειο τύπο ή τύπο I και δεν αναπτύσσονται καλά σε τεχνητά υποστρώματα (Collins et al., 1990; Juste et al., 1991; Marsh and Whittington, 2005). Η πλειοψηφία των στελεχών που απομονώνονται από τις αίγες ανήκουν στο βόειο τύπο ή τύπο II και παρουσιάζουν ταχύτερη ανάπτυξη από τα στελέχη τύπου I. Πρόκειται μάλλον για βόεια στελέχη του MAP προσαρμοσμένα στις αίγες (Whittington et al., 1998; Cousins et al., 2000; Whittington et al., 2000; Stevenson et al., 2002). Τελευταία περιγράφηκαν σε αίγες ενδιάμεσα στελέχη των τύπων I και II, τα στελέχη τύπου III, η ανάπτυξη των οποίων σε υποστρώματα είναι όμοια με αυτή των πρόβειων ή τύπου I στελεχών (de Juan et al., 2005). Τα στελέχη αυτά προέρχονταν από κοπάδια αιγών γειτνιάζοντα με κοπάδια προβάτων στην Ισπανία. Μεταξύ των στελεχών του MAP που κυριαρχούν στα πρόβατα και στις αίγες υπάρχουν, πιθανώς, διαφορές στη λοιμογόνο δύναμη. Ο Saxegaard (1990) διαπίστωσε την ύπαρξη ενός στελέχους MAP που ήταν παθογόνο για τις αίγες αλλά όχι για τα πρόβατα. Οι δημοσιευμένες εκτιμήσεις της Ευ και της Ει της καλλιέργειας κοπράνων, που προέρχονται από τα βοοειδή, θα ήταν λάθος να υιοθετηθούν για τα πρόβατα και τις αίγες αφού (α) τα πρόβεια στελέχη (Collins et al., 1990) και τα στελέχη τύπου III των αιγών (de Juan L. et al., 2005) έχουν διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης στα τεχνητά υποστρώματα και (β) τα στελέχη των μικρών μηρυκαστικών ενδεχομένως επηρεάζονται με διαφορετικό τρόπο από τα στελέχη των βοοειδών από τα πρωτόκολλα

απομάκρυνσης των επιμολύνσεων (Reddacliff et al., 2003). Θα ήταν λάθος, επίσης, να γενικευθούν οι εκτιμήσεις της αξιοπιστίας της καλλιέργειας κοπράνων στα πρόβατα και τις αίγες σε όλα τα καλλιεργητικά υποστρώματα. Στα βοοειδή, υπάρχει ασυμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών καλλιεργητικών μεθόδων. Οι Nielsen et al. (2002a) διαπίστωσαν πολύ χαμηλή συμφωνία των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας κοπράνων σε δύο διαφορετικά υποστρώματα, το HEYM και το Lowenstein Jensen (LJ). Ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν μεγαλύτερος στο HEYM παρά στο LJ ενώ πρωτίτερα οι Juste et al. (1991) είχαν καταλήξει στο ακριβώς αντίθετο συμπέρασμα.

Η επιδείνωση και εξάπλωση των παθολογοανατομικών αλλοιώσεων συνήθως σημαίνει και αποτυχία της προστατευτικής κυτταρικής ανοσίας και συχνά συνδυάζεται με την ανάπτυξη χυμικής ανοσολογικής απάντησης (Whittington and Sergeant, 2001; National Research Council, 2003). Οι Clarke et al. (1996) διαπίστωσαν ότι η σχετική Ευ μιας δοκιμής ELISA, που προοριζόταν για τα βοοειδή (Cox et al., 1991), ως προς την ιστοπαθολογική εξέταση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε φυσικά προσβεβλημένα πρόβατα που είχαν τη λεπρωματώδη παρά τη φυματιώδη μορφή αλλοιώσεων (86,4 και 10% αντίστοιχα). Ομοίως, οι Sergeant et al. (2003) διαπίστωσαν ότι η σχετική Ευ της προαναφερθείσας ELISA προς την ιστοπαθολογική εξέταση ήταν μεγαλύτερη στα πρόβατα που είχαν τη λεπρωματώδη παρά τη φυματιώδη μορφή αλλοιώσεων (65,1 και 32,2%, αντίστοιχα). Στα πρόβατα με τη φυματιώδη μορφή αλλοιώσεων ο αριθμός των μικροοργανισμών είναι μικρός. Αντίθετα η χυμική ανοσολογική απάντηση συνοδεύεται από την εξάπλωση του MAP και την παρουσία μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών, όπως συμβαίνει στα πρόβατα με τη λεπρωματώδη μορφή αλλοιώσεων (Clarke and Little, 1996; Perez et al., 1997). Στις αίγες δεν έχει πραγματοποιηθεί ανάλογος συσχετισμός μεταξύ της μορφής των αλλοιώσεων και της χυμικής ανοσίας. Φαίνεται όμως ότι τα πρόβατα και οι αίγες παρουσιάζουν διαφορετική ευπάθεια στη λοίμωξη από MAP και διαφορετική ανοσολογική απάντηση. Οι Cogra et al. (2000) διαπίστωσαν μικρό αριθμό φυσικά προσβεβλημένων αιγών με εστιακές αλλοιώσεις και υψηλότερο αριθμό αιγών με διάχυτες αλλοιώσεις, σε σύγκριση με ανάλογες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε φυσικά προσβεβλημένα πρόβατα (Perez et al., 1996). Υποστήριξαν ότι το γεγονός αυτό πιθανώς υποδεικνύει τη μειωμένη ικανότητα των αιγών να περιορίζουν τη λοίμωξη. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με την προαναφερθείσα διαφορετική Ευ των ορολογικών δοκιμών ανάλογα με τη μορφή των αλλοιώσεων καθώς και η διαφορετική κατανομή των τύπων των στελεχών μεταξύ αιγών και προβάτων, καταδεικνύει την ανάγκη αξιολόγησης της αξιοπιστίας των ορολογικών δοκιμών χωριστά στα πρόβατα και τις αίγες.

Επιπρόσθετα, όπως προηγούμενα αναφέρθηκε, η επιλογή κσδ για τις ορολογικές δοκιμές (των οποίων η μεταβλητή στόχος είναι συνεχής), εξαρτάται από το κόστος των σφαλμάτων κατάταξης και το πραγματικό ποσοστό προσβολής στον πληθυσμό (Zweig and Campbell, 1993; Greiner et al., 2000). Συνεπώς, η επιλογή κσδ πέραν του είδους του ζώου πιθανώς υπόκεινται σε τροποποιήσεις ανάλογα με το σκοπό της μελέτης και τον υπό μελέτη πληθυσμό. Η επιλογή του κσδ επηρεάζει εκτός από την Ευ και την Ει. Η τελευταία μπορεί να διαφέρει και μεταξύ πληθυσμών και περιοχών με διαφορετική περιβαλλοντική μυκοβακτηριδιακή χλωρίδα (Nielsen et al., 2002a).

Επομένως, είναι προτιμότερη, από την ευθεία αναγωγή εκτιμήσεων που πραγματοποιήθηκαν σε άλλες περιοχές και πληθυσμούς ζώων, η αξιολόγηση της

αξιοπιστίας των διαγνωστικών δοκιμών στις υπό μελέτη περιοχές-πληθυσμούς (Greiner and Gardner, 2000).

Τα μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης, που δεν προϋποθέτουν την ύπαρξη διαγνωστικών δοκιμών αναφοράς για την αξιολόγηση των διαγνωστικών δοκιμών, μόνο πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της Ευ και της Ει μιας ELISA και μιας καλλιέργειας κοπράνων για τη διάγνωση της παραφυματίωσης στα βοοειδή (Nielsen et al., 2002c), αλλά δεν έχουν εφαρμοστεί στην αξιολόγηση διαγνωστικών μεθόδων στα πρόβατα και τις αίγες. Οι εκτιμήσεις των Nielsen et al. (2002c) βασίστηκαν σε ζώα που βρίσκονταν σε όλα τα στάδια της παραφυματίωσης, χωρίς να αποκλείσουν τα κλινικά προσβεβλημένα ζώα, αν και (α) είναι σαφές ότι η χρησιμότητα των διαγνωστικών δοκιμών είναι ιδιαίτερη στον εντοπισμό υποκλινικά και όχι κλινικά προσβεβλημένων ζώων και (β) η Ευ τόσο της καλλιέργειας κοπράνων όσο και των ορολογικών δοκιμών είναι σαφώς μεγαλύτερη στα κλινικά παρά στα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα (National Research Council, 2003).

Η μη τέλεια Ευ και Ει των διαγνωστικών δοκιμών πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη διερεύνηση των επιδημιολογικών συσχετισμών. Η λοίμωξη από MAP μάλλον επηρεάζει αρνητικά τη γονιμότητα των βοοειδών αν και τα ευρήματα της διεθνούς βιβλιογραφίας είναι αντικρουόμενα. Η σχέση αυτή δεν έχει διερευνηθεί στα πρόβατα και τις αίγες. Οι Merkal et al. (1975) διαπίστωσαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό αγονιμότητας σε υποκλινικά προσβεβλημένα βοοειδή που ήταν θετικά στην καλλιέργεια κοπράνων ή την καλλιέργεια τμήματος του ειλεού. Οι Buergelt and Duncan (1978) ανέφεραν συχνότερη εμφάνιση προβλημάτων αγονιμότητας και μαστίτιδας σε υποκλινικά προσβεβλημένες αγελάδες που ήταν θετικές στην καλλιέργεια ιστών ή/και κοπράνων. Οι Abbas et al. (1983) διαπίστωσαν ότι το μεσοδιάστημα τοκετού – τοκετού σε υποκλινικά προσβεβλημένες αγελάδες ήταν 1,73 μήνες μεγαλύτερο σε σχέση με τις υγιείς. Στην πιο πρόσφατη μελέτη, οι Johnson-Ifearulundu et al. (2000) βρήκαν αυξημένο μεσοδιάστημα τοκετού – 1^{ου} οίστρου σε κλινικά υγιείς αγελάδες που ήταν θετικές ή στην ELISA (HerdCheck, IDEXX) ή στην καλλιέργεια κοπράνων. Αντίθετα, οι DeLisle and Milestone (1989) και οι McNab et al. (1991) δε βρήκαν καμία σχέση μεταξύ μεσοδιαστήματος τοκετού – τοκετού και υποκλινικής λοίμωξης από MAP. Τα αντικρουόμενα ευρήματα πιθανώς οφείλονται πέραν του διαφορετικού ορισμού της νόσου και σε σφάλματα των διαγνωστικών δοκιμών, που παραλλάσσουν μεταξύ των μελετών. Εκτός αυτών, στην υπάρχουσα ασυμφωνία πιθανώς συνέβαλε και το γεγονός ότι δε διερευνήθηκε η πιθανή τροποποίηση της σχέσης μεταξύ λοίμωξης με MAP και γονιμότητας ανάλογα με το παραγωγικό στάδιο των ζώων, που είναι πιθανώς σημαντική, αφού οι Nielsen et al. (2002b) διαπίστωσαν ότι τα αποτελέσματα των ορολογικών δοκιμών διαφοροποιούνται ανάλογα με τον αριθμό των πραγματοποιηθέντων τοκετών και το στάδιο της γαλακτοπαραγωγής.

Σκοπός της διατριβής αυτής ήταν η εκτίμηση της αξιοπιστίας μιας ορολογικής δοκιμής και δύο μεθόδων καλλιέργειών κοπράνων, που χρησιμοποιούνται διεθνώς ευρύτατα στη διάγνωση της παραφυματίωσης, σε κλινικά υγιείς αίγες και πρόβατα προσβεβλημένων εκτροφών στην Ελλάδα, με τη χρήση μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης. Οι εκτιμήσεις έγιναν χωριστά για κάθε είδος ζώου. Επιπλέον, διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ γονιμότητας και υποκλινικής λοίμωξης από MAP των αιγών και των προβάτων, ανάλογα με το παραγωγικό στάδιο των ζώων, λαμβάνοντας υπόψη τα σφάλματα κατάταξης της διαγνωστικής διαδικασίας.

1.4. Βιβλιογραφία

1. Abbas, B., Riemann, H.P., Hird, D.W., 1983. Diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in northern California and a note on its economic significance. *Calif. Vet.* 8, 20-24.
2. Agger, J.F., Bartlett, P.C., Woudstra, I., Willeberg, P., Houe, H., Lawson, L. and Enøe, C., 1997. Evaluation of clinical mastitis and somatic cell count as diagnostic tests for surveillance of udder health in dairy herds. *Epidémiologie et Santé Animale* 31/32, 12.07.1–12.07.3.
3. Altare, F., Durandy, A., Lammas, D., Emile, J.F., Lamhamedi, S., Le Deist, F., Drysdale, P., Jouanguy, E., Doffinger, R., Bernaudin, F., Jeppsson, O., Gollob, J.A., Meinel, E., Segal, A.W., Fischer, A., Kumararatne, D., Casanova, J.L., 1998. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science*. 280,1432-1435.
4. Alvarez, J., de Juan, L., Briones, V., Romero, B., Aranaz, A., Fernandez-Garayzabal, J.F., Mateos, A., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fallow deer and wild boar in Spain. *Vet Rec.* 156, 212-213.
5. Ashton, J.J., Moeschberger, M.L., 1988. An SAS macro for estimating the error rates of two diagnostic tests, neither being a gold standard. In: Proceedings of the 13th SAS Users Group International Conference, March 27–30, Orlando, FL, 995–996.
6. Beard, P. M., D. Henderson, M. J. Daniels, A. Pirie, D. Buxton, A. Greig, M. R. Hutchings, I. McKendrick, S. Rhind, K. Stevenson, and J. M. Sharp. 1999. Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). *Vet. Rec.* 145:612–613.
7. Beard, P.M., Daniels, M.J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M.R., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J.M., 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1517-1521.
8. Best, N.G., Cowles, M.K., Vines, S.K., 1995. CODA Manual Version 0.30. MRC Biostatistics Unit, Cambridge, UK.
9. Branscum A.J. , Gardner I.A., Johnson W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modelling. *Prev. Vet. Med.* 68, 145–163.
10. Brenner, H. and Gefeller, O., 1997. Variation of sensitivity, specificity, likelihood ratios and predictive values with disease prevalence. *Statist. Med.* 16, 981–991.
11. Buergelt, C. D., and P. Ginn. 1999. The histopathological diagnosis of early Johne's disease in North American bison (*Bison bison*), p. 395–399. In E. J. B. Manning and M. T. Collins (ed.), Proceedings of the Sixth International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wis.
12. Buergelt, C.D., Duncan, J.R., 1978. Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173, 478-480
13. Chi, J., VanLeeuwen, J.A., Weersink, A., Keefe, G.P., 2002. Management factors related to seroprevalences to bovine viral-diarrhoea virus, bovine-leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in dairy herds in the Canadian Maritimes. *Prev. Vet. Med.* 55, 57-68.
14. Chiodini, R. J., Vankruiningen, H. J., 1983. Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182:168–169.
15. Chiodini, R.J., 1996. Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 313-343.
16. Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74, 218-262.
17. Chriel, M. and Willeberg, P., 1997. Dependency between sensitivity, specificity and prevalence analysed by means of Gibbs sampling. *Epidémiologie et Santé Animale* 31/32, 12.03.1–12.03.3.
18. Clarke, C.J., 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116, 217-261.
19. Clarke, C.J., Little, D., 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.* 114, 419-437.
20. Clarke, C.J., Patterson, I.A., Armstrong, K.E., Low, J.C., 1996. Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *Vet Rec.* 139, 618-621.

21. Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridisation. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591–1596.
22. Collins, M.T., Sockett, D.C., 1993. Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc.* 203, 1456-1463.
23. Corpa, J.M., Garrido, J., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255-265.
24. Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J., 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis using IS900 RFLP. *Aus. Vet.* 78, 184-190.
25. Coussens, P.M., 2001. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim Health Res. Rev.* 2, 141-161.
26. Coussens, P.M., 2004. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in cattle. *Infect Immun.* 72, 3089-3096.
27. de Bock, G.H., Houwing-Duistermaat, J.J., Springer, M.P., Kievit, J. and van Houwelingen, J.C., 1994. Sensitivity and specificity of diagnostic tests in acute maxillary sinusitis determined by maximum likelihood in the absence of an external standard. *J. Clin. Epidemiol.* 47, 1343–1352.
28. de Juan L., Mateos, A., Dominguez, L., Sharp, J.M., Stevenson, K., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Mic.* 106, 249-257.
29. De Lisle, G.W., Collins, D.M., Huchzermeyer, H.F., 1992. Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Onderstepoort J Vet. Res.* 59, 163-165.
30. DeLisle, G.W., Milestone, B.A., 1989. The economic impact of Johne's disease in New Zealand. In: Milner, A.R., Wood, P.R. (Eds.), *Johne's Disease, Current Trends in Research, Diagnosis and Management.* CSIRO, Victoria, Australia, pp. 41-45.
31. Dempster, A., Laird, N. and Rubin, D., 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B* 39, 1–38.
32. Dendukuri, N., Joseph, L., 2001. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics* 57, 158–167.
33. Dubash, K., Shulaw, W.P., Bech-Nielsen, S., Stills, H.F.Jr., Slemmons, R.D., 1995. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay licensed by the USDA for use in cattle for diagnosis of ovine paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 347-351.
34. Enoe C., Andersen S., Sorensen V., Willeberg P., 2001. Estimation of sensitivity, specificity and predictive values of two serologic tests for the detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in the absence of a reference test (gold standard). *Prev. Vet. Med.* 51, 227-243.
35. Enoe C., Christensen G., Andersen S., Willeberg P., 2003. The need for built-in validation of surveillance data so that changes in diagnostic performance of post-mortem meat inspection can be detected. *Prev. Vet. Med.* 57, 117-125.
36. Enøe, C., Andersen, S., Thomsen, L.K., Mousing, J., Leontides, L., Sørensen, V. and Willeberg, P., 1997. Estimation of the sensitivity and the specificity of two diagnostic tests for the detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in pigs by maximum-likelihood-estimation and Gibbs sampling. *Epidémiologie et Santé Animale* 31/32, p. 12.C.34.
37. Enøe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease status is unknown. *Prev. Vet. Med.* 45, 61–81.
38. Faraone, S.V. and Tsuang, M.T., 1994. Measuring diagnostic accuracy in the absence of a gold standard. *Am. J. Psychiatr.* 151, 650–657.
39. Faraone, S.V., Blehar, M., Pepple, J., Moldin, S.O., Norton, J., Nurnberger, J.I., Malaspina, D., Kaufmann, C.A., Reich, T., Cloninger, C.R., DePaulo, J.R., Berg, K., Gershon, E.S., Kirch, D.G. and Tsuang, M.T., 1996. Diagnostic accuracy and confusability analyses: an application to the diagnostic interview for genetic studies. *Psychol. Med.* 26, 401–410.
40. Florou, M., Leontides, L., Kostoulas, P., Billinis, C., Sofia, M., 2005. Evidence of paratuberculosis infection in nonruminant wildlife in Greece. *Proceedings of the 8th International*

- Colloquium of Paratuberculosis, Providence: International Association for Paratuberculosis, pp. 134.
41. Gardner I.A., 1995. Diagnostic Testing. Nordic Society of Veterinary Epidemiology Symposium, September 28/29, Askov, Compendium.
 42. Gardner I.A., 2002. The utility of Bayes' theorem and Bayesian inference in veterinary clinical practice and research. *Aust. Vet. J.* 80, 758-761.
 43. Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev. Vet. Med.* 45, 107-122.
 44. Gart, J.J. and Buck, A.A., 1966. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. II. A probabilistic model for the comparison of diagnostic tests. *Am. J. Epidemiol.* 83, 593-602.
 45. Gastwirth, J.L., Johnson, W.O. and Reneau, D.M., 1991. Bayesian analysis of screening data: application to AIDS in blood donors. *Can. J. Statist.* 19, 135-150.
 46. Geisser, S. and Johnson, W.O., 1992. Optimal administration of dual screening tests for detecting a characteristic with special reference to low prevalence diseases. *Biometrics* 48, 839-852.
 47. Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Stat. Sci.* 7, 457-511.
 48. Georgiadis, M.P., Gardner, I.A. and Hedrick, R.P., 1998. Field evaluation of sensitivity and specificity of a polymerase chain reaction (PCR) for detection of *N. salmonis* in rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health* 10, 372-380.
 49. Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., Gardner, I.A., Singh, R., 2003. Correlation-adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Appl. Stat.* 52, 63-76.
 50. Greig, A., K. Stevenson, V. Perez, A. A. Pirie, J. M. Grant, and J. M. Sharp. 1997. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Rec.* 140:141-143.
 51. Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M.E. 2nd, McKendrick, I., Sharp, J.M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1746-1751.
 52. Greiner, M. and Gardner, I.A., 2000. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45, 3-22.
 53. Greiner, M., Pfeiffer, D., Smith, R.D., 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45, 23-41.
 54. Hadgu, A. and Qu, Y., 1998. A biomedical application of latent class models with random effects. *Appl. Statist.* 47, 603-616.
 55. Hagan, W. A., 1938. Age as a factor in susceptibility to Johne's disease. *Cornell Veterinarian* 28, 34-40.
 56. Hanley, J.A. and McNeil, B.J., 1983. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 148, 839-843.
 57. Harris, N.B., Barletta, R.G., 2001. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol Rev.* 14, 489-512.
 58. Henderson, A.R., 1993. Assessing test accuracy and its clinical consequences — a primer for receiver operating characteristic curve analysis. *Ann. Clin. Biochem.* 30, 521-539.
 59. Hilbink, F., West, D.M., de Lisle, G.W., Kittelberger, R., Hosie, B.D., Hutton, J., Cooke, M.M., Penrose, M., 1994. Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet Microbiol.* 41, 107-116.
 60. Homuth, M., Valentin-Weigand, P., Rohde, M., Gerlach, G.F., 1998. Identification and characterization of a novel extracellular ferric reductase from Mycobacterium paratuberculosis. *Infect. Immun.* 66, 710-716.
 61. Hope, A.F., Kluver, P.F., Jones, S.L., Condron, R.J., 2001. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J.* 78, 850-856.
 62. Huda, A., Jungersen, G., Lind, P., 2004. Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 104, 43-53.
 63. Huda, A., Lind, P., Christoffersen, A.B., Jungersen, G., 2003. Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN-gamma) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 94, 95-103.

64. Hui, S.L., Walter, S.D., 1980. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 36, 167–171.
65. Jessup, D. A., B. Abbas, D. Behymer, and P. Gogan. 1981. Para-tuberculosis in tule elk in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179:1252–1254.
66. Johne, H. A. and Frothingham, L., 1895. Ein eigenthuemlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. *Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und Pathologie.* 21, 438-454.
67. Johnson, W.O. and Gastwirth, J.L., 1991. Bayesian inference for medical screening tests: approximations useful for the analysis of acquired immune deficiency syndrome. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B* 53, 427–439.
68. Johnson, W.O. and Pearson, L.M., 1999. Dual screening. *Biometrics* 55, 276–282.
69. Johnson, W.O., Gastwirth, J.L., Pearson, L.M., 2001. Screening without a gold standard: the Hui-Walter paradigm revisited. *Am. J. Epidemiol.* 153, 921-924.
70. Johnson-Ifearulundu, Y., Kaneene, J.B., 1999. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Am. J. Vet. Res.* 60, 589-596.
71. Johnson-Ifearulundu, Y.J., Kaneene, J.B., Sprecher, D.J., Gardiner, J.C., Lloyd, J.W., 2000. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 46, 171-181.
72. Joseph, L., Gyorkos, T.W., Coupal, L., 1995. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am J Epidemiol.* 141, 263-272.
73. Juste, R.A., Marco, J.C., Saez de Ocariz, C. and Aduriz, J.J., 1991. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 28, 385–390.
74. Kennedy, D.J., Benedictus, G., 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci Tech.* 20, 151-179.
75. Kopecky, K.E., 1977. Distribution of paratuberculosis in Wisconsin, by soil regions. *J Am. Vet. Med. Assoc.* 170, 320-324.
76. Kraemer, H.C., 1992. *Evaluating Medical Tests — Objective and Quantitative Guidelines.* Sage, Newbury Park.
77. Larsen, A.B., Merkal, R.S., Vardaman, T.H., 1956. Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 17, 549-551.
78. Leontides, S., Tomopoulos, D., Christopoulos, C., Tsangaris, T., Exarchopoulos, G., 1975. Paratuberculosis (Johne's disease) in goats in Greece. *Proc. XXth World Veterinary Congress (W.V.C.), Thessaloniki – Greece, Vol 2, pp 1426-1428.*
79. Lepper, A.W., Wilks, C.R., Kotiw, M., Whitehead, J.T., Swart, K.S., 1989. Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. *Aust. Vet. J* 66, 50-55.
80. Line, B.R., Peters, T.L. and Keenan, J., 1997. Diagnostic test comparisons in patients with deep venous thrombosis. *J. Nucl. Med.* 38, 89–92.
81. Lovell, R., Levi, M., Francis J., 1954. Studies on the survival of Johne's bacilli. *J. Comp. Path.* 54, 120-129.
82. Machackova, M., Lamka, J., Ayele, W.Y., Parmova, I., Svastova, P., Amemori, T., Pavlik, I., 2003. Infection of ruminants by uncultivable strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Czech Republic. In: *Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain, 191–196.*
83. Mahoney, W.J., Szatmari, P., Maclean, J.E., Bryson, S.E., Bartolucci, G., Walter, S.D., Marshall, B.J. and Zwaigenbaum, L., 1998. Reliability and accuracy of differentiating pervasive developmental disorder subtypes. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psych.* 37, 278–285.
84. Martin, S.W., Meek, A.H., Willeberg, P., 1987. *Veterinary Epidemiology: Principles and Methods.* 1st edition, Iowa State University Press, Ames.
85. McClish, D. and Quade, D., 1985. Improving estimates of prevalence by repeated testing. *Biometrics* 41, 81–89.
86. McClure, H. M., R. J. Chiodini, D. C. Anderson, R. B. Swenson, W. R. Thayer, and J. A. Coutu. 1987. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *J. Infect. Dis.* 155:1011–1019.

87. McDermott, J., Drews, C., Green, D. and Berg, C., 1997. Evaluation of prenatal care information on birth certificates. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 11, 105–121.
88. McNab, W.B., Meek, A.H., Duncan, J.R., Brooks, B.W., Van Dreumel, A.A., Martin, S.W., Nielsen, K.H., Sugden, E.A., Turcotte C., 1991. An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Can. J. Vet. Res.* 55, 252-259.
89. Mendoza-Blanco, J., Tu, X. and Iyengar, S., 1996. Bayesian inference on prevalence using a missing-data approach with simulation-based techniques: applications to HIV screening. *Statist. Med.* 15, 2161–2176.
90. Merkal, R.S., Larsen, A.B., Booth, G.D., 1975. Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 36, 837-838.
91. Michel, A.L., Bastianello, S.S., 2000. Paratuberculosis in sheep: an emerging disease in South Africa. *Vet. Microbiol* 77, 299-307.
92. Momotani, E., Whipple, D.L., Thiermann, A.B., Cheville, N.F., 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of Mycobacterium paratuberculosis into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Path.* 25, 131-137.
93. National Research Council, 2003. Diagnosis and control of Johne's disease. The National Academies Press, Washington, D.C.
94. Nielsen, S.S., 2002a. Paratuberculosis in Danish dairy cattle – Interpretation of diagnostic information depending on purpose and disease stage. PhD Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, pp. 138.
95. Nielsen, S.S., Grohn, Y.T., Enevoldsen, C., 2002b. Variation of the milk antibody response to paratuberculosis in naturally infected dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85, 2795-2802.
96. Nielsen, S.S., Grønbaek, C., Agger, J.F., Houe, H., 2002c. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 53, 191–204.
97. Ntzoufras I., 1999. PhD Thesis.
98. Obuchowski, N.A., 1994. Computing sample size for receiver operating characteristic studies. *Invest. Radiol.* 29, 238–243.
99. Obuchowski, N.A., 1997. Testing for equivalence of diagnostic tests. *Am. J. Roentgenol.* 168, 13–17.
100. Perez, V., Garcia Marin, J.F., Badiola, J.J., 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114, 107-122.
101. Perez, V., Tellechea, J., Badiola, J.J., Gutierrez, M., Garcia Marin, J.F., 1997. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res.* 58, 799-803.
102. Qu, Y. and Hadgu, A., 1998. A model for evaluating sensitivity and specificity for correlated diagnostic tests in efficacy studies with an imperfect reference test. *J. Am. Statist. Assoc.* 93, 920–928.
103. Qu, Y., Tan, M. and Kutner, M.H., 1996. Random effects models in latent class analysis for evaluating accuracy of diagnostic tests. *Biometrics* 52, 797–810.
104. Raftery, A.L., Lewis, S., 1992. Comment: one long run with diagnostics: implementation strategies for Markov chain Monte Carlo. *Stat. Sci.* 7, 493–497.
105. Rajukumar, K., Tripathi, B.N., Kurade, N.P., Parihar, N.S., 2001. An enzyme-linked immunosorbent assay using immunoaffinity-purified antigen in the diagnosis of caprine paratuberculosis and its comparison with conventional ELISA's. *Vet. Res. Comm.* 25, 539-553.
106. Rankin, J.D., 1962. The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johne*. IV. Adult cattle maintained in an infectious environment. *J. Comp. Path.*, 71, 113-117.
107. Reddacliff, L.A., Vadali, A., Whittington, R.J., 2003. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolated from tissues and faeces. *Vet. Microbiol.* 95, 271-282.
108. Reviriego, F.J., Moreno, M.A., Dominguez, L., 2000. Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. *Prev. Vet. Med.* 43, 43-51.
109. Ridge, S.E., Morgan, I.R., Sockett, D.C., Collins, M.T., Condron, R.J., Skilbeck, N.W., Webber, J.J., 1991. Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J.* 68, 253-257.

110. Rienmann, H., Zaman, M.R., Ruppner, R., Aalund, O., Jorgensen, J.B., Worsaae, H., Behymer, D., 1979. Paratuberculosis in cattle and free-living exotic deer. *J Am. Vet. Med. Assoc.* 174, 841-843.
111. Ris, D.R., Hamel, K.L., Weaver, A.M., 1988. Natural transmission of Johne's disease to feral goats. *N. Z. Vet. J* 36, 98-99.
112. Rogan, W.J., Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 107, 71-76.
113. Rohde, R.F., Shulaw, W.P., 1990. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. *J Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 1482-1483.
114. Rybicki, B.A., Peterson, E.L., Johnson, C.C., Kortsha, G.X., Cleary, W.M. and Gorell, J.M., 1998. Intra- and inter-rater agreement in the assessment of occupational exposure to metals. *Int. J. Epidemiol.* 27, 269-273.
115. Saxegaard, F., 1990. Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* 102, 149-156.
116. Schulzer, M., 1994. Diagnostic tests: a statistical review. *Muscle Nerve* 17, 815-819.
117. Secott, T.E., Lin, T.L., Wu, C.C., 2001. Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 69, 2075-2082.
118. Seitz, S.E., Heider, L.E., Heuston, W.D., Bech-Nielsen, S., Rings, D.M., Spangler, L., 1989. Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194, 1423-1426.
119. Sergeant, E.S., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C., Whittington, R.J., 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61, 235-248.
120. Sharp, J. M., K. Stevenson, J. A. Challans, C. Ramage, D. Hitchcock, and H. W. Reid. 1995. Mycobacterial infections of free living deer in Scotland, p. 180-182. *In* R. J. Chiodini, M. E. Hines, and M. T. Collins (ed.), *Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wis.
121. Shaw, P.C., van Romunde, L.K.J., Griffion, G., Janssens, A.R., Kreuning, J. and Eilers, G.A.M., 1987. Peptic ulcer and gastric carcinoma: diagnosis with biphasic radiography compared with fiberoptic endoscopy. *Radiology* 163, 39-42.
122. Sigurethardottir, O.G., Valheim, M., Press, C.M., 2004. Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 819-834.
123. Sinclair, M.D. and Gastwirth, J.L., 1996. On procedures for evaluating the effectiveness of reinterview survey methods: application to labor force data. *J. Am. Statist. Assoc.* 91, 961-969.
124. Singer, R.S., Boyce, W.M., Gardner, I.A., Johnson, W.O. and Fisher, A.S., 1998. Evaluation of bluetongue virus diagnostic tests in free-ranging bighorn sheep. *Prev. Vet. Med.* 35, 265-282.
125. Smith, R. and Slenning, B., 2000. Decision analysis — dealing with uncertainty in diagnostic testing. *Prev. Vet. Med.* 45, pp. 139-162
126. Smith, R.D., 1995. Evaluation of diagnostic tests. In: *Veterinary Clinical Epidemiology. A Problem-Oriented Approach*. CRC Press, Boca Raton, FL, 31-43.
127. Snow, J., 1855. On the mode of communication of Cholera. Churchill, London, pp. 139. (<http://www.ph.ucla.edu/epi/snow/snowbook.html>)
128. Sockett, C.D., Conrad, A.T., Thomas, B.C., Collins, T.M., 1992. Evaluation of Four Serological Tests for Bovine Paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1134-1139.
129. Sørensen, V., Barfod, K., Feld, N.C., Nielsen, J.P., Enøe, C. and Willeberg, P., 1997. Evaluation of a polyclonal blocking ELISA and a complement fixation test detecting antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in pig serum. *Epidémiologie et Santé Animale* 31/32, p. 12.C.43.
130. Spangler, E., Bech-Nielsen, S. and Heider, L.E., 1992. Diagnostic performance of two tests and fecal culture for subclinical paratuberculosis and associations with production. *Prev. Vet. Med.* 13, 185-195.
131. Spiegelhalter, D. J., Best, N. G., Carlin, B. P., van der Linde, A., 2002. Bayesian measures of model complexity and fit (with discussion). *J. Roy. Statist. Soc. B.* 64, 583-640.

132. Spiegelhalter, D., Thomas, A., Best, N., Gilks W., 1996. BUGS: Bayesian Inference Using Gibbs Sampling, Version 0.50. MRC Biostatistics Unit, Cambridge. <http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>
133. Spiegelhalter, D., Thomas, A., Best, N., Lunn D., 2003. WinBUGS version 1.4.1 User's manual. <http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs>
134. Stabel, J.R., 2000. Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 61, 754-760.
135. Staquet, M., Rozenzweig, M., Lee, Y.J., Muggia, F.M., 1981. Methodology for the assessment of new dichotomous diagnostic tests. *J. Chronol. Dis.* 34, 599-610.
136. Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
137. Streeter, R.N., Hoffsis, G.F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W.P., Rings, D.M., 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* 56, 1322-1324.
138. Sweeney, R.W., 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* 12, 305-312.
139. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L., Spencer, P.A., 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 488-493.
140. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Hamir, A.N., Rosenberger, A.E., Herr, S.A., 1992. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1312-1314.
141. Swets, J.A., 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240, 1285-1293.
142. Tanner, M.A., 1996. Tools for Statistical Inference: Methods for the Exploration of Posterior Distributions and Likelihood Functions, 3rd Edition. Springer, New York, 207
143. Thoen, C.O., Jarnagin, J.L., Richards, W.D., 1975. Isolation and identification of mycobacteria from porcine tissues: a three-year summary. *Am. J. Vet. Res.* 36, 1383-1386.
144. Thomas, G.W., 1983. Paratuberculosis in a large goat herd. *Vet. Rec.* 113, 464-466.
145. Thoresen, O.F., Olsaker, I., 1994. Distribution and hybridization patterns of the insertion element IS900 in clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 293-303.
146. Thrusfield M.V., 1986. *Veterinary Epidemiology*. 1st edition, Butterworths, London, 280.
147. Toft, N., Jørgensen, E., Højsgaard, S., 2005. Diagnosing diagnostic tests: evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. *Prev. Vet. Med.* 68, 19-33.
148. Toma, B., Vaillancourt, J. P., Dufour, B., Eloit, M., Moutou, F., Marsh, W., Benet, J. J., Sanaa, M., Michel, P., (Eds.), 1999. *Dictionary of Veterinary Epidemiology*. 1st Edition, Iowa State University Press, Ames, IA.
149. Torrance-Rynard, V.L. and Walter, S.D., 1997. Effects of dependent errors in the assessment of diagnostic test performance. *Statist. Med.* 16, 2157-2175.
150. Twort, F.W. and Ingram, G.L.Y., 1912. A method for isolating and cultivating *Mycobacterium euteridis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovines. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B.* 84, 517-542.
151. Vacek, P.M., 1985. The effect of conditional dependence on the evaluation of diagnostic tests. *Biometrics* 41, 959-968.
152. Valentin-Weigand, P., Goethe, R., 1999. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes Infect.* 1, 1121-1127.
153. van Ulsen, J., Michel, M.F., van Strick, R., van Eijk, R.V.W., van Joost, T. and Stolz, E., 1986. Experience with a modified solid-phase enzyme immunoassay for detection of gonorrhoea in prostitutes. *Sex. Transm. Dis.* 13, 1-4.
154. Walter S.D. and Irwig L.M., 1988. Estimation of test error rates, disease prevalence and relative risk from misclassified data: a review. *J. Clin. Microbiol.* 41, 923-937.
155. Walter, S.D., Frommer, D.J. and Cook, R.J., 1991. The estimation of sensitivity and specificity in colorectal cancer screening methods. *Cancer Detec. Prev.* 15, 465-469.

156. Weng, T.S., 1996. Evaluation of a new diagnostic test against a reference test less than perfect in accuracy. *Commun. Statist. Simul. Comput.* 35, 533–555.
157. Whipple, D.L., Kapke, P., Vary, C., 1990. Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2561–2564.
158. Whitlock, R.H., Buergelt, C., 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 12, 345-356.
159. Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol.* 77, 387-398.
160. Whittington, R., Marsh, I., Choy, E., Cousins, D., 1998. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cel. Prob.* 12, 349-358.
161. Whittington, R.J., Eamens, G.J., Cousins, D.V., 2003. Specificity of absorbed ELISA and agar gel immuno-diffusion tests for paratuberculosis in goats with observations about use of these tests in infected goats. *Aust. Vet J.* 81, 71-75.
162. Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., Marsh, I., 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Micr.* 38, 3240-3248.
163. Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall D.J., Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1077–1083.
164. Whittington, R.J., Sergeant, E.S., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations. *Aus. Vet.* 79, 267-278.
165. Willeberg, P., Wedam, J.M., Gardner, I.A., Holmes, J.C., Mousing, J.A., Kyrval, J., Enøe, C., Andersen, S. and Leontides, L., 1997. A comparative study of visual and traditional post-mortem inspection of slaughter pigs: estimation of sensitivity, specificity and differences in non-detection rates. *Epidémiologie et Santé Animale* 31/32, 04.20.1–04.20.3.
166. Williams, E. S., T. R. Spraker, and G. G. Schoonveld. 1979. Paratuberculosis (Johne's disease) in bighorn sheep and a rocky mountain goat in Colorado. *J. Wild. Dis.* 15:221–227.
167. Xenos, G., Christopoulos, C., Psychas, V., Leontides, S., Mitliangas, P., Magoutas, P., 1984. Paratuberculosis in sheep and goats in certain regions of northern and central Greece. *Agriculture. Paratuberculosis, diagnostic methods, their practical application and experience with vaccination. Commisio of the Wuropean communities*, 113-121.
168. Youden, D., 1950. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 3, 32–35.
169. Zurbrick, B.G., Czuprynski, C.J., 1987. Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* 55, 1588-1593.
170. Zweig, M.H. and Campbell, G., 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots — a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 39, 561–577.
171. Zweig, M.H., 1993. ROC plots display test accuracy, but are still limited by the study design. *Clin. Chem.* 39, 1345–1346.
172. Λεοντίδης Σ., 1988. Παραφυματίωση των προβάτων και των αγών. Υπουργείο Γεωργίας, Κτηνιατρικό Ινστιτούτο Θεσσαλονίκης.
173. Σμοκοβίτης Α., 1970. Επιζωοτιολογική μελέτη νόσων των Αγροτικών ζώων εν Ελλάδα. Σελ. 486, Θεσσαλονίκη.

Κεφάλαιο 2

Η κατά Bayes εκτίμηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας μιας ορολογικής δοκιμής τύπου ELISA και μιας μεθόδου καλλιέργειας κοπράνων για τη διάγνωση της παραφυματίωσης σε πρόβατα και αίγες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης στην Ελλάδα

Π. Κωστούλας¹, Λ. Λεοντίδης¹, C. Επθε², X. Μπιλλίνης³, Μ. Φλώρου¹, Μ. Σοφία¹

¹Εργαστήριο Επιδημιολογίας, Βιοστατιστικής και Οικονομίας Ζωικής Παραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 43100 Καρδίτσα, Ελλάδα.

²The National Committee for Pig Production, Danish Bacon and Meat Council, Axelborg, Axeltorv 3, DK-1609, Copenhagen V, Denmark.

³Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 43100 Καρδίτσα, Ελλάδα.

Έγινε δεκτό για δημοσίευση στο περιοδικό Preventive Veterinary Medicine

2.1. Περίληψη

Για την εκτίμηση της ευαισθησίας (Ευ) και της ειδικότητας (Ει) μιας ορολογικής δοκιμής τύπου ELISA και μιας μεθόδου καλλιέργειας κοπράνων (ΚΚ) για τη διάγνωση της παραφυματίωσης, χωριστά σε κλινικά υγιή πρόβατα και αίγες προσβεβλημένων εκτροφών, εφαρμόσαμε μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης. Χρησιμοποιήθηκε η κατά Bayes μεθοδολογία επίλυσης. Η πιθανότητα της υπό συνθήκη εξάρτησης των διαγνωστικών δοκιμών διερευνήθηκε μέσω της σύγκρισης μοντέλων που υπέθεταν την ανεξαρτησία με μοντέλα που ελάμβαναν υπόψη την εξάρτηση των διαγνωστικών δοκιμών μεταξύ των υγιών και των προσβεβλημένων ζώων. Διενεργήθηκε, επίσης, ανάλυση των καμπυλών ROC για την ELISA και επιλέχθηκαν βέλτιστα κρίσιμα σημεία διάκρισης (κ.σ.δ.) με βάση το σχετικό κόστος των σφαλμάτων κατάταξης της ELISA στα προσβεβλημένα και τα υγιή ζώα, για κάθε είδος ζώου.

Δεν διαπιστώθηκε εξάρτηση μεταξύ των Ευ ή των Ει των διαγνωστικών δοκιμών. Υποθέτοντας την υπό συνθήκη ανεξαρτησία τους, οι διάμεσες τιμές και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας για τις $E_{U_{ELISA}}$, $E_{I_{ELISA}}$, $E_{U_{ΚΚ}}$ και $E_{I_{ΚΚ}}$, ήταν 62,5% (42,3-92,8%), 95,0% (90,2-98,0%), 7,9 % (2,0-17,3%) και 98,0 (95,0-99,7%) στις αίγες, και 37,3% (10,2-80,0%), 96,6% (93,2-98,7%), 15,8% (1,9-47,8%) και 97,3% (94,5-99,4%) στα πρόβατα. Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη ROC υπολογίστηκε 0,702 στα πρόβατα και 0,847 στις αίγες. Για την ELISA, η επιλογή του κ.σ.δ. πρέπει να γίνεται με βάση το είδος του ζώου αλλά και το σκοπό της μελέτης. Για παράδειγμα, όταν το πραγματικό ποσοστό προσβολής είναι 20%, θεωρώντας ίσο ή πενταπλάσιο το κόστος του ψευδώς αρνητικού σε σχέση με το κόστος του ψευδώς θετικού αποτελέσματος της ELISA, το κ.σ.δ. ήταν 0,3 ή 0,05 στα πρόβατα και 0,6 ή 0,1 στις αίγες, αντίστοιχα. Η συνολική διακριτική ικανότητα της ELISA ήταν καλύτερη στις αίγες απ' ό,τι στα πρόβατα. Η μείωση του κ.σ.δ. βελτίωσε την $E_{U_{ELISA}}$ χωρίς να μειώσει σημαντικά την $E_{I_{ELISA}}$ και στα δύο είδη ζώων.

Λέξεις-κλειδιά: παραφυματίωση, ELISA, καλλιέργεια κοπράνων, μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης, μεθοδολογία κατά Bayes, ανάλυση καμπυλών ROC, αίγες, πρόβατα.

2.2. Εισαγωγή

Ο επιτυχής έλεγχος και η εκρίζωση της παραφυματίωσης έχουν, κατά ένα μεγάλο μέρος, εμποδιστεί από την έλλειψη διαγνωστικών δοκιμών ικανών να ανιχνεύσουν ορθά τα υγιή και κυρίως τα προσβεβλημένα ζώα κατά τα αρχικά στάδια της λοίμωξης (National Research Council, 2003). Προηγούμενες εκτιμήσεις της Ευ και Ει της ELISA στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες (Collins et al., 1991; Ridge et al., 1991; McNab et al., 1991; Sweeney et al., 1995), τα πρόβατα (Hilbink et al., 1994; Dubash et al., 1995; Clarke et al., 1996; Hope et al., 2001; Sergeant et al., 2003), τις αίγες (Molina et al., 1991; Rajukumar et al., 2001) και σε μεικτά κοπάδια προβάτων και αιγών (Munjaj et al., 2004), καθώς και των μεθόδων καλλιέργειας κοπράνων (ΚΚ) στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες (Whitlock et al., 2000; Sockett et al., 1992), στηρίχθηκαν στην επιβεβαίωση της λοίμωξης από MAP μέσω της ιστοπαθολογικής εξέτασης ή του θετικού αποτελέσματος στην καλλιέργεια ιστών ή κοπράνων, ή του επαναλαμβανόμενα θετικού αποτελέσματος στην ΚΚ. Εντούτοις, αυτές οι δοκιμές αναφοράς δεν είναι αλάνθαστες και δεν ανιχνεύουν επιτυχώς όλες τις λανθάνουσες μορφές της λοίμωξης (Nielsen et al., 2002). Η λοίμωξη δεν μπορεί πάντα να ανιχνευθεί επειδή (α) στις περιπτώσεις της ιστοπαθολογικής εξέτασης και της καλλιέργειας ιστών τα μυκοβακτηρίδια μπορεί να μην έχουν προκαλέσει ακόμα ανιχνεύσιμες παθολογοανατομικές αλλοιώσεις (Whittington et al., 1999), και (β) στην περίπτωση της ΚΚ, η απέκκριση δε λαμβάνει χώρα κατά το αρχικό στάδιο της λοίμωξης, ενώ στα μεταγενέστερα στάδια η απέκκριση μπορεί να είναι διαλείπουσα ή να κατανέμεται ανομοιόμορφα στη μάζα των κοπράνων (Whittington και Sergeant, 2001). Επιπλέον, στην πραγματικότητα, οι υπάρχουσες σχετικές εκτιμήσεις Ευ και Ει δεν είναι πάντα άμεσα συγκρίσιμες, δεδομένου ότι σε πολλές περιπτώσεις οι διαγνωστικές δοκιμές αναφοράς και οι υπό μελέτη διαγνωστικές δοκιμές μετρούσαν διαφορετικά πράγματα. Για παράδειγμα, η ιστοπαθολογική εξέταση ανιχνεύει αλλοιώσεις ή την ενδοκυτταρική παρουσία μυκοβακτηριδίων, ενώ η ΚΚ ανιχνεύει την απέκκριση του μικροοργανισμού.

Μια εναλλακτική προσέγγιση στην εκτίμηση της αξιοπιστίας των διαγνωστικών δοκιμών αποτελούν τα μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης. Η χρήση της μεθοδολογίας αυτής προϋποθέτει την ταυτόχρονη εφαρμογή δύο ή περισσότερων διαγνωστικών δοκιμών σε έναν ή περισσότερους πληθυσμούς. Καμία από τις διαγνωστικές δοκιμές δε θεωρείται δοκιμή αναφοράς. Επομένως, η κατάσταση της υγείας των ζώων αρχικά θεωρείται λανθάνουσα, δηλαδή, αν και υπαρκτή και συγκεκριμένη είναι άγνωστη στον ερευνητή. Επειδή η μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes έχει το πλεονέκτημα της ενσωμάτωσης εκ των προτέρων πληροφοριών για τις προς εκτίμηση παραμέτρους, έχει εφαρμοστεί στα μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης είτε για την περίπτωση της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας (Johnson et al., 2000; Joseph et al., 1995), είτε της υπό συνθήκη εξάρτησης (Dendukuri and Joseph 2001; Georgiadis et al., 2003) των διαγνωστικών δοκιμών, είτε και των δύο περιπτώσεων (Black and Greig, 2002). Μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης εφαρμόστηκαν στον υπολογισμό της Ευ και της Ει μιας ELISA και μιας ΚΚ στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες (Nielsen et al., 2002), αλλά προτιμήθηκε ο προσδιορισμός των λύσεων μεγίστης πιθανοφάνειας και όχι η κατά Bayes μεθοδολογία επίλυσης. Ανάλογες εκτιμήσεις δεν υπάρχουν στα πρόβατα και τις αίγες.

Είναι επαρκώς τεκμηριωμένο ότι η Ευ των διαγνωστικών δοκιμών για την παραφυματίωση εξαρτάται από την κατανομή των σταδίων της λοίμωξης στον πληθυσμό (Collins and Sockett, 1993). Πιθανότατα διαφέρει και η Ει μεταξύ περιοχών με

διαφορετική περιβαλλοντική μυκοβακτηριδιακή γλωρίδα (Nielsen et al., 2002). Επιπλέον, διαφορετικά στελέχη MAP κυριαρχούν στα πρόβατα και τις αίγες (de Juan L. et al., 2005; Stevenson et al., 2002), που μπορεί να είναι διαφορετικής λοιμογόνου δύναμης (Saxegaard, 1990) και, ίσως, να επηρεάζουν την αξιοπιστία των διαγνωστικών δοκιμών. Πρόσφατα, οι Corra et al. (2000) αναφέρθηκαν στην πιθανότητα της διαφορετικής ευπάθειας και της διαφορετικής ανοσολογικής απάντησης μεταξύ αιγών και προβάτων. Τα πρόβεια και μερικά στελέχη αιγών (de Juan L. et al., 2005) έχουν διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης στα τεχνητά υποστρώματα (Collins et al., 1990) και επηρεάζονται, ενδεχομένως, με διαφορετικό τρόπο από τα πρωτόκολλα απομάκρυνσης των επιμολύνσεων σε σχέση με τα στελέχη των βοοειδών (Reddacliff et al., 2003). Κατά συνέπεια, δε θα ήταν φρόνιμο να υιοθετηθούν εκτιμήσεις για την αξιοπιστία των διαγνωστικών δοκιμών που προέρχονται από τα βοοειδή στα πρόβατα και τις αίγες ή να μη διαχωριστούν τα δύο είδη και να τα χειριστούμε ως ενιαίο είδος κατά την αξιολόγηση των διαγνωστικών δοκιμών.

Σε αυτήν τη μελέτη, εφαρμόσαμε μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης και την μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes, για την εκτίμηση της Ευ και της Ει μιας δοκιμής τύπου ELISA και μιας ΚΚ, χωριστά σε πρόβατα και αίγες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης. Διερευνήθηκε, η πιθανότητα υπό συνθήκη εξάρτησης μεταξύ των Ευ και των Ει των δύο διαγνωστικών δοκιμών. Για την ELISA, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των καμπυλών ROC, για να διερευνηθεί η ανάγκη επιλογής ειδικών για το είδος του ζώου και το σκοπό της μελέτης κ.σ.δ.

2.3. Υλικά και μέθοδοι

2.3.1. Ορισμός της λοίμωξης από MAP

Υιοθετήσαμε τον ορισμό της λοίμωξης για την παραφυματίωση όπως διατυπώθηκε από τους Nielsen et al. (2002). Με τον όρο λοίμωξη εννοούμε πως τα πρόβατα ή οι αίγες φέρουν το MAP ενδοκυτταρικά. Η λοίμωξη δε συνεπάγεται απαραίτητα πολλαπλασιασμό σε μεγάλους αριθμούς του μικροοργανισμού, αφού μπορεί να είναι λανθάνουσα. Θεωρούμε, επίσης, πως η «εγκατεστημένη» λοίμωξη έχει ή θα προκαλέσει ανοσολογική απάντηση κάποια χρονική στιγμή της ζωής του ζώου. Εν ολίγοις, υποθέτουμε πως από τη στιγμή που εγκαθίσταται η λοίμωξη, παραμένει εφ' όρου ζωής. Επομένως, με βάση τον ορισμό αυτό, ο ξενιστής θα εμφανίσει απέκκριση του MAP με τα κόπρανα και χυμική ανοσολογική απάντηση.

2.3.2. Υπό μελέτη πληθυσμός

Τέσσερα κοπάδια προβάτων και αιγών, με μέγεθος που κυμαινόταν από 250 έως 350 ζώα, επιλέχθηκαν γι' αυτήν τη μελέτη. Όλα τα κοπάδια είχαν ιστορικό κλινικής παραφυματίωσης και δεν είχαν ποτέ εμβολιαστεί κατά του MAP. Ένα απ' αυτά αποτελείτο από πρόβατα, ένα από αίγες και δύο ήταν μεικτά, με αναλογία προβάτων-αιγών, 60-40% το ένα και 40-60% το άλλο.

2.3.3. Δειγματοληψία

Στοιχεία προερχόμενα από τις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες δείχνουν πως η Ευ της ορολογικής δοκιμής βελτιστοποιείται προς το τέλος της περιόδου γαλακτοπαραγωγής, ενώ η Ει παραμένει σταθερή (Nielsen et al., 2002c). Κατόπιν αυτού, η δειγματοληψία των ζώων έγινε κατά τη διάρκεια του τριμήνου Απριλίου – Μαΐου 2002. Σε κάθε εκτροφή επιλέχθηκαν τυχαία (με λίστα τυχαίων αριθμών από τον υπολογιστή) εκατό κλινικά υγιή ζώα (χωρίς κλινικές εκδηλώσεις ενδεικτικές παραφυματίωσης: χρόνια η διαλείπουσα διάρροια, απώλεια βάρους μη ανταποκρινόμενη σε ανθελμινθική ή αντιμικροβιακή θεραπεία), αφού αποκλείστηκαν ζώα ηλικίας μικρότερης του 1,5 έτους. Η εν δυνάμει ανάπτυξη χυμικής ανοσολογικής απάντησης και απέκκρισης του MAP με τα κόπρανα, όπως προκύπτει από τον ορισμό της λοίμωξης από MAP (2.3.1), αιτιολογεί την επιλογή ζώων μεγαλύτερων αυτής της ηλικίας. Από κάθε επιλεγέν ζώο συλλέχθηκαν περίπου 10 ml. αίματος και 10 γραμμάρια κοπράνων από το απευθυσμένο.

2.3.4. Διαγνωστικές δοκιμές

Τα δείγματα ορών εξετάστηκαν για αντισώματα κατά του MAP με μια ορολογική δοκιμή ELISA του εμπορίου (IDEXX ELISA¹), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Sockett et al., 1992). Κάθε δείγμα κοπράνων ενοφθαλμίστηκε σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν υπόστρωμα Herrold's Egg Yolk, εμπλουτισμένο με μυκοβακτήνη και αντιβιοτικά (Becton Dickinson product code: 222233), μετά από την εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου απομάκρυνσης των επιμολύνσεων που περιγράφηκε σε πρόσφατες μελέτες (Greig et al., 1999). Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 30 εβδομάδες στους 37°C, ενώ κάθε δύο εβδομάδες γινόταν έλεγχος για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Για την επιβεβαίωση του είδους των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν, αποσπάστηκε DNA από τις καλλιέργειες και ελέγχθηκε για την παρουσία της ειδικής του MAP ένθετης ακολουθίας IS900 (Green et al., 1989), βάσει της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

2.3.5. Στατιστική ανάλυση

2.3.5.1 Μοντέλα και έλεγχος υποθέσεων

Για την εκτίμηση των Ευ και Ει της ELISA και της ΚΚ (Ευ_{ELISA}, Ει_{ELISA}, Ευ_{ΚΚ} και Ει_{ΚΚ}, αντίστοιχα), εφαρμόσαμε μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης (Hui and Walter 1980; Walter and Irwig, 1988; Enoe et al., 2000) και επιλέξαμε την κατά Bayes μεθοδολογία επίλυσης (Johnson et al., 2001; Branscum et al., 2005). Οι εκτιμήσεις έγιναν χωριστά στα πρόβατα και τις αίγες.

Οι εκτιμήσεις των Ευ και Ει στηρίχτηκαν στο συνδυασμό των αποτελεσμάτων των δύο διαγνωστικών δοκιμών. Η ορθή χρήση αυτών των μοντέλων προϋποθέτει την ισχύ τριών ουσιαστικών υποθέσεων: (α) Οι διαγνωστικές δοκιμές πρέπει να είναι υπό συνθήκη ανεξάρτητες μεταξύ τους (Gardner et al., 2000), (β) ο πληθυσμός αναφοράς πρέπει να απαρτίζεται από δύο ή περισσότερους υπο-πληθυσμούς με διαφορετικό

¹IDEXX laboratories, Portland, ME

πραγματικό ποσοστό προσβολής, και (γ) μεταξύ των υπο-πληθυσμών αυτών, θα πρέπει να μη διαφέρουν η E_u και η E_i κάθε διαγνωστικής δοκιμής. Η ισχύς των τριών αυτών υποθέσεων ελέγχθηκε ως εξής:

α. Υπό συνθήκη ανεξαρτησίας των διαγνωστικών δοκιμών – Επιλογή μεταξύ του μοντέλου τής υπό συνθήκη ανεξαρτησίας και εξάρτησης

Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας που περιέγραφαν οι Johnson et al. (2001) και το μοντέλο της υπό συνθήκη εξάρτησης που πρότειναν οι Dendukuri and Joseph (2001). Τροποποιήσαμε κατάλληλα τα δύο μοντέλα, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση των δεδομένων μας που προέρχονταν από την ταυτόχρονη εφαρμογή δύο διαγνωστικών δοκιμών σε τρεις υπο-πληθυσμούς (τα μοντέλα για την περίπτωση της ανάλυσης δεδομένων που προέρχονται από την ταυτόχρονη εφαρμογή δύο διαγνωστικών δοκιμών σε δύο υπο-πληθυσμούς, πρόσφατα ανασκοπήθηκαν από τους Branscum et al. (2005)). Για το μοντέλο τής υπό συνθήκη εξάρτησης προτιμήσαμε τη δομή των Dendukuri and Joseph (2001) επειδή ενσωματώνει άμεσα το συντελεστή συνδιακύμανσης των E_u (γ_{Eu}) και των E_i (γ_{Ei}) των δύο διαγνωστικών δοκιμών (Branscum et al., 2005).

Από την εφαρμογή του μοντέλου της υπό συνθήκη εξάρτησης, υπολογίσαμε τους γ_{Eu} και γ_{Ei} και τα αντίστοιχα 95% διαστήματα αξιοπιστίας (δ.α.). Τα δ.α. περιελάμβαναν την τιμή μηδέν. Συνεπώς, η υπόθεση τής υπό συνθήκη ανεξαρτησίας δεν μπορούσε να απορριφθεί (Gardner et al., 2000). Επιπροσθέτως, με τη χρήση του *DIC Tool* στο περιβάλλον του λογισμικού WinBUGS, υπολογίσαμε το κριτήριο απόκλισης (DIC) του μοντέλου από τα δεδομένα, τόσο για το μοντέλο της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας όσο και γι' αυτό της εξάρτησης. Η διαφορά του DIC μεταξύ των δύο μοντέλων ήταν μικρότερη του 2 (0.1 για τα πρόβατα και 1.3 για τις αίγες), πράγμα το οποίο σημαίνει πως τα δύο μοντέλα ταιριάζουν στα δεδομένα εξίσου καλά (Spiegelhalter et al., 2002). Ως εκ τούτου, επελέγη για την ανάλυση το μοντέλο τής υπό συνθήκη ανεξαρτησίας.

β. Υπόθεση της διαφοράς στο πραγματικό ποσοστό προσβολής

Ζητήθηκε από τον εποπτεύοντα κτηνίατρο να κατατάξει τα κοπάδια με βάση το ποσοστό εμφάνισης χρόνιας επαναλαμβανόμενης διάρροιας, που είναι ενδεικτική κλινικής παραφυματίωσης. Με βάση την ταξινόμησή του, σύμφωνα με την οποία το ποσοστό εμφάνισης χρόνιας επαναλαμβανόμενης διάρροιας ήταν 1-2%, 5% και >10%, διαμορφώθηκαν τρεις υπο-πληθυσμοί προβάτων (το κοπάδι των προβάτων και τα πρόβατα που προέρχονταν από τα δύο μεικτά κοπάδια) και τρεις αιγών (το κοπάδι των αιγών και οι αίγες προερχόμενες από τα δύο μεικτά κοπάδια), στους οποίους αναμενόταν το πραγματικό ποσοστό προσβολής από παραφυματίωση να είναι χαμηλό, μέσο και υψηλό, αντίστοιχα.

γ. Υπόθεση της όμοιας E_u και E_i μεταξύ των πληθυσμών

Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης, αναλύσαμε ξεχωριστά όλα τα πιθανά ζευγάρια των υπο-πληθυσμών, επαναλαμβάνοντας, επομένως, την ανάλυση τρεις φορές. Κάθε φορά, η δομή του μοντέλου και οι εκ των προτέρων πληροφορίες που ενσωματώθηκαν σε αυτό ήταν ίδιες με τη δομή και τις εκ των προτέρων πληροφορίες που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση των τριών υπο-πληθυσμών μαζί. Οι εκτιμήσεις της

Ευ και της Ει από τις αναλύσεις όλων των ζευγών δεν διέφεραν από τις εκτιμήσεις από την ανάλυση των τριών υπο-πληθυσμών, οπότε συμπεράναμε ότι η υπόθεση της όμοιας Ευ και Ει μεταξύ των υπο-πληθυσμών ίσχυε, τόσο στα πρόβατα όσο και στις αίγες.

Πίνακας 1. Οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία για την ευαισθησία (Ευ) και την ειδικότητα (Ει) της ELISA και της καλλιέργειας κοπράνων (ΚΚ) για τη διάγνωση της παραφυματίωσης σε βοοειδή, αίγες και πρόβατα.

Αναφορά	Είδος	ELISA	ΚΚ
Collins et al., 1991; Ridge et al., 1991; McNab et al., 1991	Βοοειδή	Ευ ~ 45% Ει >90%	
NielEvn et al., 2002	Βοοειδή	Ευ =27-86%, Ει=55-98%	Ευ=20-73% Ει > 98%
Sockett et al., 1992	Βοοειδή	Ευ=47-65%	Ευ =45-73% Ει > 99%
Sweeney et al., 1995	Βοοειδή	Ευ=15-87%	
Whitlock et al., 2000	Βοοειδή	Ευ=15-75%	Ευ=42% Ει > 99%
Eurgeant et al., 2003	Πρόβατα	Ευ= 25-73%; 10-47% Ει>95%	
Whittington et al., 2003; Hilbink et al., 1994	Πρόβατα	Ει>97%	
Hope et al., 2000	Πρόβατα	Ευ=35-54% Ει=98,2-99,5%	
Dubash et al., 1995	Πρόβατα	Ευ=48% Ει=95%	
Rajukumar et al., 2001	Αίγες	Ευ>75% Ει>90%	
Molina et al., 1991	Αίγες	Ευ>85% Ει>93%	

2.3.5.2. Εκ των προτέρων πληροφορίες

Χρησιμοποιήθηκαν κατανομές βήτα ($B(\alpha, \beta)$) για την ενσωμάτωση εκ των προτέρων πληροφοριών στο μοντέλο για τις προς εκτίμηση παραμέτρους (τις Ευ, τις Ει και το πραγματικό ποσοστό προσβολής σε κάθε υπο-πληθυσμό). Οι ίδιες κατανομές χρησιμοποιήθηκαν για το μοντέλο της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας και εξάρτησης και για τα δύο είδη ζώων.

Για την $E_{U_{ELISA}}$ και την $E_{U_{KK}}$ χρησιμοποιήθηκε μια ομοιόμορφη κατανομή $B(1,1)$ που δεν παρείχε καμία εκ των προτέρων πληροφορία και έδινε ίσες πιθανότητες σε κάθε τιμή από το 0 έως το 1. Με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία για τα βοοειδή, τις αίγες και τα πρόβατα (Πίνακας 1), η πιο πιθανή τιμή για την $E_{I_{ELISA}}$ καθορίστηκε στο

0,95, ενώ ήμασταν 95% βέβαιοι πως ήταν τουλάχιστον 0,90. Η Βη που έχει πιο πιθανή τιμή το 0,95 και 5ο εκατοστημόριο το 0,90, είναι η Βη (100, 5,5). Για την Ε_{IKK}, η πιο πιθανή τιμή θεωρήθηκε πως είναι το 0,98, ενώ ήμασταν 95% βέβαιοι πως ήταν τουλάχιστον 0,95. Αυτά τα στοιχεία αντιστοιχούσαν σε μία Βη (100,2).

Οι πιο πιθανές τιμές για τα πραγματικά ποσοστά προσβολής (Π) στους υπο-πληθυσμούς με χαμηλό, μέτριο και υψηλό Π τέθηκαν στα 3, 25 και 50%, αντίστοιχα, ενώ ήμασταν 95% βέβαιοι ότι δεν υπερέβαιναν τα 10 και 55% στους υπο-πληθυσμούς με χαμηλό και μέτριο Π, αλλά και ότι δεν είναι κάτω από το 30% στον υπο-πληθυσμό με υψηλό Π. Οι κατανομές που αντιστοιχούσαν σε αυτές τις συνθήκες ήταν Βη (2,84, 56,40), Βη (3,09, 7,25), και Βη (8,11, 7,91).

Τέλος, για το μοντέλο τής υπό συνθήκη εξάρτησης, χρησιμοποιήθηκαν ομοιόμορφες κατανομές που έδιναν ίσες πιθανότητες στο σύνολο του εύρους τιμών των γ_{E_D} και γ_{E_I} . Το εύρος τιμών των γ_{E_D} και γ_{E_I} εξ ορισμού εξαρτάται άμεσα από τις τιμές των Ε_υ και Ε_ι. Τα όρια για τους γ_{E_D} και γ_{E_I} είναι $\max(-(1-E_{U_{ELISA}})*(1-E_{U_{KK}}), -E_{U_{ELISA}}*E_{U_{KK}}) \leq \gamma_{E_D} \leq \min(E_{U_{ELISA}}*(1-E_{U_{KK}}), E_{U_{KK}}*(1-E_{U_{ELISA}}))$ και $\max(-(1-E_{I_{ELISA}})*(1-E_{I_{KK}}), -E_{I_{ELISA}}*E_{I_{KK}}) \leq \gamma_{E_I} \leq \min(E_{I_{ELISA}}*(1-E_{I_{KK}}), E_{I_{KK}}*(1-E_{I_{ELISA}}))$, αντίστοιχα (Gardner et al., 2000).

2.3.5.3. Σύγκριση της Ε_υ και της Ε_ι για την ELISA και την ΚΚ μεταξύ αιγών και προβάτων

Προκειμένου να ελέγξουμε αν η Ε_υ_{ELISA} διέφερε μεταξύ προβάτων και αιγών, υπολογίσαμε το $X = E_{U_{ELISA}}(αιγών) - E_{U_{ELISA}}(προβάτων)$. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε τη λειτουργία step του λογισμικού WinBUGS. Σε αυτή τη λειτουργία, ισχύει $\text{step}(X)=1$, αν $X \geq 0$, αλλιώς $\text{step}(X)=0$. Επομένως, ο μέσος όρος του X ήταν η Monte Carlo εκτίμηση της εκ των υστέρων πιθανότητας η Ε_υ_{ELISA} να είναι μεγαλύτερη στις αίγες απ' ό,τι στα πρόβατα. Ομοίως, υπολογίστηκε η αντίστοιχη εκ των υστέρων πιθανότητα για τις Ε_ι_{ELISA}, Ε_υ_{KK} και Ε_ι_{KK}.

2.3.5.4. Ανάλυση ευαισθησίας

Για να αξιολογηθεί η επίδραση τής ενσωμάτωσης διαφορετικών εκ των προτέρων πληροφοριών στις εκτιμήσεις των μοντέλων, η ανάλυση επαναλήφθηκε με τη χρήση δύο διαφορετικών ομάδων εκ των προτέρων πληροφοριών: (Α) ομοιόμορφες κατανομές Βη (1,1) που δεν παρείχαν καμία πληροφορία για τις Ε_υ, καθώς και οι ίδιες κατανομές με την κύρια ανάλυση για τις Ε_ι, και (Β) ομοιόμορφες κατανομές που δεν παρείχαν καμία πληροφορία για τις Ε_υ και τις Ε_ι. Τόσο για το Α όσο και για το Β, οι ίδιες ευρείες εκ των προτέρων κατανομές χρησιμοποιήθηκαν για τα Π: Για τον υπο-πληθυσμό με χαμηλό Π χρησιμοποιήθηκε μια ομοιόμορφη εκ των προτέρων κατανομή με εύρος από 0 έως 50%, για τον υπο-πληθυσμό μέτριου και υψηλού Π, η πιο πιθανή τιμή ετέθη στα 25 και 75%, τα δε 95ο και 5ο εκατοστημόριο στα 65 και 35%, αντίστοιχα. Οι κατανομές που αντιστοιχούσαν σε αυτές τις συνθήκες ήταν η Βη (1,1) που οριζόταν από το 0 έως το 50%, η Βη (2, 4) και Βη (4, 2).

2.3.5.5. Ανάλυση καμπυλών ROC

Σε κάθε υπο-πληθυσμό, σχηματίστηκαν 2 επί 2 πίνακες της κατανομής του συνδυασμού των αποτελεσμάτων των δύο διαγνωστικών δοκιμών για μια σειρά από διαφορετικά κ.σ.δ., στα οποία το αποτέλεσμα της ELISA ερμηνεύτηκε ως θετικό ή αρνητικό. Σε κάθε κ.σ.δ., τα δεδομένα αυτών των 2 επί 2 πινάκων αναλύθηκαν, τόσο με το μοντέλο της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας όσο και με το μοντέλο της υπό συνθήκη εξάρτησης, με σκοπό να ελεγχθεί η πιθανότητα εμφάνισης υπό συνθήκη εξάρτησης των αποτελεσμάτων των διαγνωστικών δοκιμών κατά την αλλαγή του κ.σ.δ.. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε.

Σε όλες τις αναλύσεις δε χρησιμοποιήθηκαν εκ των προτέρων πληροφορίες για την Ευ και την Ει, αλλά μόνο για τα Π, ούτως ώστε να μην επηρεάζονται οι εκτιμήσεις της Ευ και της Ει από τις εκ των προτέρων πληροφορίες γι' αυτές. Εν συνεχεία, από τα ζεύγη τιμών $E_{u,ELISA}$ και $E_{i,ELISA}$ που εκτιμήθηκαν από την ανάλυση των δεδομένων σε κάθε κ.σ.δ., σχηματίστηκε η καμπύλη ROC για την ELISA στα πρόβατα και τις αίγες.

Ακολούθως, σε κάθε είδος ζώου, η τιμή S/P (ο λόγος της οπτικής πυκνότητας του δείγματος ορού προς αυτήν του θετικού μάρτυρα) που αντιστοιχεί στο σημείο της καμπύλης ROC που βρίσκεται πιο κοντά στην άνω δεξιά γωνία της γραφικής παράστασης (εικόνα 1) και μεγιστοποιεί ταυτόχρονα την Ευ και την Ει επιλέχθηκε ως δυνητικό κ.σ.δ.. Επιπλέον, υπολογίστηκε το εμβαδόν κάτω από κάθε καμπύλη με βάση τον «τραπεζοειδή κανόνα» (Hanley and McNeil, 1982), με σκοπό τη σύγκριση της συνολικής απόδοσης της ELISA μεταξύ αιγών και προβάτων (Greiner et al., 2000).

Για να διερευνήσουμε την ανάγκη επιλογής κ.σ.δ. ανάλογα με το είδος του ζώου και το σκοπό της μελέτης, χρησιμοποιήσαμε τις καμπύλες ROC, ώστε να καθορίσουμε βέλτιστα κ.σ.δ., στις αίγες και τα πρόβατα. Αυτό έγινε για συγκεκριμένο Π και σχέση μεταξύ του κόστους του ψευδώς θετικού (ΚΨΘ) και του ψευδώς αρνητικού (ΚΨΑ) αποτελέσματος. Η επιλογή βέλτιστων κ.σ.δ. στηρίχτηκε στην ελαχιστοποίηση του παράγοντα λανθασμένης κατάταξης (ΠΛΚ), που υπολογίστηκε ως εξής: $ΠΛΚ = (ΚΨΑ/ΚΨΘ) * Π * (1 - E_{u,ELISA}) + (1 - Π) * (1 - E_{i,ELISA})$ (Zweig and Campbell, 1993; Greiner et al., 2000). Η πρόκληση αυτής της προσέγγισης έγκειται στο ότι απαιτεί από τον ερευνητή να ποσοτικοποιήσει τις συνέπειες των ψευδών αποτελεσμάτων. Ο Smith (1995) έδωσε ένα παράδειγμα επιλογής κ.σ.δ. σε προσβεβλημένα από παραφυματίωση βοοειδή όταν το κόστος του ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος θεωρήθηκε ίδιο ή και πενταπλάσιο σε σχέση με το κόστος του ψευδώς θετικού, σε συγκεκριμένο Π. Ομοίως, επιλέξαμε κ.σ.δ. για τις ίδιες αναλογίες σφαλμάτων και για Π ίσο με 20%, που συνήθως υπάρχει σε ενδημικά προσβεβλημένα κοπάδια προβάτων και αιγών (με βάση δεδομένα του εργαστηρίου μας).

2.3.5.6. Έλεγχος της σύγκλισης τιμών

Στην κατά Bayes μεθοδολογία επίλυσης, είναι απαραίτητο να καθοριστεί πόσο πρέπει να είναι το μήκος της Monte Carlo μαρκοβιανής αλυσίδας (Markov Chain Monte Carlo, MCMC), επομένως και ο αριθμός των επαναλήψεων της διαδικασίας εκτίμησης, προκειμένου να επέλθει σύγκλιση τιμών. Εκτός αυτού, σημαντικό είναι να ελεγχθεί αν η σύγκλιση τιμών καθυστερεί λόγω, για παράδειγμα, της επιλογής ακατάλληλων τιμών έναρξης, εμφάνισης υψηλών αυτοσυσχετίσεων, ή λόγω «κωλύματος» της αλυσίδας σε μια περιοχή τιμών (Raftery and Lewis, 1992).

Καμία μέθοδος ελέγχου της σύγκλισης τιμών δεν είναι αλάνθαστη. Για το λόγο αυτό προτείνεται ο συνδυασμός διαφορετικών μεθόδων ελέγχου σύγκλισης τιμών, καθώς και η επισκόπηση της ακολουθίας των τιμών της αλυσίδας MCMC, της μορφής των εκ των υστέρων κατανομών, όπως και ο έλεγχος των περιγραφικών στατιστικών των εκ των υστέρων κατανομών (Best et al., 1995). Εμείς χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο των Raftery και Lewis (Raftery and Lewis, 1992), τη μέθοδο των Gelman και Rubin (Gelman and Rubin, 1992) και ελέγξαμε τις αυτοσυσχετίσεις των παραμέτρων.

Αρχικά, η σύγκλιση των τιμών των παραμέτρων στη στάσιμη κατανομή ελέγχθηκε με τη μέθοδο των Raftery και Lewis. Το όριο του παράγοντα I τέθηκε στην τιμή 5. Τιμές μεγαλύτερες του 5 καταδεικνύουν υψηλές αυτοσυσχετίσεις και πιθανή αποτυχία σύγκλισης τιμών. Η τιμή του I υπολογίστηκε για τα 2,50, 500 και 97,50 εκατοστημόρια. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του αριθμού των επαναλήψεων (N) που απαιτούνται για να αποκτήσουμε, με 95% βεβαιότητα, ακρίβεια $\pm 0,01$ για την εκτίμηση των 2,50, 500 και 97,50 εκατοστημορίων. Ο μέγιστος απαιτούμενος αριθμός επαναλήψεων ήταν 45.000, μετά από μια φάση προσαρμογής (καψίματος) 15 επαναλήψεων. Ως εκ τούτου, οι εκτιμήσεις μας βασίστηκαν σε 50.000 επαναλήψεις του δειγματολήπτη Gibbs, μετά από μια φάση προσαρμογής 500 επαναλήψεων.

Στη συνέχεια, προκειμένου να εφαρμοστεί η μέθοδος των Gelman και Rubin, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές τριών παράλληλων αλυσίδων MCMC που είχαν διαφορετικές τιμές εκκίνησης. Πρόκειται, ουσιαστικά, για μία σύγκριση της διακύμανσης μεταξύ και εντός των αλυσίδων, προκειμένου να ελεγχθεί η σύγκλιση τιμών. Τέλος, ελέγχθηκαν και οι αυτοσυσχετίσεις.

Για όλα τα μοντέλα, και οι δύο μέθοδοι κατέδειξαν πως επήλθε σύγκλιση τιμών. Επίσης, οι τιμές των αυτοσυσχετίσεων μειώνονταν ταχύτατα.

2.3.5.7. Λογισμικό

Όλα τα μοντέλα αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν μέσα από το λογισμικό WinBUGS (Spiegelhalter et al., 1996). Το ίδιο λογισμικό χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της μεθόδου Gelman και Rubin και τον έλεγχο των αυτοσυσχετίσεων. Για τη μέθοδο των Raftery και Lewis, χρησιμοποιήσαμε το R-CODA (Best et al., 1996). Πρόκειται για μια ομάδα λειτουργιών R-Plus που λειτουργεί ως επεξεργαστής των δεδομένων που παράγονται από το WinBUGS.

2.4. Αποτελέσματα

Αποτελέσματα και από τις δύο διαγνωστικές δοκιμές (HEYM και ELISA) είχαμε από 368/400 ζώα. Η κατανομή των συνδυασμών θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων των δύο διαγνωστικών δοκιμών, χωριστά για τις αίγες και τα πρόβατα, φαίνεται στον πίνακα 2.

Στο συνιστώμενο από τον κατασκευαστή της ELISA κ.σ.δ. ($S/P = 0,4$), οι διάμεσες τιμές και τα 95% δ.α. για τις Eu_{ELISA} , Ei_{ELISA} , Eu_{FC} και την Ei_{FC} , ήταν 62,5% (95% δ.α.:42,3-92,8%), 95,0% (90,2-98,0%), 7,9% (2,0-17,3%) και 98,0 (95,0-99,7%) στις αίγες. Στα πρόβατα ήταν 37,3% (10,2-80,0%), 96,6% (93,2-98,7%), 15,8% (1,9-47,8%) και 97,3% (94,5-99,4%), αντίστοιχα. Από τη σύγκριση των εκ των υστέρων

κατανομών της $E_{U_{ELISA}}$ μεταξύ αιγών και προβάτων, προκύπτει ότι η πιθανότητα η $E_{U_{ELISA}}$ να είναι υψηλότερη στις αίγες απ' ό,τι στα πρόβατα είναι 93%. Οι αντίστοιχες πιθανότητες για τις $E_{I_{ELISA}}$, $E_{U_{KK}}$ και την $E_{I_{KK}}$, ήταν 20, 46 και 77%.

Από την εφαρμογή του μοντέλου της υπό συνθήκη εξάρτησης, οι διάμεσες τιμές και τα 95% δ.α. που προέκυψαν για τους γ_{E_U} και γ_{E_I} ήταν -0,04 (-0,11-0,001) και 0,004 (-0,0004-0,02) στις αίγες, ενώ στα πρόβατα 0,009 (-0,04-0,07) και 0,003(-0,001-0,02), αντίστοιχα.

Οι εκτιμήσεις της E_U και της E_I από την εφαρμογή του μοντέλου της υπό συνθήκη εξάρτησης και της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας των δύο διαγνωστικών δοκιμών παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Στον πίνακα 4, παρατίθενται οι εκτιμήσεις της E_U και της E_I με τη χρήση του μοντέλου της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας μετά την ενσωμάτωση των διαφορετικών ομάδων εκ των προτέρων πληροφοριών (Α) και (Β).

Για την ELISA, το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη ROC υπολογίστηκε 0,847 για τις αίγες και 0,702 για τα πρόβατα. Η τιμή $S/P=0,1$ ως κ.σ.δ. μεγιστοποιεί ταυτόχρονα την $E_{U_{ELISA}}$ και την $E_{I_{ELISA}}$ στις αίγες. Η αντίστοιχη τιμή στα πρόβατα είναι 0,05 (εικόνα 1). Οι τιμές S/P , που ως κ.σ.δ. ελαχιστοποιούν τον ΠΣΚ όταν το κόστος ενός ψευδώς θετικού αποτελέσματος θεωρήθηκε ίδιο με το κόστος ενός ψευδώς αρνητικού, ήταν 0,6 στις αίγες και 0,3 στα πρόβατα. Όταν το κόστος ενός ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος θεωρήθηκε πενταπλάσιο του κόστους ενός ψευδώς θετικού, οι αντίστοιχες τιμές ήταν 0,1 στις αίγες και 0,05 στα πρόβατα (εικόνα 2). Αυτές οι τιμές προκύπτουν όταν το αναμενόμενο πραγματικό ποσοστό προσβολής στον υπό εξέταση πληθυσμό είναι 20%. Σε αυτά τα κ.σ.δ., η $E_{U_{ELISA}}$ και η $E_{I_{ELISA}}$ ήταν 59% και 95%, 79% και 84%, για τις αίγες. Αντίστοιχα, στα πρόβατα ήταν 41% και 98%, 57% και 89%. Αυτές οι εκτιμήσεις δείχνουν πως, τόσο στις αίγες όσο και στα πρόβατα, η μείωση του κ.σ.δ. βελτιώνει την E_U χωρίς να επέρχεται σημαντική μείωση της E_I . Πράγματι, μείωση του κ.σ.δ. κατά 75% οδήγησε σε απώλεια μόνο κατά 11% και 7% για την $E_{I_{ELISA}}$ στις αίγες και τα πρόβατα, αντίστοιχα.

Πίνακας 2. Η κατανομή του συνδυασμού των θετικών και των αρνητικών αποτελεσμάτων της KK και της ELISA⁺ σε τρεις υπο-πληθυσμούς ελληνικών αιγών και προβάτων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης με χαμηλό, μέτριο και υψηλό ποσοστό εμφάνισης κλινικής παραφυματίωσης (υπό-πληθυσμός 1, 2 και 3, αντίστοιχα).

		Πρόβατα		Αίγες	
		ELISA+	ELISA-	ELISA+	ELISA-
Υπο-πληθυσμός 1	KK +	0	6	0	0
	KK -	1	85	2	36
Υπο-πληθυσμός 2	KK +	0	1	1	3
	KK -	4	49	24	64
Υπο-πληθυσμός 3	KK +	1	0	1	3
	KK -	5	21	23	38

⁺: Τα αποτελέσματα της ELISA αξιολογήθηκαν στο προτεινόμενο από τον κατασκευαστή κρίσιμο σημείο διάκρισης ($S/P=0.4$, IDEXX Laboratories, Portland, ME).

Πίνακας 3. Οι διάμεσες τιμές και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας (δ.α.) για την Ευ και την Ει της ΚΚ, της ELISA και για το πραγματικό ποσοστό προσβολής (Π) στους υπο-πληθυσμούς 1, 2 και 3, με τη χρήση είτε του μοντέλου που υποθέτει υπό συνθήκη ανεξαρτησία (ΑΜ) είτε αυτού που λαμβάνει υπόψη την υπό συνθήκη εξάρτηση (ΕΜ) των αποτελεσμάτων των δύο διαγνωστικών δοκιμών.

Μοντέλο		Διάμεση τιμή (95% δ.α.)		
			Πρόβατα	Αίγες
ΑΜ	ELISA	Ευ	37 (10-80)	62 (42-93)
		Ει	97 (93-99)	95 (90-98)
	HEYM	Ευ	16 (2-48)	8 (2-17)
		Ει	97 (95-99)	98 (95-100)
	Υπο-πληθυσμός 1	Π1	3 (0,7-9)	4 (0,8-10)
	Υπο-πληθυσμός 2	Π2	19 (5-45)	36 (20-57)
	Υπο-πληθυσμός 3	Π3	50 (28-73)	54 (35-74)
	ELISA	Ευ	32 (13-68)	69 (46-91)
		Ει	97 (94-99)	95 (90-98)
ΕΜ	HEYM	Ευ	16 (0,4-26)	10 (3-21)
		Ει	96 (93-98)	99 (96-100)
	Υπο-πληθυσμός 1	Π1	3 (0,7-9)	4 (0,8-10)
	Υπο-πληθυσμός 2	Π2	21 (7-48)	33 (20-52)
	Υπο-πληθυσμός 3	Π3	51 (29-74)	50 (34-70)

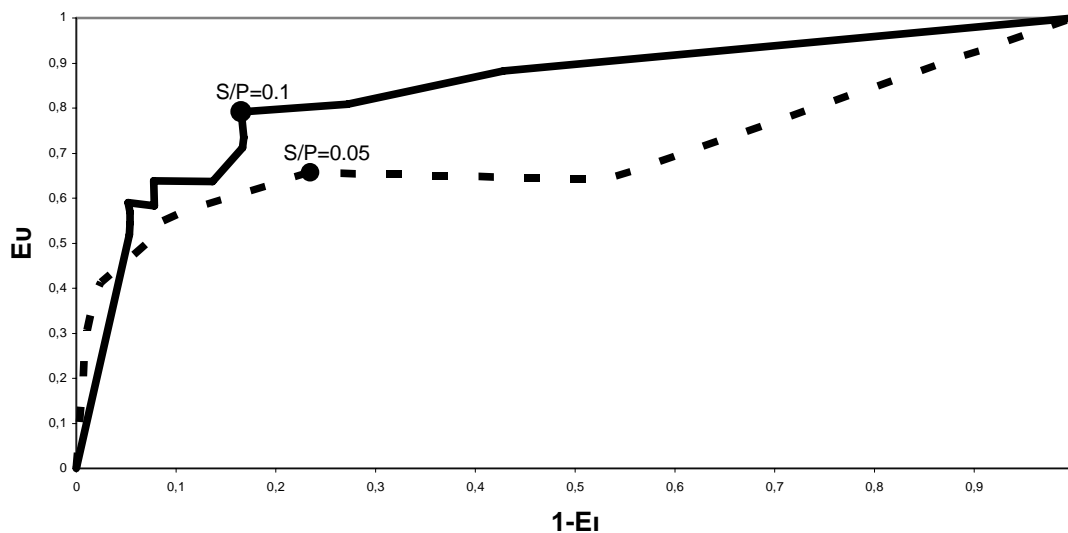
Πίνακας 4. Οι διάμεσες τιμές και τα 95% δ.α. για την Ευ και την Ει της ΚΚ και της ELISA, μετά την ενσωμάτωση στο ΑΜ διαφορετικών εκ των προτέρων πληροφοριών (ΕΠΠ).

ΕΠΠ		Διάμεση τιμή (95% δ.α.)		
			Πρόβατα	Αίγες
Α ⁺	ELISA	Ευ	24 (0,7-62)	50 (34-80)
		Ει	97 (93-99)	95 (90-98)
	HEYM	Ευ	8 (1-26)	7(3-15)
		Ει	97(94-99)	98(95-100)
Β ⁺⁺	ELISA	Ευ	26 (10-64)	49 (32-84)
		Ει	98 (94-100)	94 (80-99)
	HEYM	Ευ	6 (0,7-22)	7 (2-15)
		Ει	95 (90-98)	97 (91-100)

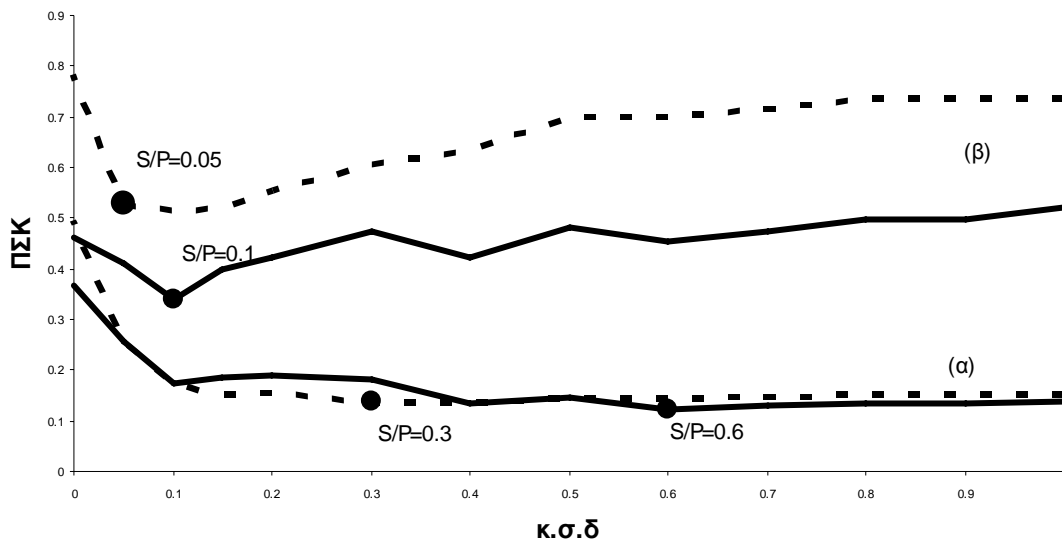
⁺: Οι Ευ είχαν ως ΕΠΠ την ομοιόμορφη κατανομή Βη (1,1), Ει_{ELISA}, Ει_{HEYM}, και οι υπο-πληθυσμοί 1,2 και 3 είχαν ως ΕΠΠ μια κατανομή Βη (100, 5,5), Βη (100,2), Βη (1,1) από το 0 έως το 0,5, Βη (2,4) και Βη (4,2), αντίστοιχα.

⁺⁺: Οι Ευ και οι Ει είχαν ως ΕΠΠ ομοιόμορφες κατανομές Βη (1,1), και οι υπο-πληθυσμοί 1,2 και 3 είχαν ως ΕΠΠ Βη (1,1) από το 0 έως το 0,5, Βη (2,4) και Βη (4,2), αντίστοιχα.

Εικόνα 1. Οι καμπύλες ROC για την ELISA μετά από την κατά Bayes εκτίμηση της E_u και της E_i στα πρόβατα (διακεκομμένη γραμμή) και τις αίγες (συνεχής γραμμή). Οι τιμές της E_u και της E_i προήλθαν από το μοντέλο AM. Σημειώνονται τα κ.σ.δ. τής κάθε καμπύλης που βρίσκονται πιο κοντά στην άνω αριστερή γωνία και μεγιστοποιούν ταυτόχρονα την E_u και την E_i .



Εικόνα 2. Η σχέση μεταξύ του παράγοντα κόστους των σφαλμάτων κατάταξης (ΠΣΚ) και του κ.σ.δ. όταν το Π είναι 20% στα πρόβατα (διακεκομμένη γραμμή) και τις αίγες (συνεχής γραμμή). Το ΠΣΚ υπολογίστηκε για την περίπτωση που (α) το κόστος του ψευδώς αρνητικού και θετικού αποτελέσματος θεωρείται ίσο, και (β) το κόστος του ψευδώς αρνητικού θεωρείται πενταπλάσιο του κόστους του ψευδώς θετικού. Σημειώνονται τα κ.σ.δ. που ελαχιστοποιούν το ΠΣΚ.



2.5. Συζήτηση

Οι εκτιμήσεις για τους γ_{Eu} και γ_{Ei} καθώς και η σύγκριση των μοντέλων της υπό συνθήκη εξάρτησης και ανεξαρτησίας, δεν κατέδειξαν υπό συνθήκη εξάρτησης μεταξύ της ELISA και της ΚΚ. Επιπλέον, οι εκτιμήσεις της E_u και της E_i από την εφαρμογή του μοντέλου της υπό συνθήκη εξάρτησης ή ανεξαρτησίας, δε διέφεραν. Η υπό συνθήκη ανεξαρτησία, είναι λογικότερο να αναμένεται μεταξύ διαγνωστικών δοκιμών που βασίζονται σε διαφορετική βιολογική αρχή (Enoe et al., 2000; Greiner and Gardner, 2000; Toft et al., 2005), όπως ισχύει στην παρούσα μελέτη. Ανάλογες παρατηρήσεις έγιναν πρόσφατα για την ELISA και την ΚΚ στην παραφουμάτωση των βοοειδών (Nielsen et al., 2002). Όπως φαίνεται από τις εκτιμήσεις των Π , ίσχυε η υπόθεση των διακριτών διαφορών μεταξύ των υπο-πληθυσμών. Εκτός αυτού, ήταν σημαντικό το ότι ο

παράγων διαχωρισμού σε υπο-πληθυσμούς (η συχνότητα κλινικής νόσου) δεν αλληλεπιδρούσε με την πιθανότητα εμφάνισης ψευδώς θετικών ή / και αρνητικών αποτελεσμάτων, ώστε να παραβιάζεται η υπόθεση της όμοιας Ευ ή / και Ει μεταξύ των πληθυσμών (Nielsen et al., 2002; Toft et al., 2005). Η ισχύς της τελευταίας αυτής υπόθεσης φάνηκε από τη συμφωνία των εκτιμήσεων της Ευ και της Ει που προήλθαν από την ανάλυση των ζευγών των υπο-πληθυσμών με τις εκτιμήσεις της ανάλυσης των τριών υπο-πληθυσμών. Η συμφωνία αυτή παρατηρήθηκε και κατά την επανάλυση των αναλύσεων με την ενσωμάτωση των διαφορετικών ομάδων εκ των προτέρων πληροφοριών (Α) και (Β).

Στη μελέτη αυτή, επιλέχθηκαν εκ των προτέρων κατανομές που δεν έδιναν καμία πληροφορία για τις Ευ. Η επιλογή αυτή αντικατοπτρίζει την άγνοιά μας για την κατανομή των σταδίων της λοίμωξης στον πληθυσμό, η οποία πιστεύεται ότι επηρεάζει την Ευ των διαγνωστικών δοκιμών (Collins and Sockett, 1993). Οι δημοσιευμένες εκτιμήσεις Ευ παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση, που σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από την κατανομή των σταδίων της λοίμωξης στους υπό μελέτη πληθυσμούς (Dubash et al., 1995; Hope et al., 2000; Sergeant et al., 2003). Από την άλλη πλευρά, η αδιαμφισβήτητη υψηλή έως και απόλυτη Ει και για τις δύο διαγνωστικές δοκιμές δικαιολογεί την υιοθέτηση πολύ συγκεκριμένων εκ των προτέρων πληροφοριών. Οι εκ των προτέρων πληροφορίες για τα Π, κάλυπταν σχετικά μεγάλο μέρος τιμών. Με τον τρόπο αυτό, αποτυπώθηκε η γενική ιδέα που είχαμε για το πραγματικό ποσοστό προσβολής στον πληθυσμό, με βάση τη γνώμη του υπεύθυνου κτηνιάτρου, αλλά, παράλληλα, εκφράστηκε και η αβεβαιότητα μας για την τιμή του Π. Η ανάλυση ευαισθησίας του μοντέλου με τη χρήση διαφορετικών ομάδων εκ των προτέρων πληροφοριών έδειξε ότι τα αποτελέσματά μας, παρά το ότι εξαρτώνταν σε μικρό βαθμό από το είδος των εκ των προτέρων πληροφοριών, ήταν ποιοτικά όμοια. (βλ. πίνακα 2.) Τέλος, διερευνήσαμε τις επιπτώσεις ήπιων τροποποιήσεων των δεδομένων στις τελικές εκτιμήσεις Ευ και Ει. Πιο συγκεκριμένα, ελέγξαμε ποιες θα ήταν οι εκτιμήσεις αν ένας ή περισσότεροι από τους μηδενικούς συνδυασμούς των αποτελεσμάτων των διαγνωστικών δοκιμών είχαν από μία παρατήρηση. Η ανάλυση των τροποποιημένων δεδομένων είχε περιορισμένες επιπτώσεις στις εκτιμήσεις της Ευ και της Ει, υποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό ότι θα πρέπει να αισθανόμαστε ασφαλείς για τις εκτιμήσεις μας (Enoe et al., 2000).

Η Eu_{ELISA} ήταν μεγαλύτερη στις αίγες απ' ό,τι στα πρόβατα. Αυτή η διαφορά παρατηρήθηκε και με την επανάλυση της ανάλυσης, μετά την ενσωμάτωση των διαφορετικών ομάδων εκ των προτέρων πληροφοριών Α και Β. Για την ELISA, οι Molina et al. (1991) και Rajukumar et al. (2001) υπολόγισαν την Eu_{ELISA} στις αίγες ως μεγαλύτερη ή ίση με 75% και 85%, αντίστοιχα. Στα πρόβατα, οι Dubash et al. (1995) και Hope et al. (2000) και την υπολόγισαν ίση με 48% και 35-54%, αντίστοιχα. Αυτές οι εκτιμήσεις βασίστηκαν στην επιβεβαίωση της λοίμωξης με την ΚΚ ή / και την ιστοπαθολογική εξέταση. Ως εκ τούτου, αυτές οι εκτιμήσεις δεν έλαβαν υπόψη την πιθανότητα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων των δοκιμών αναφοράς και υπερεκτίμησαν, σε άγνωστο βαθμό, την Ευ (Staquet et al., 1981). Μάλιστα, ο βαθμός υπερεκτίμησης είναι, ενδεχομένως, μεγαλύτερος στα πρόβατα παρά στις αίγες (Sergeant et al., 2003). Η Ευ των διαγνωστικών δοκιμών που ανιχνεύουν χυμική ανοσία, είναι ευθέως ανάλογη του είδους, της έντασης και της διασποράς των αλλοιώσεων και του σταδίου της νόσου (Hilbink et al., 1994; Dubash et al., 1995; Perez et al., 1997; Sergeant et al., 2003). Οι Corra et al. (2000) υποστήριξαν ότι η έλλειψη φυσικά προσβεβλημένων

αιγών με εστιακές αλλοιώσεις, σε συνδυασμό με τον υψηλότερο αριθμό αιγών με διάχυτες αλλοιώσεις, σε σύγκριση με ανάλογες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε φυσικά προσβεβλημένα πρόβατα (Perez et al., 1996), πιθανώς υποδεικνύει πως οι αίγες έχουν μειωμένη ικανότητα να περιορίζουν τη λοίμωξη. Τέτοιες αλλοιώσεις συνδέονται με την αποτυχία της αποτελεσματικής (κυτταρικής) ανοσολογικής απάντησης (National Research Committee, 2003) και, επομένως, την ανάπτυξη χυμικής ανοσίας (Clarke et al., 1996; Perez et al., 1997; Sergeant et al., 2003). Συνεπώς, η πιθανότητα διαφορετικής ανοσολογικής απάντησης μεταξύ προβάτων και αιγών μπορεί βιολογικά να εξηγήσει τη διαφορά της Eu_{ELISA} μεταξύ των δύο ειδών. Επιπλέον, στα πρόβατα η λοίμωξη οφείλεται, κατά κύριο λόγο, σε πρόβεια στελέχη (Whittington et al., 1998; Cousins et al., 2000), ενώ στις αίγες σε βόεια στελέχη που είναι προσαρμοσμένα στις αίγες (Cousins et al., 2000; Whittington et al., 2000). Πιθανή διαφορά στη λοιμογόνο δύναμη μεταξύ των στελεχών εξηγεί περαιτέρω τη διαφορετική Eu_{ELISA} μεταξύ των ειδών. Ο Saxegaard (1990) παρουσίασε ένα στέλεχος που ήταν παθογόνο στις αίγες και απαθογόνο στα πρόβατα και βοοειδή, γεγονός που υποστηρίζει την ύπαρξη ειδικών στελεχών προσαρμοσμένων σε κάθε είδος ζώου.

Και στα δύο είδη ζώων, η Eu_{KK} ήταν χαμηλότερη από την Eu_{ELISA}. Με μια πρώτη ματιά, η υπολογισθείσα στη μελέτη αυτή Eu_{KK} φαίνεται σημαντικά μικρότερη από της υπάρχουσες στη διεθνή βιβλιογραφία (Πίνακας 1). Εντούτοις, οι προγενέστερες εκτιμήσεις, όπως και στην περίπτωση της ELISA, βασίστηκαν σε δοκιμές επιβεβαίωσης που δεν περιελάμβαναν όλες τις λανθάνουσες μορφές της λοίμωξης και αναπόφευκτα υπερεκτιμούσαν την Eu. Σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες, οι Whitlock et al. (2000) χρησιμοποίησαν την επαναλαμβανόμενη θετική KK ως αλάνθαστη διαγνωστική δοκιμή αναφοράς για να υπολογίσουν την Eu της ίδιας της KK. Με τον τρόπο αυτό, υπολόγισαν την Eu_{KK} ως ίση με 42%. Αυτή η εκτίμηση μειώθηκε στο 25% όταν αρνητικά στην επαναλαμβανόμενη KK ζώα, που ήταν θετικά στην ιστοπαθολογική εξέταση κατά τη σφαγή, κατατάχθηκαν ως προσβεβλημένα. Ακόμα κι έτσι, μερικά υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα δεν ανιχνεύθηκαν ποτέ, αφού αρκετά εξ αυτών δεν εμφανίζουν αλλοιώσεις (Whittington et al., 1999; Whittington and Segeant, 2001). Συνεπώς, ακόμα και η τιμή του 25% υπερεκτιμά, σε μικρότερο όμως βαθμό, την Eu στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες. Η τελευταία αυτή εκτίμηση βρίσκεται πιο κοντά στις δικές μας, που στηρίχθηκαν σε όλες τις λανθάνουσες μορφές της λοίμωξης στα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα (πρόβατα και αίγες). Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη οι δυσκολίες της καλλιέργειας στις αίγες και τα πρόβατα, σε σχέση με τις αγελάδες. Στα πρόβατα κυριαρχούν τα στελέχη τύπου I (Stevenson et al., 2002). Η συντριπτική πλειοψηφία των πρόβειων στελεχών δεν αναπτύσσεται καλά σε τεχνητά υποστρώματα (Collins et al., 1990; Juste et al., 1991; Marsh and Whittington, 2005). Αν και τα περισσότερα στελέχη των αιγών είναι ίδιου τύπου (II) με τα βόεια στελέχη (Collins et al., 1990; Whipple et al., 1990; Thoresen and Olsaker, 1994; Pavlik et al., 1995; Cousins et al., 2000), τελευταία περιγράφηκαν σε αίγες ενδιάμεσα στελέχη των τύπων I και II, τα στελέχη τύπου III, η ανάπτυξη των οποίων σε υποστρώματα είναι όμοια με αυτή των στελεχών τύπου I (de Juan et al., 2005). Τα στελέχη αυτά προέρχονταν από κοπάδια αιγών γειτνιάζοντα με κοπάδια προβάτων, κάτι που ίσχυε και στην παρούσα μελέτη. Πιθανώς, η επικράτηση στελεχών τύπου I και III στις ελληνικές αίγες και τα πρόβατα γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης εξηγεί περαιτέρω την εκτιμηθείσα χαμηλή Eu_{KK}. Τέλος, υπάρχει μια μόνο εργασία που αναφέρεται στην επίδραση των διαδικασιών

απομάκρυνσης των επιμολύνσεων στα πρόβεια στελέχη κατά την καλλιέργεια των δειγμάτων σε τεχνητά υποστρώματα (Reddacliff et al., 2003), και θα ήταν ίσως σφάλμα να υποθέσουμε ότι τα υπάρχοντα, για τα βόεια στελέχη δεδομένα, ισχύουν και για τα πρόβεια στελέχη, από τη στιγμή που οι απαιτήσεις της καλλιέργειας μεταξύ των δύο αυτών τύπων στελεχών είναι πολύ διαφορετικές.

Η E_{KK} και στα δύο είδη ήταν σχεδόν απόλυτη. Το μικρό ποσοστό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων αντικατοπτρίζει τη μικρή, πλην όμως υπαρκτή, πιθανότητα μόλυνσης και παθητικής διάβασης του μικροοργανισμού από τον εντερικό σωλήνα χωρίς εγκατάσταση της λοίμωξης (Sweeney et al., 1992), ή την πιθανότητα εργαστηριακού σφάλματος, συμπεριλαμβανομένης της επιμόλυνσης, κατά την επεξεργασία των δειγμάτων.

Οι Nielsen et al. (2002) ανέφεραν πως οι εκτιμήσεις μεγίστης πιθανοφάνειας για την E_{KK} ήταν υψηλότερες καθώς το κ.σ.δ. της ELISA αυξανόταν. Θεώρησαν πως αυτή η μεταβολή αντιπροσωπεύει τη μεγαλύτερη E_{KK} στα ζώα τελικού σταδίου που έχουν και υψηλό τίτλο αντισωμάτων. Στη δική μας μελέτη, η E_{KK} παρέμεινε σταθερή με την αλλαγή του κ.σ.δ. για την ELISA και παρατηρήθηκαν μόνο μικρές αποκλίσεις στην τιμή της E_{KK} , στις ακραίες τιμές κ.σ.δ. της ELISA. Για να διερευνήσουμε την επίδραση της αλλαγής του κ.σ.δ. μιας διαγνωστικής δοκιμής που παίρνει συνεχείς τιμές (όπως η ELISA), στις εκτιμήσεις για την αξιοπιστία μιας διαγνωστικής δοκιμής που παίρνει δύο διακριτές τιμές (όπως η KK), πραγματοποιήσαμε μια μελέτη προσομοίωσης. Θεωρήσαμε την ύπαρξη δύο διαγνωστικών δοκιμών της δδ1, που παίρνει συνεχείς τιμές, και της δδ2, που παίρνει δύο τιμές. Υποθέσαμε πως τα αποτελέσματα των υγιών ζώων στη δδ1 έχουν πιο συχνή τιμή ίση με 0.1 και 95ο εκατοστημόριο ίσο με 0.4 ($B_{\eta}(2,9)$), ενώ των προσβεβλημένων ζώων έχουν πιο πιθανή τιμή ίση με 0.5 και 5ο εκατοστημόριο ίσο με 0.14 ($B_{\eta}(2,2)$). Η E_{ν} και η E_{ϵ} για τη δδ1 σε μια σειρά κ.σ.δ. υπολογίστηκαν με βάση τις κατανομές B_{η} των προσβεβλημένων και των υγιών ζώων. Για τη δδ2, όλα τα υγιή και τα προσβεβλημένα ζώα είχαν αντίστοιχα ίση πιθανότητα 0.980 και 0.400 να ανιχνευθούν. Επομένως, η E_{ν} και η E_{ϵ} της δδ2 ήταν 0.40 και 0.98, αντίστοιχα. Οι ίσες πιθανότητες ανίχνευσης της δδ2, σε όλο το εύρος τιμών της δδ1, διασφαλίζουν την ισχύ της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας μεταξύ δδ1 και δδ2. Στη συνέχεια παρήχθησαν, 10.000 ατομικά αποτελέσματα για τις δδ1 και δδ2 σε δύο πληθυσμούς, έναν με $\Pi_1=0.050$ και έναν με $\Pi_2=0.200$. Τα δεδομένα και οι συνδυασμοί των αποτελεσμάτων των δδ1 και δδ2 στους δύο πληθυσμούς αναλύθηκαν στο λογισμικό WinBUGS, υποθέτοντας την υπό συνθήκη ανεξαρτησία των διαγνωστικών δοκιμών. Ομοιόμορφες εκ των προτέρων κατανομές χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις παραμέτρους (E_{ν} , E_{ϵ} , Π), $Be(1, 1)$. Τα αποτελέσματά της προσομοίωσης έδειξαν πως η E_{ν} και η E_{ϵ} της δδ2 παρέμειναν σταθερές με τη μεταβολή του κ.σ.δ. για τη δδ1. Όπως και για την E_{KK} στη δική μας μελέτη, τα αποτελέσματα της δδ2 κατά την προσομοίωση παρέκκλιναν της πραγματικής E_{ν} στις ακραίες τιμές κ.σ.δ.. Πιθανότατα, στα ακραία κ.σ.δ., η κατανομή των αποτελεσμάτων της δδ2, σε σχέση με τα αποτελέσματα της δδ1, εμφανίζει μια τυχαία απόκλιση από τη θεωρητικά αναμενόμενη κατανομή. Πράγματι, κατά την προσομοίωση, η κατανομή του συνδυασμού των αποτελεσμάτων των δδ1 και δδ2, στα ακραία κ.σ.δ. διέφερε ελαφρώς από τη θεωρητικά αναμενόμενη, γεγονός που εξηγεί την μικρή παρέκκλιση των εκτιμήσεων από τις πραγματικές τιμές. Η επανάληψη της ανάλυσης με τη χρήση της θεωρητικά αναμενόμενης κατανομής του συνδυασμού των αποτελεσμάτων των δδ1 και δδ2, έδωσε εκτιμήσεις που δε διέφεραν από τις πραγματικές τιμές των παραμέτρων (E_{ν} , E_{ϵ} και Π) σε

όλο το εύρος των κ.σ.δ. της δδ2. Αναλυτική περιγραφή της μελέτης προσομοίωσης και των αποτελεσμάτων από την ανάλυση της κατανομής των συνδυασμών των δδ1 και δδ2 και της θεωρητικά αναμενόμενης, σε κάθε κ.σ.δ., δίνεται στο παράρτημα (2.6).

Το εμβαδόν της καμπύλης ROC (AUC) ήταν μεγαλύτερο στις αίγες παρά στα πρόβατα, καταδεικνύοντας τη μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα της ELISA στις αίγες. Σύμφωνα με έναν αυθαίρετο κανόνα των Greiner et al. (2000), η διακριτική ικανότητα της ELISA, και για τα δύο είδη, χαρακτηρίζεται μέτρια ($0.7 < AUC \leq 0.9$). Όταν θεωρήσαμε ίσο το κόστος ενός ψευδώς αρνητικού και ενός ψευδώς θετικού αποτελέσματος της ELISA, και το $\Pi=20\%$, βάσει του ΚΚΣ, τα βέλτιστα κ.σ.δ. ήταν διαφορετικά για τις αίγες και τα πρόβατα (εικόνα 2). Ομοίως, διαφορετικά και αισθητά μειωμένα ήταν τα κ.σ.δ. όταν θεωρήσαμε πενταπλάσιο το κόστος μη ανίχνευσης ενός προσβεβλημένου ζώου, σε σχέση με το κόστος μη ανίχνευσης ενός υγιούς. Η επιλογή κ.σ.δ. είναι μια απόφαση που πρέπει να λαμβάνει υπόψη την επιδημιολογική κατάσταση, όπως το Π στον πληθυσμό που μελετάμε, και τις σχετικές συνέπειες των ψευδώς αρνητικών και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων της δοκιμής, οι οποίες επίσης διαφέρουν ανάλογα με το σκοπό της εξέτασης (Greiner et al., 2000). Επομένως, είναι σαφές πως η επιλογή του κ.σ.δ. με βάση το είδος του ζώου (αίγα ή πρόβατο) και το σκοπό της μελέτης θα βελτίωνε την αξιοπιστία της ELISA.

Τα δ.α. των Ευ ήταν ευρέα. Παράγοντες που συμβάλλουν στην αύξηση της διακύμανσης των εκτιμήσεων που προκύπτουν από την εφαρμογή μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης είναι (α) οι μικρές πραγματικές τιμές των Ευ και Ει, (β) το μικρό μέγεθος δείγματος, και (γ) η μικρή διαφορά μεταξύ των Π των πληθυσμών (Enoe et al., 2000; Georgiadis et al., 2005; Toft et al., 2005). Στη δική μας περίπτωση, ο πιο σημαντικός παράγων ήταν ο πρώτος (οι μικρές τιμές Ευ). Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι οι εκτιμήσεις των Ει (οι πραγματικές τιμές των οποίων ήταν υψηλές) δεν είχαν ευρέα δ.α., ακόμα και όταν δε χρησιμοποιήθηκαν εκ των προτέρων πληροφορίες γι' αυτές (Πίνακας 4). Επίσης, σε άλλες μελέτες με συνολικό μέγεθος δείγματος το πολύ ίσο με το μισό αυτής της μελέτης (Enoe et al., 2000; Joseph et al., 2000; Frossling et al., 2003), οι εκτιμήσεις των Ευ και Ει είχαν σαφώς στενότερα δ.α., ακριβώς επειδή οι πραγματικές τιμές των Ευ και Ει ήταν υψηλότερες. Σε μια προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης της επίδρασης του μεγέθους του δείγματος στα δεδομένα, αναλύσαμε πολλαπλάσια κατά 10 και 100 φορές των αρχικών δεδομένων (Johnson et al., 2001). Τα δεκαπλάσιασμένα δεδομένα (με τον εντυπωσιακό συνολικό αριθμό των 3.860 ζώων), πάλι έδωσαν ευρύ δ.α. για την Eu_{ELISA} στα πρόβατα. Μόνο τα εκατονταπλάσιασμένα δεδομένα (ο υψηλότερος συνολικός αριθμός των 38.600 ζώων) έδωσε στενά δ.α. για όλες τις Ευ. Επομένως, η μεγάλη διακύμανση που παρατηρήθηκε αποδίδεται πρωτίστως στη χαμηλή πραγματική τιμή των Ευ.

Τα μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης παρέχουν έναν εναλλακτικό τρόπο εκτίμησης της αξιοπιστίας των διαγνωστικών δοκιμών, που λαμβάνει υπόψη του όλες τις λανθάνουσες μορφές της λοίμωξης. Η κατά Bayes μεθοδολογία εκτίμησης έχει το πλεονέκτημα της εισαγωγής επαρκώς τεκμηριωμένων εκ των προτέρων πληροφοριών, οι οποίες συνοψίζουν τη γνώμη ειδικών ή / και τις διαθέσιμες από τη βιβλιογραφία εκτιμήσεις για τις προς εκτίμηση παραμέτρους (Ευ, Ει και Π). Τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν την ύπαρξη πιθανότατα διαφορετικού ορολογικού προφίλ μεταξύ αιγών και προβάτων και, επομένως, την ανάγκη επιλογής κ.σ.δ. με βάση το είδος του ζώου, αλλά και το σκοπό της μελέτης. Η μείωση του κ.σ.δ. βελτίωσε αισθητά την Eu_{ELISA} χωρίς

να μειώσει σημαντικά την E_{ELISA} , μεγιστοποιώντας, συνεπώς, τη διαγνωστική απόδοση της ELISA και στα δύο είδη ζώων. Η ΚΚ, αν και έχει υψηλή έως απόλυτη E_i , στερείται E_u στις υποκλινικά προσβεβλημένες αίγες και τα υποκλινικά προσβεβλημένα πρόβατα.

2.6. Παράρτημα

Σε αντίθεση με τους Nielsen et al. (2002), οι οποίοι διαπίστωσαν πως οι εκτιμήσεις της E_u και της E_i για την καλλιέργεια κοπράνων αυξάνονταν όταν το κ.σ.δ. της ορολογικής δοκιμής μεγάλωνε, στη μελέτη μας δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο αυτό (Πίνακας 1). Για τον περαιτέρω έλεγχο της ορθότητας των αποτελεσμάτων μας, διενεργήσαμε την ακόλουθη μελέτη προσομοίωσης.

Πίνακας 1. Η διάμεση τιμή (και 95% δ.α.) για τις E_u και E_i της καλλιέργειας κοπράνων (E_{uKK} και E_{iKK} , αντίστοιχα) σε διαφορετικά επιλεγμένα κ.σ.δ. της ELISA για τις αίγες και τα πρόβατα.

Κ.σ.δ.	Αίγες		Πρόβατα	
	E_{uKK}	E_{iKK}	E_{uKK}	E_{iKK}
1	8(2-20)	97,4(92,4-99,9)	15,9(0,2-49)	96,0(91,6-99,2)
0,9	9(2-20)	97,3(92,3-99,9)	15,9(0,2-49)	96,0(91,6-99,2)
0,8	9(2-20)	97,3(92,3-99,9)	15,9(0,2-49)	96,0(91,6-99,2)
0,7	8(2-19)	97,1(92,1-99,8)	15,1(0,2-47,3)	95,9(91,6-99,2)
0,6	8(2-19)	97,0(92,1-99,8)	14,5 (1,8-45,8)	95,9(91,6-99,2)
0,5	8(1,5-19)	97,0(91,8-99,8)	14,5 (1,8-45,8)	95,9(91,6-99,2)
0,4	7(1-18)	96,6(91,4-99,7)	12,6 (1,4-40,7)	95,7(91,3-98,8)
0,3	7(1-18)	96,5(91,4-99,7)	11,6(1,1-40,6)	95,7(91,3-99,0)
0,2	7(1-18)	96,8(91,5-99,8)	13,6 (1,5-44,6)	96,1(91,6-99,4)
0,1	7(0,5-17)	96,6(91,2-99,8)	11,4 (1,1-41,3)	95,8(91,2-99,2)
0	7(0,5-18)	97,1(92,1-99,8)	12,6(1,0-48,1)	96,1(91,1-99,6)

Υποθέσαμε την ύπαρξη δύο δοκιμών, μιας δδ1 με συνεχείς τιμές (π.χ. ELISA) και μιας με δύο διακριτές τιμές δδ2 (π.χ. μιας ΚΚ).

Για τα υγιή ζώα, οι τιμές της δδ1 θεωρήθηκε πως ακολουθούν μία βήτα κατανομή, B_{η} (2,9) και για τα προσβεβλημένα ζώα μια B_{η} (2,2). Αυτές οι B_{η} αντιστοιχούν σε πιο συχνή τιμή ίση με 0,1 και 0,5, και στα 95ο και 5ο εκατοστημόρια, 0,4 και 0,14, αντίστοιχα. Η πραγματική E_u και η E_i για τη δδ 1 μπορούν εύκολα να υπολογιστούν σε κάθε κ.σ.δ. με βάση τα εκατοστημόρια των κατανομών. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν τέσσερα πιθανά κ.σ.δ.: 0,1, 0,4, 0,7, και 0,9. Με βάση τα εκατοστημόρια των παραπάνω κατανομών, υπολογίστηκαν η E_u (0,972, 0,648, 0,216 και 0,005, αντίστοιχα) και η E_i (0,264, 0,953, 0,990 και 0,999, αντίστοιχα) για τη δδ1. Για τη δδ2, θεωρήθηκε πως τα υγιή ζώα είχαν ίση πιθανότητα, σε όλο το εύρος των τιμών της δδ1, με 0,980 να καταταγούν ορθώς. Η αντίστοιχη πιθανότητα για τα προσβεβλημένα ετέθη στο 0,400. Ως εκ τούτου, η δδ2 είχε $E_u= 0,400$ και $E_i= 0,980$. Η ίση πιθανότητα ανίχνευσης σε όλο το εύρος των τιμών της δδ1 ικανοποιεί την υπό συνθήκη ανεξαρτησία των δδ1 και δδ2.

Στη συνέχεια, παρήχθησαν 10.000 δεδομένα για δύο πληθυσμούς με τυχαία επιλογή Π προσβεβλημένων και (1- Π) υγιών ζώων. Για τον πληθυσμό 1 τέθηκε $\Pi=0,050$

και για τον πληθυσμό 2, $\Pi=0,200$. Τελικά, διαμορφώθηκε η κατανομή του συνδυασμού των αποτελεσμάτων των δδ1 και δδ2 στους πληθυσμούς 1 και 2 για κάθε κ.σ.δ. της δδ1. Ακολούθησε η ανάλυση αυτών των δεδομένων στο λογισμικό WinBUGS, υποθέτοντας την υπό συνθήκη ανεξαρτησία των δδ1 και δδ2. Για όλες τις παραμέτρους (Eu, Ei, Π) χρησιμοποιήθηκαν ομοιόμορφες εκ των προτέρων κατανομές, δηλαδή Βη (1, 1). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Οι πραγματικές τιμές και οι εκτιμήσεις για τη διάμεση τιμή (95% δ.α.) για την Eu και την Ei των δδ1 και δδ2 και για το πραγματικό ποσοστό προσβολής (Π) των πληθυσμών 1 και 2 σε διαφορετικά κ.σ.δ. της δδ 1.

κ.σ.δ.	Eu δδ1	Πραγματική τιμή
0,1	0,978(0,951-0,998)	0,972
0,4	0,662(0,606-0,723)	0,648
0,7	0,203(0,168-0,243)	0,216
0,9*	0,020(0,011-0,034)	0,050
Ei δδ1		
0,1	0,261(0,249-0,275)	0,264
0,4	0,954(0,946-0,966)	0,954
0,7	0,998(0,995-0,999)	0,990
0,9	0,999(0,997-1,000)	0,999
Eu δδ2		
0,1	0,414(0,318-0,589)	0,400
0,4	0,421(0,378-0,468)	0,400
0,7	0,391(0,343-0,449)	0,400
0,9	0,323(0,197-0,510)	0,400
Ei δδ2		
0,1	0,984 (0,978-0,991)	0,980
0,4	0,982(0,976-0,986)	0,980
0,7	0,979(0,972-0,987)	0,980
0,9	0,975(0,962-0,996)	0,980
Π 1		
0,1	0,056(0,033-0,088)	0,050
0,4	0,050(0,037-0,066)	0,050
0,7	0,048(0,030-0,069)	0,050
0,9	0,046(0,006-0,135)	0,050
Π 2		
0,1	0,201(0,137-0,269)	0,200
0,4	0,192(0,169-0,218)	0,200
0,7	0,204(0,169-0,242)	0,200
0,9	0,240(0,137-0,434)	0,200

*: Τα 95% CI's δεν περιλαμβάνουν την πραγματική τιμή

Τα αποτελέσματά αυτά επιβεβαιώνουν πως η Eu και η Ei της ΚΚ ορθώς παραμένουν σταθερές με την αλλαγή του κ.σ.δ. της ELISA. Σημαντικές μεταβολές στην Eu της ΚΚ ίσως εμφανιστούν όταν με την αλλαγή του κ.σ.δ., ανακύψει υπό συνθήκη

εξάρτηση των διαγνωστικών δοκιμών. Στη μελέτη μας, η υπό συνθήκη ανεξαρτησία των διαγνωστικών δοκιμών αξιολογήθηκε σε κάθε κ.σ.δ..

Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης καταδεικνύουν ότι όταν ισχύει η υπόθεση της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας, η Ευ και η Ει της δδ2 και τα πραγματικά ποσοστά προσβολής παραμένουν σταθερά, ανεξαρτήτως του κ.σ.δ. της δδ1. Σημαντική απόκλιση της εκτιμούμενης από την πραγματική τιμή παρατηρήθηκε μόνο όταν το κ.σ.δ. για την δδ1 ήταν 0,9. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στην τυχαία διακύμανση των δεδομένων που προσομοιώθηκαν και αριθμητικά ήταν λιγότερα ή περισσότερα από τα θεωρητικά αναμενόμενα με βάση την υπό συνθήκη ανεξαρτησία. Η κατανομή του συνδυασμού των αποτελεσμάτων των δδ1 και δδ2 που προσομοιώθηκαν ήταν ελαφρώς διαφορετική από τη θεωρητικά αναμενόμενη (Πίνακας 3). Επαναλαμβάνοντας την ανάλυση με τα θεωρητικά αναμενόμενα δεδομένα, οι εκτιμήσεις ήταν ταυτόσημες με τις πραγματικές τιμές (πίνακας 4).

Πίνακας 3. Προσομοιωθήσα (Α) και θεωρητικά αναμενόμενη (Β), με βάση την υπό συνθήκη ανεξαρτησία, κατανομή του συνδυασμού των δεδομένων των δδ1 και δδ2 στους Π1 και Π2.

Π1		A		B	
κ.σ.δ.		δδ1+	δδ1-	δδ1+	δδ1-
0.1	Δδ2+	340	45	334	56
	Δδ2-	7181	2434	7144	2466
0.4	Δδ2+	147	238	139	251
	Δδ2-	618	8997	626	8984
0.7	Δδ2+	40	345	45	345
	Δδ2-	73	9542	158	9452
0.9	Δδ2+	3	382	10	380
	Δδ2-	14	9601	15	9595
Π2		A		B	
κ.σ.δ.		δδ1+	δδ1-	δδ1+	δδ1-
0.1	Δδ2+	911	50	896	64
	Δδ2-	6960	2079	6936	2104
0.4	Δδ2+	546	415	525	435
	Δδ2-	1100	7939	1142	7898
0.7	Δδ2+	161	800	175	785
	Δδ2-	268	8771	337	8703
0.9	Δδ2+	17	944	40	920
	Δδ2-	40	8999	60	8980

Πίνακας 4. Πραγματικές τιμές και εκτιμήσεις για τη διάμεση τιμή (95% δ.α.) για την Ευ και την Ει των δδ1 και τα Π1 και Π2 σε διαφορετικά κ.σ.δ., μετά τη χρήση των δεδομένων της στήλης Β του Πίνακα 3.

κ.σ.δ.		Διάμεση τιμή (95% δ.α.)	Πραγματική τιμή
0,1	Ευ δδ1	0,971(0,938-0,997)	0,972
	Ευ δδ2	0,397(0,305-0,565)	0,400
	Ει δδ1	0,264(0,252-0,277)	0,264
	Ει δδ2	0,980(0,973-0,989)	0,980
	Π1	0,051(0,028-0,086)	0,050
	Π2	0,201(0,137-0,274)	0,200
0,4	Ευ δδ1	0,644(0,587-0,704)	0,648
	Ευ δδ2	0,397(0,355-0,442)	0,400
	Ει δδ1	0,954(0,946-0,964)	0,954
	Ει δδ2	0,980(0,975-0,986)	0,980
	Π1	0,052(0,038-0,069)	0,050
	Π2	0,202(0,177-0,230)	0,200
0,7	Ευ δδ1	0,212(0,172-0,256)	0,216
	Ευ δδ2	0,395(0,327-0,471)	0,400
	Ει δδ1	0,990(0,986-0,996)	0,990
	Ει δδ2	0,981(0,973-0,992)	0,980
	Π1	0,053(0,031-0,094)	0,050
	Π2	0,204(0,161-0,266)	0,200
0,9	Ευ δδ1	0,049(0,033-0,071)	0,050
	Ευ δδ2	0,403(0,301-0,543)	0,400
	Ει δδ1	0,999(0,997-1,000)	0,999
	Ει δδ2	0,980(0,968-0,997)	0,980
	Π1	0,051(0,018-0,102)	0,050
	Π2	0,200(0,135-0,288)	0,200

2.7. Βιβλιογραφία

1. Best, N.G., Cowles, M.K., Vines, S.K., 1995. CODA Manual Version 0.30. MRC Biostatistics Unit, Cambridge, UK.
2. Black, M.A., Craig, B.A., 2002. Estimating disease prevalence in the absence of a gold standard. *Stat. Med.* 21, 2653–2669.
3. Branscum A.J. , Gardner I.A., Johnson W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modelling. *Prev. Vet. Med.* 68, 145–163.
4. Clarke, C.J., Patterson, I.A., Armstrong, K.E., Low, J.C., 1996. Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *Vet Rec.* 139, 618-621.
5. Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridisation. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591–1596.
6. Collins, M.T., Sockett, D.C., 1993. Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc.* 203, 1456-1463.
7. Collins, M.T., Sockett, D.C., Ridge, S., Cox, J.C., 1991. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 29, 272-276.
8. Corpa, J.M., Garrido, J., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255-265.
9. Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J., 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis using IS900 RFLP. *Aus. Vet.* 78, 184-190.
10. de Juan L., Mateos, A., Dominguez, L., Sharp, J.M., Stevenson, K., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Mic.* 106, 249-257.
11. Dendukuri, N., Joseph, L., 2001. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics* 57, 158–167.
12. Dubash, K., Shulaw, W.P., Bech-Nielsen, S., Stills, H.F.Jr., Slemmons, R.D., 1995. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay licensed by the USDA for use in cattle for diagnosis of ovine paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 347-351.
13. Enøe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease status is unknown. *Prev. Vet. Med.* 45, 61–81.
14. Frossling, J., Bonnett, B., Lindberg, A., Bjo`rkman, C., 2003. Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. *Prev. Vet. Med.* 57, 141–153.
15. Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev. Vet. Med.* 45, 107-122.
16. Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Stat. Sci.* 7, 457– 511.
17. Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., Gardner, I.A., 2005. Sample size determination for estimation of the accuracy of two conditionally independent tests in the absence of a gold standard. *Prev. Vet. Med.* 71, 1-10.
18. Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., Gardner, I.A., Singh, R., 2003. Correlation-adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Appl. Stat.* 52, 63–76.
19. Green, E. P., Tizard M. L., Moss M. T., Thompson J., Winterbourne D. J., McFadden J. J., Hermon-Taylor J., 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17, 9063–9073.
20. Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Mic.* 37, 1746-1751.
21. Greiner, M., Gardner, I.A., 2000. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev. Vet. Med.* 45, 43-59.

22. Greiner, M., Pfeiffer, D., Smith, R.D., 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45, 23-41.
23. Hanley, J.A., McNeil, B.J., 1983. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Rad.* 148, 839-843.
24. Hilbink, F., West, D.M., de Lisle, G.W., Kittelberger, R., Hosie, B.D., Hutton, J., Cooke, M.M., Penrose, M., 1994. Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet Microbiol.* 41, 107-116.
25. Hope, A.F., Kluver, P.F., Jones, S.L., Condrón, R.J., 2001. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J.* 78, 850-856.
26. Hui, S.L., Walter, S.D., 1980. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 36, 167-171.
27. Johnson, W.O., Gastwirth, J.L., Pearson, L.M., 2001. Screening without a gold standard: the Hui-Walter paradigm revisited. *Am. J. Epidemiol.* 153, 921-924.
28. Joseph, L., Gyorkos, T.W., Coupal, L., 1995. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am J Epidemiol.* 141, 263-272.
29. Juste, R.A., Marco, J.C., Saez de Ocariz, C. and Aduriz, J.J., 1991. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 28, 385-390.
30. Manning, E.J., Kucera, T.E., Gates, N.B., Woods, L.M., Fallon-McKnight, M., 2003. Testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd. *J. Wildl. Dis.* 39, 323-328.
31. McNab, W.B., Meek, A.H., Duncan, J.R., Brooks, B.W., Van Dreumel, A.A., Martin, S.W., Nielsen, K.H., Sugden, E.A., Turcotte C., 1991. An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Can. J. Vet. Res.* 55, 252-259.
32. Molina, A., Morera, L., Llanes, D., 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Am. J. Vet. Res.* 52, 863-868.
33. Munjal, S.K., Boehmer, J., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K., Homuth, M., 2004. Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet Microbiol.* 103, 107-114.
34. National Research Council, 2003. Diagnosis and control of Johne's disease. The National Academies Press, Washington, D.C.
35. Nielsen, S.S., Grønbaek, C., Agger, J.F., Houe, H., 2002. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 53, 191-204.
36. Pavlik, I., Bejkova, L., Pavlas, M., Rozsypalova, Z., Koskova, S., 1995. Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.* 45, 311-318.
37. Perez, V., Tellechea, J., Badiola, J.J., Gutierrez, M., Garcia Marin, J.F., 1997. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res.* 58, 799-803.
38. Perez, V., Garcia Marin, J.F., Badiola, J.J., 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114, 107-122.
39. Raftery, A.L., Lewis, S., 1992. Comment: one long run with diagnostics: implementation strategies for Markov chain Monte Carlo. *Stat. Sci.* 7, 493-497.
40. Rajukumar, K., Tripathi, B.N., Kurade, N.P., Parihar, N.S., 2001. An enzyme-linked immunosorbent assay using immunofluorescence-purified antigen in the diagnosis of caprine paratuberculosis and its comparison with conventional ELISA's. *Vet. Res. Comm.* 25, 539-553.
41. Reddacliff, L.A., Vadali, A., Whittington, R.J., 2003. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet. Microbiol.* 95, 271-282.
42. Ridge, S.E., Morgan, I.R., Sockett, D.C., Collins, M.T., Condrón, R.J., Skilbeck, N.W., Webber, J.J., 1991. Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J.* 68, 253-257.

43. Saxegaard, F., 1990. Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* 102, 149-156.
44. Sergeant, E.S., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C., Whittington, R.J., 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61, 235-248.
45. Smith, R.D., 1995. Evaluation of diagnostic tests. In: *Veterinary Clinical Epidemiology. A Problem-Oriented Approach*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 31–43.
46. Sockett, C.D., Conrad, A.T., Thomas, B.C., Collins, T.M., 1992. Evaluation of Four Serological Tests for Bovine Paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1134-1139.
47. Spiegelhalter, D., Thomas, A., Best, N., Gilks W., 1996. BUGS: Bayesian Inference Using Gibbs Sampling, Version 0.50. MRC Biostatistics Unit, Cambridge. <http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>
48. Spiegelhalter, D. J., Best, N. G., Carlin, B. P., van der Linde, A., 2002. Bayesian measures of model complexity and fit (with discussion). *J. Roy. Statist. Soc. B.* 64, 583-640.
49. Staquet, M., Rozencweig, M., Lee, Y.J., Muggia, F.M., 1981. Methodology for the assessment of new dichotomous diagnostic tests. *J. Chronol. Dis.* 34, 599–610.
50. Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
51. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L., Spencer, P.A., 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 488-493.
52. Thoresen, O.F., Olsaker, I., 1994. Distribution and hybridization patterns of the insertion element IS900 in clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 293–303.
53. Toft, N., Jørgensen, E., Højsgaard, S., 2005. Diagnosing diagnostic tests: evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. *Prev. Vet. Med.* 68, 19–33.
54. Walter S.D. and Irwig L.M, 1988. Estimation of test error rates, disease prevalence and relative risk from misclassified data: a review. *J. Clin. Microbiol.* 41, 923–937.
55. Whipple, D.L., Kapke, P., Vary, C., 1990. Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2561–2564.
56. Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol.* 77, 387-398.
57. Whittington, R., Marsh, I., Choy, E., Cousins, D., 1998. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cel. Prob.* 12, 349-358.
58. Whittington, R.J., Eamens, G.J., Cousins, D.V., 2003. Specificity of absorbed ELISA and agar gel immuno-diffusion tests for paratuberculosis in goats with observations about use of these tests in infected goats. *Aust. Vet J.* 81, 71-75.
59. Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall D.J., Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1077–1083.
60. Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., Marsh, I., 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Micr.* 38, 3240-3248.
61. Whittington, R.J., Sergeant, E.S., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations. *Aus. Vet.* 79, 267-278.
62. Zweig, M.H., Campbell, G., 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 39, 561–577.

Κεφάλαιο 3

Εκτίμηση κατά Bayes τής ευαισθησίας και της ειδικότητας δύο μεθόδων καλλιέργειας κοπράνων για τη διάγνωση της παραφυματίωσης σε κλινικά υγιής αίγες και πρόβατα προσβεβλημένων εκτροφών με την εφαρμογή ενός ημι-εξαρτώμενου μοντέλου λανθάνουσας κατάστασης

Π. Κωστούλας¹, Λ. Λεοντίδης¹, Χ. Μπιλλίνης², Μ. Φλώρου¹

¹Εργαστήριο Επιδημιολογίας, Βιοστατιστικής και Οικονομίας Ζωικής Παραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 43100 Καρδίτσα, Ελλάδα.

²Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Κτηνιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 43100 Καρδίτσα, Ελλάδα.

Έγινε δεκτό για δημοσίευση στο περιοδικό Preventive Veterinary Medicine

3.1. Περίληψη

Σε αυτή τη μελέτη, συγκρίναμε το ποσοστό των απομονώσεων *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) από την καλλιέργεια δειγμάτων κοπράνων προερχομένων από κλινικά υγιείς αίγες και πρόβατα προσβεβλημένων εκτροφών, μεταξύ δύο καλλιεργητικών μεθόδων, της μίας σε υπόστρωμα Herrold's Egg Yolk (HEYM) και της άλλης σε Lowenstein-Jensen (LJ). Εν συνεχεία, εκτιμήσαμε την ευαισθησία (Eu) και την ειδικότητα (Ei) των δύο μεθόδων, χωριστά στις αίγες και τα πρόβατα, με τη χρήση μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης που επιλύθηκαν με την κατά Bayes μεθοδολογία. Διερευνήθηκε η πιθανότητα της υπό συνθήκη εξάρτησης των διαγνωστικών δοκιμών, μέσω της σύγκρισης μοντέλων που υπέθεταν την ανεξαρτησία, με μοντέλα που ελάμβαναν υπόψη την εξάρτηση των διαγνωστικών δοκιμών μεταξύ των υγιών και των προσβεβλημένων ζώων.

Το ποσοστό απομονώσεων στο HEYM ήταν σημαντικά μεγαλύτερο ($P=0,04$) από το LJ. Η συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων ήταν ιδιαίτερα φτωγή και μη στατιστικά σημαντική (ζυγισμένη τιμή $kappa=0,062$ (95% διάστημα εμπιστοσύνης: $-0,098-0,222$)). Δε υπήρχε εξάρτηση μεταξύ των Eu των δύο διαγνωστικών δοκιμών. Οι Ei τους, όμως, είχαν θετική συσχέτιση. Επομένως δημιουργήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ένα ημι-εξαρτώμενο μοντέλο, που υπέθετε την ανεξαρτησία των Eu και ελάμβανε υπόψη την εξάρτηση των Ei. Οι εκτιμήσεις αυτού του μοντέλου για τις διάμεσες τιμές και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας (δ.α.) για τις Eu_{HEYM} , Ei_{HEYM} , Eu_{LJ} , Ei_{LJ} ήταν 8,4% (95%δ.α.:0,8-37,1%), 96,7% (93,6-99,3%), 5,1% (0,3-22,9%), 98,6% (96,2-99,7%) στα πρόβατα, ενώ ήταν 12,4% (4,1-29,9%), 98,7% (96,1-99,8%), 3,4% (0,2-14,2%), 98,2% (95,7-99,6%) στις αίγες, αντίστοιχα. Η παράλληλη ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων έδωσε $Eu_{παρ}$, $Ei_{παρ}$ ίση με 14,7% (2,7-44,7%), 95,5% (92,1-98,3%) στα πρόβατα, και 16,1% (6,2-36,3%), 97,3% (94,2-99,1%) στις αίγες, αντίστοιχα. Η Eu των μεθόδων καλλιέργειας κοπράνων στις υποκλινικά προσβεβλημένες αίγες και πρόβατα ήταν χαμηλή, ενώ η Ei τους σχεδόν απόλυτη. Η ταυτόχρονη χρήση των δύο μεθόδων και η παράλληλη ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους βελτίωσαν την Eu με ελάχιστη μείωση της Ei.

Λέξεις-κλειδιά: παραφυματίωση, Herrold's egg yolk, Lowenstein Jensen, μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης, υπό συνθήκη ημι-εξάρτηση, κατά Bayes μεθοδολογία επίλυσης.

3.2. Εισαγωγή

Σε ορισμένες βιβλιογραφικές αναφορές, η καλλιέργεια κοπράνων (ΚΚ) έχει εσφαλμένα θεωρηθεί ως αλάνθαστη διαγνωστική δοκιμή αναφοράς για την ανίχνευση της λοίμωξης από *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (National Research Council, 2003). Η υπόθεση αυτή είναι εσφαλμένη, δεδομένου ότι στα αρχικά στάδια η λοίμωξη δεν μπορεί να ανιχνευθεί από την ΚΚ (Whitlock and Buergelt, 1996) ενώ στα μεταγενέστερα η απέκκριση μπορεί να είναι διαλείπουσα ή να κατανέμεται ανομοιόμορφα στη μάζα των κοπράνων, με αποτέλεσμα και πάλι να υπάρχουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Whittington and Sergeant, 2001). Η λοίμωξη με MAP κατά τα πρώιμα στάδια μπορεί να μην ανιχνευθεί ακόμα και με την ιστοπαθολογική εξέταση, επειδή τα μυκοβακτηρίδια δεν έχουν ακόμα προκαλέσει ανιχνεύσιμες παθολογοανατομικές αλλοιώσεις (Whittington et al., 1999; Nielsen et al., 2002). Αυτή η ανυπαρξία, στην ουσία, αλάνθαστης διαγνωστικής δοκιμής ιδιαίτερα στα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα, εξηγεί την ύπαρξη ελάχιστων εκτιμήσεων ευαισθησίας (Eu) και ειδικότητας (Ei) για την ΚΚ, μόνο στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες (Sockett et al., 1992; Stabel, 1997; Whitlock et al., 2000; Eamens et al., 2000), και την απουσία ανάλογων μελετών στις αίγες και τα πρόβατα. Ειδικά όταν δεν υπάρχει αλάνθαστη διαγνωστική δοκιμή αναφοράς, τα μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης παρέχουν έναν αποτελεσματικό εναλλακτικό τρόπο εκτίμησης της Eu και της Ei των διαγνωστικών δοκιμών. Τα μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης προτάθηκαν για πρώτη φορά από τους Hui and Walter (1980), ενώ πρόσφατα έγινε εκτενής ανασκόπησή τους από τους Enoe et al. (2000). Τα τρία τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να αναπτύσσεται στις βιολογικές επιστήμες η επίλυσή τους με τη μεθοδολογία κατά Bayes. Η χρήση αυτής της μεθοδολογίας, που πρόσφατα περιγράφηκε από τους Branscum et al. (2005), εμφανίζει το πλεονέκτημα της ενσωμάτωσης εκ των προτέρων πληροφοριών για τις προς εκτίμηση παραμέτρους και επιτρέπει την εύκολη διερεύνηση της υπόθεσης της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας. Ο έλεγχος της ισχύος της τελευταίας αυτής υπόθεσης παίζει καθοριστικό ρόλο στην ορθότητα των εκτιμήσεων της Eu και της Ei, ιδίως όταν οι διαγνωστικές δοκιμές στηρίζονται στην ίδια βιολογική αρχή και είναι πιθανότερο να είναι υπό συνθήκη εξαρτημένες (Gardner et al., 2000; Enoe et al., 2000; Georgiadis et al., 2003; Toft et al., 2005).

Οι υπάρχουσες εκτιμήσεις για την αξιοπιστία της ΚΚ αφορούν τα βοοειδή. Δε θα ήταν φρόνιμο να υιοθετήσουμε τις εκτιμήσεις αυτές για τα πρόβατα και τις αίγες από τη στιγμή που τα πρόβεια και κάποια στελέχη των αιγών (de Juan et al., 2005) έχουν διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης στα τεχνητά υποστρώματα (Collins et al., 1990; Juste et al., 1991; Marsh and Whittington, 2005) και δυναμικά επηρεάζονται με διαφορετικό τρόπο από τα πρωτόκολλα απομάκρυνσης των επιμολύνσεων (Reddacliff et al., 2003). Επιπλέον, διαφορετικά στελέχη, που ενδεχομένως έχουν διαφορετική λοιμογόνο δύναμη (Saxegaard 1990), απαντώνται στα πρόβατα και τις αίγες (Stevenson et al., 2002; de Juan L et al., 2005) και μπορεί να επηρεάζουν την αξιοπιστία των διαγνωστικών δοκιμών. Γι αυτό θα ήταν λάθος να μην εκτιμάται η αξιοπιστία τους χωριστά στο κάθε είδος ζώου.

Στην παρούσα μελέτη, συγκρίθηκε το ποσοστό των απομονώσεων του MAP από την καλλιέργεια δειγμάτων κοπράνων σε υπόστρωμα Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM) και Lowenstein-Jensen (LJ) και εκτιμήθηκαν η Eu και η Ei των δύο μεθόδων ΚΚ χωριστά, σε κλινικά υγιείς αίγες και πρόβατα προσβεβλημένων εκτροφών, με τη χρήση μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης και μεθοδολογίας εκτίμησης κατά Bayes. Η

πιθανότητα εξάρτησης των Ευ και των Ει διερευνήθηκε, και όπου υπήρχε, ελήφθη υπόψη.

3.3. Υλικά και μέθοδοι.

3.3.1. Ορισμός της λοίμωξης

Και οι δύο διαγνωστικές δοκιμές που χρησιμοποιήθηκαν στοχεύουν στην ανίχνευση της απέκκρισης του MAP με τα κόπρανα. Επομένως, υιοθετήσαμε – μετά από τροποποιήσεις – τον ορισμό της λοίμωξης με MAP όπως διατυπώθηκε από τους Nielsen et al. (2002), στα βοοειδή. Με τον όρο λοίμωξη εννοούμε πως τα πρόβατα ή οι αίγες φέρουν τα μυκοβακτηρίδια ενδοκυτταρικά. Ο πολλαπλασιασμός σε μεγάλους αριθμούς του μικροοργανισμού δεν είναι απαραίτητο να συμβαίνει επειδή η λοίμωξη μπορεί να είναι λανθάνουσα.. Υποθέτουμε πως από τη στιγμή που εγκαθίσταται η λοίμωξη, παραμένει εφ' όρου ζωής. Συνεπώς, με βάση τον ορισμό αυτό, το προσβεβλημένο ζώο θα απεκκρίνει κάποια στιγμή της ζωής του MAP με τα κόπρανα.

3.3.2. Υπό μελέτη πληθυσμός

Τέσσερα κοπάδια προβάτων και αιγών, με μεγέθη που κυμαίνονται από 250 έως 350 ζώα, επελέγησαν γι' αυτήν τη μελέτη. Ένα από τα κοπάδια αποτελείτο από πρόβατα, ένα από αίγες και δύο ήταν μεικτά, με αναλογία προβάτων-αιγών, το ένα 60-40% και το άλλο 40-60%. Όλα τα κοπάδια είχαν ιστορικό κλινικής παραφυματίωσης και δεν είχαν ποτέ εμβολιαστεί κατά του MAP. Οι αίγες και τα πρόβατα ήταν διασταυρώσεις διαφόρων εγχώριων φυλών (π.χ. Capra prisca, Χίου, Καραγκούνικο). Τα ζώα εκτρέφονταν ημι-εκτατικά. Κύριος στόχος ήταν η παραγωγή γάλακτος. Τα ζώα έβοσκαν στους λειμώνες κατά τη μεγαλύτερη διάρκεια του έτους και ταΐζονταν πρόσθετα με συμπυκνωμένες τροφές. Περνούσαν το μεγαλύτερο μέρος της ημέρας στην ύπαιθρο και επέστρεφαν στους στάβλους κατά τη διάρκεια της νύχτας.

3.3.3. Δειγματοληψία

Σε κάθε εκτροφή επιλέχθηκαν τυχαία (με λίστα τυχαίων αριθμών από τον υπολογιστή) εκατό κλινικά υγιή ζώα (χωρίς κλινικές εκδηλώσεις ενδεικτικές παραφυματίωσης: χρόνια η διαλείπουσα διάρροια, απώλεια βάρους μη ανταποκρινόμενη σε ανθελμινθική ή αντιμικροβιακή θεραπεία), αφού αποκλείστηκαν ζώα ηλικίας μικρότερης του 1,5 έτους. Από κάθε ζώο συλλέχθηκαν από το απευθυσμένο περίπου 10 γραμμάρια κοπράνων.

3.3.4. Διαγνωστικές δοκιμές

3.3.4.1 Η μέθοδος HEYM

Τα κόπρανα καλλιεργήθηκαν μετά από μικρή τροποποίηση ενός πρωτοκόλλου που περιγράφηκε σε πρόσφατες μελέτες (Greig et al., 1999). Εν συντομία, 1 με 2 γραμ. κοπράνων ομογενοποιήθηκαν για 30-60 δευτερόλεπτα με 10 ml αποστειρωμένου νερού, μέσω της χρήσης τεχνητού στομάχου (Colworth Stomacher 80, Seward Medical). Για την

απομάκρυνση των επιμολύνσεων από το ομογενοποιημένο μείγμα προστέθηκαν 10ml hexadecyl pyridinium chloride (Sigma-Aldrich), πυκνότητας 1,5%. Στη συνέχεια, το μείγμα αφέθηκε σε όρθια θέση για όλο το βράδυ, σε θερμοκρασία δωματίου. Την επόμενη μέρα, το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα και φυγοκεντρήθηκε στις 3.000 στροφές ανά λεπτό, για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C. Το σχηματισθέν ίζημα διαλύθηκε εκ νέου σε 10 ml αποστειρωμένου ύδατος. Η φυγοκέντρωση επαναλήφθηκε και το σχηματισθέν ίζημα διαλύθηκε σε 1 ml αποστειρωμένου ύδατος. Το εναίωρημα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάκια μικροφυγοκέντρου και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στροφές ανά λεπτό, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το σχηματισθέν ίζημα ομογενοποιήθηκε με 0,5 ml αποστειρωμένου ύδατος. Από κάθε εναίωρημα, 0,1 ml ενοφθαλμίστηκαν σε δύο σωλήνες με υπόστρωμα Herrold's Egg Yolk, εμπλουτισμένο με μυκοβακτήνη και αντιβιοτικά (Becton Dickinson product code: 222233).

3.3.4.2 Η μέθοδος LJ

Τα κόπρανα καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφηκε σε πρόσφατες μελέτες (Whitlock and Rosenberger, 1990). Εν συντομία, 1 με 2 γραμ. κοπράνων ομογενοποιήθηκαν για 30-60 δευτερόλεπτα με 10 ml αποστειρωμένου νερού, με τη χρήση τεχνητού στομάχου (Colworth Stomacher 80, Seward Medical). Για την απομάκρυνση των επιμολύνσεων, το ομογενοποιημένο μείγμα μεταφέρθηκε σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιείχε 25ml hexadecyl pyridinium chloride (Sigma-Aldrich), πυκνότητας 0,9%, σε θρεπτικό υπόστρωμα BHI (Oxoid), και αφέθηκε σε όρθια θέση, στους 37 °C, για 24 ώρες. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα και φυγοκεντρήθηκε στις 1.000 στροφές ανά λεπτό, για 30 λεπτά. Το σχηματισθέν ίζημα διαλύθηκε εκ νέου σε 1 ml BHI, που περιείχε βανκομυκίνη (100 mg/ml), ναλιδίξικό οξύ (100 mg/ml) και αμφοτερικίνη B (50 mg/ml) (όλα αντιβιοτικά της Sigma). Το μείγμα αυτό επώαστηκε για 48 ώρες στους 37°C. Ακολούθως, διαιρέθηκε σε τρία τμήματα των 300 μl (6 σταγόνες) περίπου και ενοφθαλμίστηκε σε τρεις σωλήνες που περιείχαν υπόστρωμα LJ, στους δύο εμπλουτισμένο με μυκοβακτήνη και πυρουβικό και στον ένα χωρίς.

3.3.4.3 Ανάγνωση των αποτελεσμάτων και επιβεβαίωση της ανάπτυξης του MAP

Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 30 εβδομάδες, στους 37°C. Για την επιβεβαίωση του είδους των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν, DNA από τις καλλιέργειες αποσπάστηκε και ελέγχθηκε για την παρουσία της ειδικής του MAP ένθετης ακολουθίας IS900 (Green et al., 1989). Πριν την ΚΚ, τα δείγματα χωρίστηκαν σε ισομερή τμήματα και κωδικοποιήθηκαν με διαφορετικό κωδικό. Έτσι, οι ερευνητές που ασχολήθηκαν με την ΚΚ και τις διαδικασίες επιβεβαίωσης της ανάπτυξης του MAP δεν είχαν τη δυνατότητα να διασταυρώσουν τα αποτελέσματά τους.

3.3.5. Σύγκριση του ποσοστού των απομονώσεων του MAP και μέτρηση της συμφωνίας μεταξύ HEYM και LJ

Η ανάπτυξη του MAP αξιολογήθηκε μόνο για τα δείγματα που ήταν θετικά μετά από επώαση 30 εβδομάδων. Οι καλλιέργειες με επιμόλυνση δεν αξιολογήθηκαν. Η σύγκριση του ποσοστού των απομονώσεων μεταξύ των δύο ΚΚ έγινε με τη δοκιμή

McNemar. Η συμφωνία μεταξύ των ΚΚ αξιολογήθηκε με βάση την τιμή του ζυγισμένου kappa.

3.3.6. Εκτίμηση κατά Bayes της E_u και της E_i του HEYM και του LJ στα πρόβατα και τις αίγες

3.3.6.1 Μοντέλα και έλεγχος υποθέσεων

Χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης (Hui and Walter 1980; Vacek 1985; Walter and Irwig 1988; Enoe et al., 2000), ενώ προτιμήθηκε η κατά Bayes μεθοδολογία επίλυσής τους (Johnson et al., 2001; Dendukuri and Joseph, 2001; Branscum et al., 2005). Οι εκτιμήσεις των E_u και των E_i για το HEYM και το LJ (E_{uHEYM} , E_{iHEYM} , E_{uLJ} και E_{iLJ} , αντίστοιχα) στηρίχτηκαν στην κατανομή του συνδυασμού των αποτελεσμάτων των δύο δοκιμών σε τρεις υπο-πληθυσμούς αιγών και τρεις υπο-πληθυσμούς προβάτων.

Η ορθή χρήση των μοντέλων προϋποθέτει την ισχύ τριών ουσιαστικών υποθέσεων: (α) Οι διαγνωστικές δοκιμές πρέπει να είναι υπό συνθήκη ανεξάρτητες μεταξύ τους (Gardner et al., 2000), ειδάλως πρέπει να χρησιμοποιούνται μοντέλα που λαμβάνουν υπόψη την πιθανότητα της υπό συνθήκη εξάρτησης των διαγνωστικών δοκιμών (Enoe et al., 2000; Branscum et al., 2005), (β) ο πληθυσμός αναφοράς πρέπει να απαρτίζεται από δύο ή περισσότερους υπο-πληθυσμούς με διαφορετικό πραγματικό ποσοστό προσβολής (Π), και (γ) μεταξύ των υπο-πληθυσμών αυτών, η E_u και η E_i των διαγνωστικών δοκιμών θα πρέπει να μη διαφέρουν (Hui and Walter, 1980). Η ισχύς των τριών αυτών υποθέσεων ελέγχθηκε ως εξής:

α. Υπό συνθήκη ανεξαρτησία των διαγνωστικών δοκιμών

Επειδή οι δύο διαγνωστικές δοκιμές βασίζονται στην ίδια βιολογική αρχή, υπήρχε έντονος προβληματισμός για την ισχύ αυτής της υπόθεσης. Ως εκ τούτου, αρχικά χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο της υπό συνθήκη εξάρτησης (Dendukuri and Joseph, 2001) και στη συνέχεια το μοντέλο της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας (Johnson et al., 2001) των διαγνωστικών δοκιμών. Το μοντέλο των Dendukuri and Joseph (2001) προτιμήθηκε έναντι άλλων επειδή ενσωματώνει άμεσα το συντελεστή συσχέτισης των E_u (γ_{E_u}) και των E_i (γ_{E_i}) των δύο διαγνωστικών δοκιμών (Branscum et al., 2005). Τροποποιήσαμε τα δύο αυτά μοντέλα για τη χρήση τους στην ανάλυση των δεδομένων της παρούσας μελέτης (τα μοντέλα για την ανάλυση δεδομένων που προέρχονται από την ταυτόχρονη εφαρμογή δύο διαγνωστικών δοκιμών σε δύο υπο-πληθυσμούς, πρόσφατα ανασκοπήθηκαν από τους Branscum et al. (2005)).

Η υπόθεση της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας ελέγχθηκε με δύο τρόπους: (α) Από την εφαρμογή του μοντέλου της υπό συνθήκη εξάρτησης, υπολογίστηκαν οι γ_{E_u} και γ_{E_i} και τα αντίστοιχα 95% διαστήματα αξιοπιστίας (δ.α.), και (β) υπολογίστηκε το κριτήριο απόκλισης (DIC), τόσο για το μοντέλο της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας όσο και γι' αυτό της εξάρτησης. Αν τα δ.α. περιλαμβάνουν την τιμή μηδέν (Gardner et al., 2000) και η διαφορά του DIC των δύο μοντέλων είναι μικρότερη του 2 (Spiegelhalter et al., 2002), δεν μπορεί να απορριφθεί η υπόθεση της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας των διαγνωστικών δοκιμών. Η διαφορά του DIC των δύο μοντέλων ήταν μικρότερη του 2, πράγμα το οποίο

σημαίνει πως τα δύο μοντέλα ταίριαζαν στα δεδομένα εξίσου καλά (Spiegelhalter et al., 2002). Επιπλέον, τα 95% δ.α. για το γ_{E_D} περιελάμβαναν το μηδέν, καταδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό την ανεξαρτησία των E_U . Όσον αφορά, όμως, τον γ_{E_I} , αν και, σε ορισμένες περιπτώσεις, το αριστερό όριο του 95% δ.α. ήταν ίσο με μηδέν, το 5ο εκατοστημόριο της εκ των υστέρων κατανομής του ήταν πάντα θετικό. Αυτό σημαίνει πως υπήρχε 95% εκ των υστέρων πιθανότητα θετικής συσχέτισης των αποτελεσμάτων των ΚΚ στα υγιή ζώα. Με βάση αυτά τα ευρήματα υιοθετήθηκε τελικά ένα ημι-εξαρτώμενο μοντέλο που ενσωμάτωνε μόνο τον γ_{E_I} (βλ. παράρτημα).

β. Υπόθεση της διαφοράς στο πραγματικό ποσοστό προσβολής

Ζητήθηκε από τον εποπτεύοντα κτηνίατρο να κατατάξει τα κοπάδια με βάση το ποσοστό εμφάνισης χρόνιας επαναλαμβανόμενης διάρροιας, που είναι ενδεικτική του ποσοστού προσβολής από παραφυματίωση. Με βάση την ταξινόμησή του, διαμορφώθηκαν τρεις υπο-πληθυσμοί προβάτων και τρεις αιγών, στους οποίους αναμενόταν το πραγματικό ποσοστό προσβολής από παραφυματίωση να είναι χαμηλό, μέσο, και υψηλό (υποπληθυσμοί με ποσοστό εμφάνισης κλινικής εικόνας συμβατής με παραφυματίωση 1-2%, 5% και >10%, αντίστοιχα).

γ. Υπόθεση της όμοιας E_U και E_I μεταξύ των πληθυσμών

Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης, αναλύσαμε ξεχωριστά όλα τα πιθανά ζευγάρια των υπο-πληθυσμών. Επομένως, επαναλάβαμε την ανάλυση τρεις φορές. Κάθε φορά, η δομή του μοντέλου και οι εκ των προτέρων πληροφορίες που ενσωματώθηκαν σε αυτό ήταν ίδιες με τη δομή και τις εκ των προτέρων πληροφορίες που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση των τριών υπο-πληθυσμών μαζί. Οι εκτιμήσεις της E_U και της E_I από τις αναλύσεις όλων των ζευγών ήταν ανάλογες με τις εκτιμήσεις από την ανάλυση των τριών υπο-πληθυσμών, υποδεικνύοντας έτσι ότι η υπόθεση της όμοιας E_U και E_I μεταξύ των υπο-πληθυσμών ίσχυε, τόσο στα πρόβατα όσο και στις αίγες.

3.3.6.2. Εκτίμηση του μεγέθους της εξάρτησης των E_I

Επειδή ο γ_{E_I} αποτελεί μέτρο της απόλυτης τιμής και όχι του βαθμού βαρύτητας της εξάρτησης, χρήσιμο είναι να υπολογίζεται το ποσοστό της εξάρτησης ($R\gamma_{E_I}$) σε σχέση με τη μέγιστη δυνατή εξάρτηση που μπορεί να παρατηρηθεί (Gardner et al., 2000). Η μέγιστη δυνατή εξάρτηση για το γ_{E_I} είναι $M = \min(E_{I_{HEYM}}*(1-E_{I_L}), E_{I_L}*(1-E_{I_{HEYM}}))$. Η διάμεση τιμή και το 95% δ.α. του $R\gamma_{E_I}$ υπολογίστηκαν με βάση το δειγματολόγητο

$$\text{Gibbs ως: } R\gamma_{E_I} = \frac{\gamma_{E_I}}{M} 100\% .$$

3.3.6.3 Παράλληλη ερμηνεία των ΚΚ

Από τη στιγμή που υπήρχε ανεξαρτησία των E_U , ήταν δόκιμο, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η E_U της ανίχνευσης υποκλινικά προσβεβλημένων ζώων που

απεκκρίνουν το MAP, να εφαρμοστεί η παράλληλη ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δύο ΚΚ. Κατά την παράλληλη ερμηνεία, ένα ζώο θεωρήθηκε θετικό αν ήταν θετικό σε τουλάχιστον μία από τις δύο ΚΚ και αρνητικό αν ήταν αρνητικό και στις δύο ΚΚ. Η ευαισθησία ($E_{\text{παρ}}$) και η ειδικότητα ($E_{\text{ιπαρ}}$) της παράλληλης ερμηνείας υπολογίστηκαν με βάση το δειγματολήπτη Gibbs ως: $E_{\text{παρ}}=1-(1-E_{\text{LJ}})*(1-E_{\text{HEYM}})$ και $E_{\text{ιπαρ}}=E_{\text{LJ}}*E_{\text{HEYM}}+\gamma_{E_i}$ (Gardner et al., 2000).

3.3.6.4. Εκ των προτέρων πληροφορίες και ανάλυση ευαισθησίας

Για την ενσωμάτωση εκ των προτέρων πληροφοριών στο μοντέλο για τις προς εκτίμηση παραμέτρους (τις E_{U} , τις E_{I} και το πραγματικό ποσοστό προσβολής σε κάθε υπο-πληθυσμό) χρησιμοποιήθηκαν κατανομές βήτα, B_{η} (α, β). Οι ίδιες κατανομές χρησιμοποιήθηκαν για το μοντέλο της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας και εξάρτησης και για τα δύο είδη ζώων. Εξαιτίας της απουσίας ανάλογων μελετών για τις αίγες και τα πρόβατα, για τις E_{U} των ΚΚ χρησιμοποιήθηκαν κατανομές που δεν παρείχαν καμία εκ των προτέρων πληροφορία και απέδιδαν ίση πιθανότητα σε κάθε τιμή από το 0 έως το 1. Δεδομένης της αδιαμφισβήτητη σχεδόν απόλυτης E_{I} των ΚΚ (Πίνακας 1) στα βοοειδή, οι εκ των προτέρων κατανομές τους βασίστηκαν στα δεδομένα αυτά. Και για τις δύο ΚΚ, η πιο πιθανή τιμή για την E_{IKK} τέθηκε στο 0,98 και ήμασταν 95% βέβαιοι πως δεν ήταν μικρότερη από 0,95. Τα στοιχεία αυτά αντιστοιχούν σε μια κατανομή B_{η} (100, 2). Οι πιο πιθανές τιμές για τα πραγματικά ποσοστά προσβολής (Π) στους υπο-πληθυσμούς με χαμηλό, μέτριο και υψηλό Π τέθηκαν στα 3, 25 και 50%, αντίστοιχα, ενώ ήμασταν 95% βέβαιοι ότι δεν ήταν περισσότερο από 10 και 55% στους υπο-πληθυσμούς με χαμηλό και μέτριο Π , καθώς και ότι δεν ήταν λιγότερο από 30% στον υπο-πληθυσμό με υψηλό Π . Οι αντίστοιχες κατανομές ήταν B_{η} (2,84, 56,40), B_{η} (3,09, 7,25), και B_{η} (8,11, 7,91).

Προκειμένου να αξιολογηθεί η επιρροή της ενσωμάτωσης διαφορετικών εκ των προτέρων πληροφοριών (Joseph et al., 1995; Enoe et al., 2000; Georgiadis et al., 2003; Branscum et al., 2005) στις εκτιμήσεις των μοντέλων, η ανάλυση επαναλήφθηκε με τη χρήση δύο διαφορετικών ομάδων εκ των προτέρων πληροφοριών: (I) Ομοιόμορφες κατανομές που δεν παρείχαν καμία πληροφορία για τις E_{U} και τις E_{I} , B_{η} (1,1), και οι ίδιες κατανομές για τα Π που χρησιμοποιήθηκαν στην κύρια ανάλυση, και (II) ομοιόμορφες κατανομές, B_{η} (1,1), που δεν παρείχαν καμία πληροφορία για τις E_{U} , οι ίδιες με την κύρια ανάλυση κατανομές για τις E_{I} , και, τέλος, κατανομές για τα Π με ευρύτερα όρια απ' αυτά της κύριας ανάλυσης. Αυτές ήταν: Για τον υπο-πληθυσμό με χαμηλό Π , μία ομοιόμορφη εκ των προτέρων κατανομή με εύρος από 0 έως 50%, για τον υπο-πληθυσμό μέτριου και υψηλού Π , μια κατανομή με πιο πιθανή τιμή το 25 και το 75%, αντίστοιχα, και 95ο και 5ο εκατοστημόριο ίσο με 65 και 35%, αντίστοιχα. Τα στοιχεία αυτά αντιστοιχούν στις κατανομές B_{η} (1,1), που είναι ορισμένη από το 0 έως το 50%, B_{η} (2, 4) και B_{η} (4, 2).

Τέλος, για το μοντέλο της υπό συνθήκη εξάρτησης και της υπό συνθήκη ημι-εξάρτησης, χρησιμοποιήθηκαν ομοιόμορφες κατανομές που απέδιδαν ίση πιθανότητα σε όλο το εύρος τιμών των $\gamma_{E_{\text{U}}}$ και $\gamma_{E_{\text{I}}}$. Το εύρος τιμών των $\gamma_{E_{\text{U}}}$ και $\gamma_{E_{\text{I}}}$, εξ ορισμού εξαρτάται από τις τιμές των E_{U} και E_{I} . Τα όρια για τους $\gamma_{E_{\text{U}}}$ και $\gamma_{E_{\text{I}}}$ είναι $\max(-(1-E_{\text{HEYM}})*(1-E_{\text{LJ}}), -E_{\text{HEYM}}*E_{\text{LJ}}) \leq \gamma_{E_{\text{U}}} \leq \min(E_{\text{HEYM}}*(1-E_{\text{LJ}}), E_{\text{LJ}}*(1-E_{\text{HEYM}}))$ και $\max(-(1-$

$E_{i_{HEYM}}*(1-E_{i_{LJ}}), -E_{i_{HEYM}}*E_{i_{LJ}} \leq \gamma_{Ei} \leq \min (E_{i_{HEYM}}*(1-E_{i_{LJ}}), E_{i_{LJ}}*(1-E_{i_{HEYM}})),$
 αντίστοιχα (Gardner et al., 2000).

Ο έλεγχος της υπόθεσης (α) επαναλήφθηκε για κάθε διαφορετική ομάδα εκ των προτέρων πληροφοριών που εισήχθησαν στο μοντέλο. Σε όλες τις περιπτώσεις, το μοντέλο της ημι-εξάρτησης ήταν η ενδεδειγμένη επιλογή.

Πίνακας 1. Οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία για την ευαισθησία (Eu) και την ειδικότητα (Ei) της καλλιέργειας κοπράνων (ΚΚ) για τη διάγνωση της παραφυματίωσης στα βοοειδή.

Αναφορά	ΚΚ
Nielsen et al., 2002	Eu=20-73% Ei > 98%
Sockett et al., 1992	Eu =45-73% Ei > 99%
Whitlock et al., 2000	Eu=42% Ei > 99%

3.3.6.5. Έλεγχος της σύγκλισης τιμών

Καμία μέθοδος ελέγχου της σύγκλισης των τιμών κατά την εφαρμογή της μεθοδολογίας επίλυσης κατά Bayes δεν είναι αλάνθαστη. Για το λόγο αυτό προτείνεται ο συνδυασμός διαφορετικών τεχνικών, και επιπλέον, αφενός η επισκόπηση της ακολουθίας των τιμών της Monte Carlo μαρκοβιανής αλυσίδας (Markov Chain Monte Carlo, MCMC), αφετέρου ο έλεγχος της μορφής των εκ των υστέρων κατανομών και των περιγραφικών στατιστικών των εκ των υστέρων κατανομών (Best et al., 1995). Χρησιμοποιήσαμε συνδυασμό των υπαρχουσών μεθόδων (Heidelberger and Welch, 1983; Raftery and Lewis, 1992; Gelman and Rubin 1992), οι οποίες δεν κατέδειξαν προβλήματα στη σύγκλιση των τιμών.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα της μεθόδου των Raftery and Lewis υπέδειξαν ότι σε όλες τις περιπτώσεις, 49.500 επαναλήψεις του δειγματολήπτη Gibbs μετά από μια φάση προσαρμογής 500 επαναλήψεων ήταν αρκετές για να αποκτήσουμε, με 95% βεβαιότητα, ακρίβεια $\pm 0,01$ για την εκτίμηση του 2,5ου και 97,5ου εκατοστημορίου των παραμέτρων.

3.3.6.6. Λογισμικό

Η δοκιμή McNemar και ο υπολογισμός της kappa διενεργήθηκαν στο λογισμικό StatXact, έκδοση 4.0.1 για τα Windows (Cytel Software Corporation, 1999). Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε στο 5%.

Για τα μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό WinBUGS (Spiegelhalter et al., 1996). Το ίδιο πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της μεθόδου Gelman and Rubin και τον έλεγχο των αυτοσυσχετίσεων. Για τη μέθοδο των Raftery and Lewis, χρησιμοποιήσαμε το R-CODA (Best et al., 1996).

Πρόκειται για μια ομάδα λειτουργιών R-Plus, που λειτουργεί ως επεξεργαστής των παραγομένων από το WinBUGS δεδομένων.

3.4. Αποτελέσματα

Μετά από επώαση 30 εβδομάδων, οι καλλιέργειες 32/400 δείγματα κοπράνων (8%) είχαν επιμολυνθεί είτε στη μία είτε στην άλλη μέθοδο ΚΚ και δεν χρησιμοποιήθηκαν. Έντεκα από τα 173 (6,3%) πρόβατα και 11/195 (5,6%) αίγες ήταν θετικά τουλάχιστον σε μία από τις μεθόδους ΚΚ. Στα πρόβατα, 3 ήταν θετικά στο LJ και 8 στο HEYM. Οι αντίστοιχοι αριθμοί στις αίγες ήταν 4 και 8. Η ανάπτυξη του MAP ήταν καλύτερη στο HEYM απ' ό,τι στο LJ ($p=0,04$), με ποσοστό ανίχνευσης της απέκκρισης με τα κόπρανα ίσο με 4,3% για το HEYM, έναντι 1,9% για το LJ. Ένα μόνο δείγμα κοπράνων από τα 368 (0,27%) ήταν θετικό και με τις δύο μεθόδους. Η συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν πολύ φτωχή με τιμή kappa ίση με 0,062 (95% δ.ε.: -0,098-0,222).

Η κατανομή του συνδυασμού των θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων των δύο ΚΚ, χωριστά για τις αίγες και τα πρόβατα, παρουσιάζεται στον πίνακα 2. Οι διάμεσες τιμές και τα 95% δ.α., που προέκυψαν από το μοντέλο της ημι-εξάρτησης, ήταν για τις $E_{u_{HEYM}}$, $E_{i_{HEYM}}$, $E_{u_{LJ}}$ και $E_{i_{LJ}}$ 8,4% (95% α.δ.ε.:0,8-37,1%), 96,7% (93,6-99,3%), 5,1% (0,3-22,9%), 98,6% (96,2-99,7%) στα πρόβατα, και 12,4% (4,1-29,9%), 98,7% (96,1-99,8%), 3,4% (0,2-14,2%), 98,2% (95,7-99,6%) στις αίγες, αντίστοιχα. Η γ_{Ei} και το $R_{\gamma_{Ei}}$ ήταν 0,002 (0-0,01) και 16% (0-81%) στα πρόβατα, ενώ ήταν 0,004 (0,0002-0,016) και 49% (3-97%) στις αίγες, αντίστοιχα. Η παράλληλη ερμηνεία των δύο μεθόδων είχε $E_{u_{\text{παρ}}}$ ίση με 14,7% (2,7-44,7%) και $E_{i_{\text{παρ}}}$ ίση με 95,5% (92,1-98,3%) στα πρόβατα. Στις αίγες, οι αντίστοιχες τιμές ήταν 16,1% (6,2-36,3%) και 97,3% (94,2-99,1%).

Στον πίνακα 3 παρατίθενται οι εκτιμήσεις των $E_{u_{HEYM}}$, $E_{i_{HEYM}}$, $E_{u_{LJ}}$ και $E_{i_{LJ}}$, που προέκυψαν από την εφαρμογή του μοντέλου ημι-εξάρτησης μετά την ενσωμάτωση διαφορετικών εκ των προτέρων πληροφοριών (I, II και III).

Πίνακας 2. Η κατανομή του συνδυασμού των θετικών και των αρνητικών αποτελεσμάτων της ΚΚ σε Herrold's egg yolk medium (HEYM) και Lowenstein Jensen medium (LJ), σε τρεις υπο-πληθυσμούς ελληνικών αιγών και προβάτων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης με χαμηλό, μέτριο και υψηλό ποσοστό εμφάνισης κλινικής παραφυματίωσης (υπο-πληθυσμός 1, 2 και 3, αντίστοιχα).

		Πρόβατα		Αίγες	
		LJ+	LJ-	LJ+	LJ-
Υπο-πληθυσμός 1	HEYM +	0	6	0	0
	HEYM -	2	84	1	37
Υπο-πληθυσμός 2	HEYM +	0	1	1	3
	HEYM -	1	52	2	86
Υπο-πληθυσμός 3	HEYM +	0	1	0	4
	HEYM -	0	26	0	61

Πίνακας 3. Οι διάμεσες τιμές (Δ) και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας ($\delta.α.$) για την Ευ και την Ει του HEYM και του LJ ($E_{U_{HEYM}}$, $E_{I_{HEYM}}$, $E_{U_{LJ}}$ and $E_{I_{LJ}}$, αντίστοιχα) μετά την ενσωμάτωση στο μοντέλο της ημι-εξάρτησης (εξάρτηση των Ει και ανεξαρτησία των Ευ) διαφορετικών ομάδων εκ των προτέρων πληροφοριών (ΕΠΠ).

ΕΠΠ		Πρόβατα		Αίγες	
		(Δ)	95% $\delta.α.$	(Δ)	95% $\delta.α.$
I ⁺	$E_{U_{HEYM}}$	8,4	0,8-37,1	12,4	4,0-29,9
	$E_{I_{HEYM}}$	96,7	93,6-99,3	98,7	96,1-99,8
	$E_{U_{LJ}}$	5,1	0,4-22,9	3,4	0,2-14,2
	$E_{I_{LJ}}$	98,6	96,2-9,7	98,1	95,7-99,6
II ⁺⁺	$E_{U_{HEYM}}$	5,1	0,2-26,3	11,0	2,3-28,0
	$E_{I_{HEYM}}$	94,3	89,2-98,0	98,0	92,7-99,9
	$E_{U_{LJ}}$	4,6	0,3-22,1	2,7	0,1-12,9
	$E_{I_{LJ}}$	98,1	94,4-99,8	97,2	93,0-99,6
III ⁺⁺⁺	$E_{U_{HEYM}}$	11,0	0,2-29,1	9,0	3,0-24,1
	$E_{I_{HEYM}}$	98,3	94,5-99,8	98,6	95,7-99,7
	$E_{U_{LJ}}$	3,7	0,4-14,3	2,7	0,1-11,9
	$E_{I_{LJ}}$	98,6	95,8-99,9	98,1	95,3-99,6

⁺: Οι Ευ είχαν ως ΕΠΠ την ομοιόμορφη κατανομή Βη (1,1), οι Ει τη Βη (100,2) και οι υπο-πληθυσμοί 1,2 και 3 είχαν τις Βη (2.84, 56.40), Βη (3.09, 7.25) και Βη (8.11, 7.91), αντίστοιχα.

⁺⁺: Οι Ευ και οι Ει είχαν ως ΕΠΠ ομοιόμορφες κατανομές Βη (1,1), και οι υπο-πληθυσμοί 1,2 και 3 είχαν τις Βη (2.84, 56.40), Βη (3.09, 7.25) και Βη (8.11, 7.91), αντίστοιχα.

⁺⁺⁺: Οι Ευ είχαν ως ΕΠΠ την ομοιόμορφη κατανομή Βη (1,1), οι Ει τη Βη (100,2) και οι υπο-πληθυσμοί 1,2 και 3 είχαν Βη (1,1) ορισμένη από το 0 έως το 0,5, Βη (2,4) και Βη (4,2), αντίστοιχα.

3.5. Συζήτηση

Το ποσοστό των απομονώσεων του μικροοργανισμού στο HEYM ήταν σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με το LJ. Το γεγονός αυτό αντιτίθεται στις παρατηρήσεις των Juste et al. (1991). Στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες, οι Nielsen et al. (2004) ανέφεραν καλύτερη ανάπτυξη στο HEYM απ' ό,τι στο LJ, κάτι που επίσης ήταν σε αντίθεση με προγενέστερες παρατηρήσεις (Whipple et al., 1991). Η συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο ΚΚ ήταν πολύ περιορισμένη. Μόνο ένα δείγμα ήταν θετικό και στις δύο ΚΚ, και με βάση την τιμή kappa, δεν απορρίπτεται η υπόθεση της πλήρους ασυμφωνίας των αποτελεσμάτων τους. Φτωχή συμφωνία μεταξύ HEYM και LJ, πρόσφατα αναφέρθηκε και στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες (Nielsen et al., 2004). Η τιμή του kappa σε έναν προσβεβλημένο πληθυσμό εξαρτάται από το Π, την Ευ και την Ει των διαγνωστικών δοκιμών και το βαθμό συσχέτισής τους γ_{E_U} και γ_{E_I} , αντίστοιχα (Gardner et al., 2000). Σε αυτή τη μελέτη, η υψηλή έως απόλυτη $E_{I_{KK}}$ και η σχέση

εξάρτησής τους ($\gamma_{Ei} > 0$) συμβάλλουν στη συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ των υγιών ζώων. Οι χαμηλές Eu_{KK} και η ανεξαρτησία τους (η γ_{E0} δε διέφερε από το 0) συνεισφέρουν στην φτωχή συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ των προσβεβλημένων ζώων. Προφανώς, η ασυμφωνία των δύο μεθόδων καταδεικνύει πως οι χαμηλές Eu_{KK} και η ανεξαρτησία τους γ_{E0} , επηρέασαν σοβαρά την τιμή του kappa στο πληθυσμό της μελέτης.

Λαμβανομένου υπόψη του ότι η Eu και η Ei των KK είχαν υψηλές και χαμηλές πραγματικές τιμές, αντίστοιχα, εξ ορισμού οι τιμές και το εύρος τιμών που μπορούν να πάρουν οι γ_{E0} και γ_{Ei} , είναι χαμηλά. Άρα οι εκτιμήσεις οποιουδήποτε μοντέλου για τις Eu και Ei δε θα είχαν μεγάλη διαφορά. Για το λόγο αυτό, το DIC, ως μέτρο της συνολικής καταλληλότητας των μοντέλων, έδειξε ότι το ανεξάρτητο και το ημι-εξαρτώμενο και το εξαρτώμενο μοντέλο, ταίριαζαν στα δεδομένα εξίσου καλά. Σε συμφωνία με αυτή την παρατήρηση, η υπολογισθείσα τιμή του γ_{E0} έδειξε ότι τα αποτελέσματα του HEYM και του LJ ήταν ανεξάρτητα στα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα, κατάσταση που συνήθως δεν απαντάται σε διαγνωστικές δοκιμές οι οποίες στηρίζονται στην ίδια βιολογική αρχή (Epoie et al., 2000; Gardner et al., 2000; Toft et al., 2005). Η υπολογισθείσα τιμή του γ_{Ei} , όμως, έδειξε ότι τα αποτελέσματα των δύο KK συσχετιζόνταν θετικά μεταξύ των υγιών ζώων. Αν και η υπολογισθείσα τιμή του συντελεστή εξάρτησης ήταν χαμηλή, εξαιτίας των υψηλών Ei των KK , ο σχετικός βαθμός εξάρτησης $P\gamma_{Ei}$ έδειξε ότι το μέγεθος της εξάρτησης αυτής, σε σχέση με το μέγιστο δυνατό, ήταν μέτριο έως υψηλό. Συνεπώς, ήταν και βιολογικά και υπολογιστικά σωστό να χρησιμοποιήσουμε το ημι-εξαρτώμενο μοντέλο που υπέθετε την ανεξαρτησία των Eu και ελάμβανε υπόψη την εξάρτηση των Ei .

Οι εκτιμήσεις των Eu και των δύο KK ήταν πολύ χαμηλές. Η Eu_{KK} εξαρτάται από το στάδιο της λοίμωξης, το οποίο επηρεάζει το βαθμό απέκκρισης του μικροοργανισμού με τα κόπρανα (Crossley et al., 2005). Στα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα, ο αριθμός βακτηριδίων στα κόπρανα είναι χαμηλός (Reddacliff et al., 2003) και η απέκκρισή τους είναι διαλείπουσα και μη ομοιογενώς κατανομημένη στη μάζα των κοπράνων (Whittington and Sergeant, 2001). Κατά συνέπεια, το ποσοστό των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων αναμένεται να είναι υψηλό. Η Eu_{KK} , με μια πρώτη ματιά φαίνεται αισθητά χαμηλότερη σε σχέση με τις υπάρχουσες στη βιβλιογραφία εκτιμήσεις για τις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες. Εντούτοις, οι εκτιμήσεις αυτές, ήταν στην πραγματικότητα σχετικές εκτιμήσεις Eu (Socket et al., 1992; Stabel, 1997; Eamens et al., 2000), ακόμα και σε σχέση με την ίδια την KK (Whitlock et al., 2000) που υπερεκτιμούσαν τις Eu_{KK} σε άγνωστο βαθμό (Sergeant et al., 2003). Οι Whitlock et al. (2000) χρησιμοποίησαν την επαναλαμβανόμενα θετική KK ως αλάνθαστη διαγνωστική δοκιμή αναφοράς, και με τον τρόπο αυτό υπολόγισαν την Eu_{KK} ίση με 42%. Αυτή η εκτίμηση μειώθηκε στο 25% όταν αρνητικά στην επαναλαμβανόμενη KK ζώα, ήταν θετικά στην ιστοπαθολογική εξέταση που ακολούθησε τη σφαγή, και κατατάχθηκαν στα προσβεβλημένα. Ακόμα κι έτσι, μερικά προσβεβλημένα ζώα δεν ανιχνεύθηκαν. Συνεπώς, ακόμα και η τιμή του 25% υπερεκτιμά την Eu σε κάποιο βαθμό (αν και σαφώς μικρότερο από το 45%), στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες. Πρόσφατα, οι Nielsen et al. (2002) υπολόγισαν, με βάση την εξίσωση της μεγίστης πιθανοφάνειας, την Eu_{KK} σε 20% για τα υποκλινικά προσβεβλημένα βοοειδή. Βάσισαν, όμως, τους υπολογισμούς τους σε δείγμα ζώων σε όλα τα στάδια της λοίμωξης και όχι σε κλινικά υγιή ζώα, και επομένως και αυτή η εκτίμηση μπορεί υπερβαίνει την πραγματική τιμή. Πάντως, οι εκτιμήσεις των Whitlock

et al. (2000) και Nielsen et al. (2002), βρίσκονται πιο κοντά στις δικές μας, που στηρίχτηκαν μόνο σε κλινικά υγιείς αίγες και πρόβατα και αφορούν αποκλειστικά αυτά. Αν, μάλιστα, ληφθούν υπόψη οι δυσκολίες που παρουσιάζει η καλλιέργεια των στελεχών των μικρών μηρυκαστικών σε σχέση με αυτή των στελεχών των βοοειδών, οι παρούσες εκτιμήσεις φαίνονται ακόμα πιο ρεαλιστικές. Στα πρόβατα κυριαρχούν τα στελέχη τύπου I (Stevenson et al., 2002) που στην συντριπτική πλειοψηφία τους δεν αναπτύσσονται καλά σε τεχνητά υποστρώματα (Collins et al., 1990; Juste et al., 1991; Marsh and Whittington, 2005). Αν και τα στελέχη των αιγών είναι ιδίου τύπου (II) με τα βόεια στελέχη (Collins et al., 1990; Whipple et al., 1990; Thoresen and Olsaker, 1994; Pavlik et al., 1995; Cousins et al., 2000), τελευταία περιγράφηκαν σε αίγες στελέχη ενδιάμεσα των τύπων I και II, τα στελέχη τύπου III, με χαρακτηριστικά ανάπτυξης που παραπέμπουν στα στελέχη τύπου I (de Juan et al., 2005). Τα στελέχη αυτά προέρχονταν από κοπάδια αιγών γεινιάζοντα με κοπάδια προβάτων, κάτι που ίσχυε και στην παρούσα μελέτη. Η πιθανή επικράτηση στελεχών τύπου I και III στις ελληνικές αίγες και τα πρόβατα γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης εξηγεί περαιτέρω τη χαμηλή Ευ_{ΚΚ}.

Η Ε_{ΚΚ} και στα δύο είδη ήταν σχεδόν απόλυτη. Το μικρό ποσοστό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων αντικατοπτρίζει τη μικρή, αλλά υπαρκτή, πιθανότητα μόλυνσης και παθητικού περάσματος του μικροοργανισμού από τον πεπτικό σωλήνα χωρίς «εγκατάσταση» της λοίμωξης (Sweeney et al., 1992) ή, σπάνια, την πιθανότητα εργαστηριακού σφάλματος και επιμόλυνσης κατά την επεξεργασία των δειγμάτων.

Η παράλληλη ερμηνεία των δύο ΚΚ βελτίωσε την Ευ για την ανίχνευση της απέκκρισης του μικροοργανισμού στα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα, χωρίς να μειώσει σημαντικά την Ει. Για την αύξηση της Ευ προτείνονται η επιλογή και η παράλληλη ερμηνεία ανεξάρτητων διαγνωστικών δοκιμών μεταξύ των προσβεβλημένων ζώων (Gardner et al., 2000). Στην παρούσα μελέτη, αν και οι δύο δοκιμές βασίζονται στην ίδια βιολογική αρχή, η ανεξαρτησία των αποτελεσμάτων τους στα προσβεβλημένα ζώα καθιστά δόκιμη την παράλληλη ερμηνεία τους. Επιπλέον, η απώλεια στην Ει της παράλληλης ερμηνείας μειώθηκε σημαντικά λόγω του θετικού συσχετισμού μεταξύ των Ει των ΚΚ ($\gamma_{Ei} > 0$).

Η μεθοδολογία κατά Bayes έχει το πλεονέκτημα της ενσωμάτωσης εκ των προτέρων πληροφοριών στο μοντέλο για τις προς εκτίμηση παραμέτρους. Αν αυτές οι πληροφορίες είναι τεκμηριωμένες, συμβάλλει σημαντικά στη βελτιστοποίηση των συμπερασμάτων της ανάλυσης (Joseph et al., 1995; Branscum et al., 2005; Toft et al., 2005). Η πρακτική, όμως, ορθής ανάλυσης κατά Bayes επιβάλλει τον έλεγχο της επιρροής διαφορετικών πληροφοριών στις τελικές εκτιμήσεις. Στην παρούσα μελέτη, αυτή η ανάλυση ευαισθησίας έδειξε πως οι εκτιμήσεις επηρεάστηκαν σε χαμηλό έως μέτριο βαθμό από την τροποποίηση των εκ των προτέρων πληροφοριών, αλλά ήταν ποιοτικά όμοιες. Το γεγονός ότι οι εκτιμήσεις των Ει παρέμειναν σταθερά υψηλές όταν δε χρησιμοποιήσαμε πληροφορίες γι' αυτές (ομάδα II), επιβεβαιώνει, αφενός την ορθότητα των χρησιμοποιηθεισών για την Ει πληροφοριών, αφετέρου την ορθότητα των εκτιμήσεων. Επιπλέον, η παρατηρηθείσα ανεξαρτησία των Ευ και εξάρτηση των Ει διαπιστώθηκαν υπό οποιαδήποτε ομάδα εκ των προτέρων πληροφοριών (I, II ή III). Τέλος, διερευνήσαμε τις επιπτώσεις στις εκτιμήσεις ήπιων τροποποιήσεων των δεδομένων. Πιο συγκεκριμένα, ελέγξαμε ποιες θα ήταν οι εκτιμήσεις αν σε κάθε πληθυσμό χωριστά οι μηδενικοί συνδυασμοί των αποτελεσμάτων των διαγνωστικών δοκιμών είχαν μια μοναδική παρατήρηση. Η ανάλυση των τροποποιημένων δεδομένων

είχε περιορισμένες επιπτώσεις στις εκτιμήσεις της E_u και της E_i , υποδεικνύοντας ότι θα πρέπει να αισθανόμαστε ασφαλείς για τις εκτιμήσεις μας (Enoe et al., 2000).

Στο μοντέλο της υπό συνθήκη εξάρτησης, που αρχικά πρότειναν οι Dendukuri και Joseph (2001), το κατώτερο όριο των γ_{E_u} και γ_{E_i} είχε περιοριστεί στο μηδέν, επειδή η αρνητική συσχέτιση μεταξύ των διαγνωστικών δοκιμών θεωρήθηκε σπάνιο φαινόμενο. Εμείς εδώ προτιμήσαμε τα όρια, όπως περιγράφονται από τους Gardner et al., (2000), που επιτρέπουν στους γ_{E_u} και γ_{E_i} να παίρνουν θετικές και αρνητικές τιμές (βλ. παράρτημα). Με τον τρόπο αυτό, κατέστη δυνατό να αξιολογηθεί χωριστά για τον γ_{E_u} και τον γ_{E_i} το αν διέφερε σημαντικά από το μηδέν με βάση την εκ των υστέρων κατανομή του. Έτσι, το τελικό μοντέλο δεν επελέγη με βάση μόνο το DIC (μια διαδικασία ελέγχου του συνολικού ταιριάσματος του μοντέλου στα δεδομένα), αλλά και με βάση τη διερεύνηση της σημασίας κάθε συντελεστή γ_{E_u} και γ_{E_i} ξεχωριστά.

Οι διαγνωστικές δοκιμές μπορεί να εμφανίζουν εξάρτηση των αποτελεσμάτων τους είτε μεταξύ των προσβεβλημένων είτε μεταξύ των υγιών ζώων. Σε αυτή την περίπτωση, πρέπει να διερευνάται η χρήση μοντέλων ημι-εξάρτησης που περιλαμβάνουν είτε μόνο τον γ_{E_u} είτε μόνο τον γ_{E_i} , αντίστοιχα. Οι ΚΚ είχαν πολύ χαμηλή E_u στις υποκλινικά προσβεβλημένες αίγες και πρόβατα, η οποία βελτιώθηκε με την παράλληλη ερμηνεία τους. Αμφότερες οι μέθοδοι, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικές δοκιμές επιβεβαίωσης, λόγω της υψηλής έως και απόλυτης E_i .

3.6. Παράρτημα

Το σύνολο των παρατηρήσεων n_k σε κάθε πληθυσμό k προκύπτει από την κατανομή των συνδυασμών των αποτελεσμάτων των διαγνωστικών δοκιμών στον πληθυσμό, $y_k = (y_{11k}, y_{12k}, y_{21k}, y_{22k})$, όπου y_{11k} (y_{22k}) η κατανομή των αποτελεσμάτων στον πληθυσμό k , που είναι θετικά (αρνητικά) και στις δύο διαγνωστικές δοκιμές, και y_{12k} (y_{21k}) η κατανομή των αποτελεσμάτων στον πληθυσμό k , που είναι θετικά (αρνητικά) στη διαγνωστική δοκιμή 1 και αρνητικά (θετικά) στη διαγνωστική δοκιμή 2. Έστω ότι τα δεδομένα y_k ακολουθούν την ανεξάρτητη πολυωνυμική κατανομή:

$$y_k \sim \text{multinomial}(n_k, (p_{11k}, p_{12k}, p_{21k}, p_{22k})), \quad k = 1, 2, \dots, L$$

με τις πιθανότητες εμφάνισης της κατανομής κάθε συνδυασμού αποτελεσμάτων στον πληθυσμό k να δίνονται από τις σχέσεις:

$$p_{11k} = P(T_1^+, T_2^+) = \pi_k (Se_1 Se_2) + (1 - \pi_k) ((1 - Sp_1)(1 - Sp_2) + \gamma_{Sp})$$

$$p_{12k} = P(T_1^+, T_2^-) = \pi_k (Se_1 (1 - Se_2)) + (1 - \pi_k) ((1 - Sp_1) Sp_2 - \gamma_{Sp})$$

$$p_{21k} = P(T_1^-, T_2^+) = \pi_k ((1 - Se_1) Se_2) + (1 - \pi_k) (Sp_1 (1 - Sp_2) - \gamma_{Sp})$$

$$p_{22k} = P(T_1^-, T_2^-) = \pi_k (1 - Se_1)(1 - Se_2) + (1 - \pi_k) (Sp_1 Sp_2 + \gamma_{Sp})$$

όπου π_k το πραγματικό ποσοστό προσβολής στον k πληθυσμό.

Υποθέτουμε πως οι δύο E_u (Se_1 and Se_2) και οι δύο E_i (Sp_1 and Sp_2) ακολουθούν ανεξάρτητες β κατανομές. Επειδή εκ των προτέρων πληροφορίες για τον γ_{E_i} συχνά απουσιάζουν, προτείνεται η χρήση ομοιόμορφης κατανομής που αποδίδει ίση πιθανότητα σε όλο το εύρος των τιμών του γ_{E_i} . Το εύρος τιμών του γ_{E_i} ικανοποιεί τη σχέση: $\max(-(1-Sp_1)*(1-Sp_2), -Sp_1*Sp_2) \leq \gamma_{E_i} \leq \min(Sp_1*(1-Sp_2), Sp_2*(1-Sp_1))$, (Gardner et al., 2000). Πρόκειται, ουσιαστικά, για μια τροποποίηση του μοντέλου που προτάθηκε από τους Dendukuri and Joseph (2001) και (α) περιλαμβάνει μόνο τον γ_{E_i} και (ii) το εύρος των ορίων του γ_{E_i} , ενώ επιτρέπει και την αρνητική, πέραν της θετικής, συσχέτιση των αποτελεσμάτων των διαγνωστικών δοκιμών μεταξύ των υγιών ζώων.

3.7. Βιβλιογραφία

1. Best, N.G., Cowles, M.K., Vines, S.K., 1996. CODA Manual Version 0.30. MRC Biostatistics Unit, Cambridge, UK.
2. Branscum A.J. , Gardner I.A., Johnson W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modelling. *Prev. Vet. Med.* 68, 145–163.
3. Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridisation. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591–1596.
4. Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J., 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aus. Vet.* 78, 184-190.
5. Crossley, B.M., Zagmutt-Vergara, F.J., Fyock, T.L., Whitlock, R.H., Gardner, I.A., 2005. Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Vet. Mic.* 107, 257-263.
6. Cytel Software Corporation, 1999. User’s manual. StatXact The Statistical Package, version 4.0.1 for Windows.
7. de Juan L., Mateos, A., Dominguez, L., Sharp, J.M., Stevenson, K., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Mic.* 106, 249-257.
8. Dendukuri, N., Joseph, L., 2001. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics* 57, 158–167.
9. Eamens, G.J., Whittington, R.J., Marsh, I.B., Turner, M.J., Saunders, V., Kemsley, P.D., Rayward, D., 2000. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet. Mic.* 20, 357-367.
10. Enøe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease status is unknown. *Prev. Vet. Med.* 45, 61–81.
11. Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev. Vet. Med.* 45, 107-122.
12. Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Stat. Sci.* 7, 457– 511.
13. Georgiadis, M.P., Johnson,W.O., Gardner, I.A., Singh, R., 2003. Correlation-adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Appl. Stat.* 52, 63–76.
14. Green, E. P., Tizard M. L., Moss M. T., Thompson J., Winterbourne D. J., McFadden J. J., Hermon-Taylor J., 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn’s disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17, 9063–9073.
15. Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., 1999. Epidemiological study of *paratuberculosis* in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Mic.* 37, 1746-1751.
16. Heidelberger, P. and Welch, P., 1983. Simulation run length control in the presence of a initial transient. *Operations Research* 31, 1109-1144.
17. Hui, S.L., Walter, S.D., 1980. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 36, 167–171.
18. Johnson, W.O., Gastwirth, J.L., Pearson, L.M., 2001. Screening without a gold standard: the Hui-Walter paradigm revisited. *Am. J. Epidemiol.* 153, 921-924.
19. Joseph, L., Gyorkos, T.W., Coupal, L., 1995. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am J Epidemiol.* 141, 263-272.
20. Juste, R.A., Marco, J.C., Saez de Ocariz, C. and Aduriz, J.J., 1991. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 28, 385–390.
21. Manning, E.J., Kucera, T.E., Gates, N.B., Woods, L.M., Fallon-McKnight, M., 2003. Testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd. *J. Wildl. Dis.* 39, 323-328.

22. Marsh, I.B. and Whittington, R.J., 2005. Deletion of an *mmpL* gene and multiple associated genes from the genome of the S strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* identified by representational difference analysis and in silico analysis. *Mol. Cell. Prob.*, In press.
23. National Research Council, 2003. *Diagnosis and control of Johne's disease*. The National Academies Press, Washington, D.C.
24. Nielsen, S.S., Grønbaek, C., Agger, J.F., Houe, H., 2002. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 53, 191–204.
25. Nielsen, S.S., Kolmos, B., Christoffersen, A.B., 2004. Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. *J. Appl. Microbiol.* 96, 149-153.
26. Pavlik, I., Bejckova, L., Pavlas, M., Rozsypalova, Z., Koskova, S., 1995. Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.* 45, 311–318.
27. Raftery, A.L., Lewis, S., 1992. Comment: one long run with diagnostics: implementation strategies for Markov chain Monte Carlo. *Stat. Sci.* 7, 493–497.
28. Reddacliff, L.A., Vadali, A., Whittington, R.J., 2003. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet. Microbiol.* 95, 271-282.
29. Saxegaard, F., 1990. Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* 102, 149-156.
30. Sergeant, E.S., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C., Whittington, R.J., 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61, 235-248.
31. Sockett, D.C., Carr, D.J., Collins, M.T., 1992. Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 56, 148-153.
32. Spiegelhalter, D. J., Best, N. G., Carlin, B. P., van der Linde, A., 2002. Bayesian measures of model complexity and fit (with discussion). *J. Roy. Statist. Soc. B.* 64, 583-640.
33. Spiegelhalter, D., Thomas, A., Best, N., Gilks W., 1996. BUGS: Bayesian Inference Using Gibbs Sampling, Version 0.50. MRC Biostatistics Unit, Cambridge. <http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>
34. Stabel, J.R., 1997. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 375-380.
35. Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
36. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Hamir, A.N., Rosenberger, A.E., Herr, S.A., 1992. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1312-1314.
37. Thoresen, O.F., Olsaker, I., 1994. Distribution and hybridization patterns of the insertion element IS900 in clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 293–303.
38. Toft, N., Jørgensen, E., Højsgaard, S., 2005. Diagnosing diagnostic tests: evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. *Prev. Vet. Med.* 68, 19–33.
39. Vacek, P.M., 1985. The effect of conditional dependence on the evaluation of diagnostic tests. *Biometrics* 41, 959-968.
40. Walter S.D. and Irwig L.M, 1988. Estimation of test error rates, disease prevalence and relative risk from misclassified data: a review. *J. Clin. Microbiol.* 41, 923–937.
41. Whipple, D.L., Callihan, D.R., Jarnagin, J.L., 1991. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagn. Inv.* 3, 368–373.
42. Whipple, D.L., Kapke, P., Vary, C., 1990. Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2561–2564.

43. Whitlock, R. H. and Rosenberger, A. E., 1990. Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis* a recommended procedure. Proceedings of the 94th Annual Meeting of the USAHA, pp. 280-285.
44. Whitlock, R.H., Buergelt, C., 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 12, 345-356.
45. Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol.* 77, 387-398.
46. Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall D.J., Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1077–1083.
47. Whittington, R.J., Sergeant, E.S., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations. *Aus. Vet.* 79, 267-278.

Κεφάλαιο 4

Ο αριθμός των τοκετών δρα ως παράγων αλληλεπίδρασης στη σχέση της γονιμότητας με την υποκλινική παραφυματίωση των αιγών και προβάτων ελληνικών εκτροφών

Π. Κωστούλας¹, Λ. Λεοντίδης¹, Χ. Μπιλλίνης², Γ. Σ. Αμοιρίδης³, Μ. Φλώρου¹

¹Εργαστήριο Επιδημιολογίας, Βιοστατιστικής και Οικονομίας Ζωικής Παραγωγής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 43100 Καρδίτσα, Ελλάδα.

²Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 43100 Καρδίτσα, Ελλάδα.

³Κλινική Αναπαραγωγής και Μαιευτικής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 43100 Καρδίτσα, Ελλάδα.

Έγινε δεκτό για δημοσίευση στο περιοδικό Preventive Veterinary Medicine

4.1. Περίληψη

Σε αυτή τη μελέτη χρονικού σημείου διερευνήσαμε τη σχέση μεταξύ υποκλινικής λοίμωξης από *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) και τη πιθανότητα μη γέννησης ζωντανών αμνών ή εριφίων κατά την περίοδο τοκετών (από το Νοέμβριο του 2001 μέχρι τον Ιανουάριο του 2002), που προηγήθηκε της δειγματοληψίας (το Μάιο του 2002). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 4 ελληνικά κοπάδια προβάτων και αιγών (στο δείγμα 369 ζώα $\geq 1,5$ ετών). Από κάθε τυχαία επιλεγμένο ζώο συλλέχθηκαν 10ml αίματος και 10 γραμμάρια κοπράνων από το απευθυσμένο. Τα δείγματα αίματος εξετάστηκαν για την ύπαρξη αντισωμάτων κατά του MAP με μια διαγνωστική δοκιμή ELISA και τα δείγματα κοπράνων καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα Herrold's egg-yolk (HEYM), εμπλουτισμένο με μυκοβακτήνη και αντιβιοτικά. Ως υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα ορίστηκαν εκείνα που ήταν θετικά σε τουλάχιστον μία εκ των διαγνωστικών δοκιμών. Το πραγματικό ποσοστό προσβολής υποκλινικά προσβεβλημένων ζώων, λαμβάνοντας υπόψη τη διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα της παράλληλης ερμηνείας των αποτελεσμάτων των δύο διαγνωστικών δοκιμών, ήταν 14% (0,1-28%) και 35,9% (9,2-62,7%) στα πρόβατα και τις αίγες, αντίστοιχα. Η σχέση μεταξύ της γονιμότητας των προβάτων και των αιγών και της πιθανότητας να έχουν υποκλινική παραφυματίωση διερευνήθηκε με τη χρήση ιεραρχικά δομημένων μοντέλων λογιστικής παλινδρόμησης. Τα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα, έναντι των υγιών, είχαν σχετικό λόγο πιθανοτήτων (ΣΛΠ) για τη γέννηση ζωντανού απογόνου κατά την προηγηθείσα περίοδο τοκετών ίσο με 5,4, αν είχαν πραγματοποιήσει στη ζωή τους έως και 3 τοκετούς, και ΣΛΠ ίσο με 0,05, αν είχαν περισσότερους από 6 τοκετούς, ενώ ο ΣΛΠ δεν ήταν σημαντικός για τα ζώα με ενδιάμεσο αριθμό τοκετών.

Λέξεις-κλειδιά: παραφυματίωση, γονιμότητα, αριθμός τοκετών, πρόβατα, αίγες

4.2. Εισαγωγή

Η παραφυματίωση των προβάτων (ΠΠ) οφείλεται στη λοίμωξη των προβάτων, κυρίως, με πρόβεια στελέχη του *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (Whittington et al., 1998; 2000; Cousins et al., 2000). Η παραφυματίωση των αιγών (ΑΠ) οφείλεται στη λοίμωξη των αιγών, κυρίως, με βόεια στελέχη του MAP, που είναι προσαρμοσμένα στις αίγες (Cousins et al., 2000; Whittington et al., 2000). Στις προσβεβλημένες εκτροφές, οι ΑΠ και ΠΠ προκαλούν διάφορης έντασης νοσηρότητα, θνητότητα και απώλειες της παραγωγής. Για πρώτη φορά στην Ελλάδα περιγράφηκαν το 1969 (Leontides et al., 1975).

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενες ενδείξεις, όσον αφορά την επίδραση της λοίμωξης από MAP στη γονιμότητα των βοοειδών. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι ο ορισμός της νόσου και το είδος των διαγνωστικών δοκιμών διαφοροποιούνται μεταξύ των δημοσιευμένων μελετών. Δυσμενής επίδραση της παραφυματίωσης στην αναπαραγωγική ικανότητα των βοοειδών καταδείχτηκε από τους Merkal et al. (1975), Buergelt and Duncan (1978), Abbas et al. (1983) και Johnson-Ifearulundu et al. (2000), ενώ οι μελέτες των DeLisle and Milestone (1989) και McNab et al. (1991a) δεν ανέδειξαν καμία σχέση μεταξύ γονιμότητας και παραφυματίωσης. Πρόσφατα, οι Nielsen et al. (2002c) διαπίστωσαν πως στα βοοειδή τα αποτελέσματα των ορολογικών δοκιμών μεταβάλλονται ανάλογα με τον αριθμό των πραγματοποιηθέντων τοκετών και το στάδιο της γαλακτοπαραγωγής.

Σχεδιάσαμε αυτήν τη μελέτη χρονικού σημείου, επειδή δεν υπάρχει καμία μελέτη που να εξετάζει τα παραπάνω στα μικρά μηρυκαστικά. Ο σκοπός μας ήταν να διερευνήσουμε τη σχέση μεταξύ λοίμωξης από MAP και τη γέννηση ζωντανών αμνών ή εριφίων κατά την περίοδο τοκετών που προηγήθηκε της δειγματοληψίας.

4.3. Υλικά και μέθοδοι

4.3.1. Υπό μελέτη πληθυσμός

Τέσσερα κοπάδια προβάτων και αιγών, με μεγέθη που κυμαίνονταν από 250 έως 350 ζώα, επελέγησαν γι' αυτήν τη μελέτη. Οι ιδιοκτήτες των επιλεγθέντων κοπαδιών επέτρεψαν τη διαρκή επιτήρησή τους για δύο έτη (2001-2002). Όλα τα κοπάδια είχαν ιστορικό κλινικής παραφυματίωσης και δεν είχαν ποτέ εμβολιαστεί κατά του MAP. Σύμφωνα με τον υπεύθυνο κτηνίατρο, το ποσοστό εμφάνισης περιοδικής διάρροιας, ενδεικτικής της κλινικής παραφυματίωσης, ήταν <10% (1 κοπάδι), 10-30% (2 κοπάδια) και >30% (1 κοπάδι). Οι αίγες και τα πρόβατα ήταν διασταυρώσεις διαφόρων εγχώριων φυλών (π.χ. *Capra grisca*, Χίου, Καραγκούνικο). Τα ζώα εκτρέφονταν ημι-εκτατικά. Κύριος στόχος ήταν η παραγωγή γάλακτος.

Οι κτηνοτρόφοι επέλεγαν τις αντικαταστάσεις από τους απογόνους των αιγών και των προβατινών υψηλής γαλακτοπαραγωγής. Τα αρσενικά ήταν απόγονοι ζώων με υψηλές αποδόσεις από άλλα κοπάδια. Η γενική πρακτική διαχείρισης των εκτροφών ήταν παρόμοια. Τα ζώα έβοσκαν στους λειμώνες κατά τη μεγαλύτερη διάρκεια του έτους

και επιπλέον ταΐζονταν με συμπυκνωμένες τροφές. Περνούσαν το μεγαλύτερο μέρος της ημέρας έξω και επέστρεφαν στους στάβλους κατά τη διάρκεια της νύχτας. Οι συζεύξεις γίνονταν φυσικά, χωρίς επιτήρηση, από τον Ιούνιο έως τον Αύγουστο και γεννούσαν από το Νοέμβριο έως τον Ιανουάριο. Οι αμνοί και τα ερίφια απογαλακτίζονταν 45 έως 60 μέρες μετά τη γέννα. Η γαλακτική περίοδος διακόπτονταν όταν, κατά την εκτίμηση του κτηνοτρόφου, η ποσότητα του γάλακτος ήταν τόσο μειωμένη, με αποτέλεσμα να μην καλύπτει το κόστος της εργασίας της άμελης και της πρόσθετης διατροφής. Σε αυτά τα κοπάδια, η μέση περίοδος γαλακτοπαραγωγής, η μέση ετήσια παραγωγή γάλακτος και ο μέσος αριθμός ζωντανών γεννηθέντων αμνών ή εριφίων ανά προβατίνα ή αίγα ήταν 180 μέρες, 160 κιλά και 1,4 αμνοί ή ερίφια ανά προβατίνα ή αίγα, αντίστοιχα. Ο ετήσιος ρυθμός αντικατάστασης ήταν 20%.

4.3.2. Δειγματοληψία

Σε κάθε εκτροφή επιλέχθηκαν τυχαία (με λίστα τυχαίων αριθμών από τον υπολογιστή) εκατό κλινικά υγιή ζώα (χωρίς κλινικές εκδηλώσεις ενδεικτικές παραφυματώσεως: χρόνια η διαλείπουσα διάρροια, απώλεια βάρους μη ανταποκρινόμενη σε ανθελμινθική ή αντιμικροβιακή θεραπεία), αφού αποκλείστηκαν ζώα ηλικίας μικρότερης του 1,5 έτους. Θέτοντας το αποδεκτό σφάλμα τύπου I ίσο με 5% και το τύπου II ίσο με 20%, και υποθέτοντας ότι ο εντός της εκτροφής συντελεστής συσχέτισης (ΕΣΣ) της πιθανότητας ένα ζώο να είναι γόνιμο ισούται με 0,01, ο στόχος μας ήταν να υπολογιστεί το ελάχιστο μέγεθος του δείγματος για να ανιχνευθεί διαφορά στα ποσοστά γονιμότητας μεταξύ υποκλινικά προσβεβλημένων και υγιών ζώων τουλάχιστον 15%. Η υπόθεση του χαμηλού ΕΣΣ βασίστηκε στην ίδια αναπαραγωγική και διατροφική διαχείριση των εκτροφών και στο ότι μεταξύ των εκτροφών δεν υπήρχαν διαφορές ούτε ως προς το πρόγραμμα ελέγχου της βρουκέλλωσης (μια ανασκόπηση του εθνικού προγράμματος ελέγχου της βρουκέλλωσης δίνεται από τους Minas et al., 2004), ούτε ως προς την κατανομή της οροθετικότητας για την *Chlamydophila abortus*. Τα δύο τελευταία, αποτελούν τους συχνότερους λοιμώδεις παράγοντες πρόκλησης αναπαραγωγικών προβλημάτων στις ελληνικές αίγες και τα πρόβατα (ανέκδοτα δεδομένα). Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που περιέγραψαν οι Campbell et al. (2004), το ελάχιστο μέγεθος δείγματος ήταν εκατό ζώα σε κάθε κοπάδι, δηλαδή συνολικά 400 ζώα.

Δεδομένα από τις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες δείχνουν πως η διαγνωστική ευαισθησία της ορολογικής δοκιμής βελτιστοποιείται προς το τέλος της περιόδου γαλακτοπαραγωγής (Nielsen et al., 2002c). Για το λόγο αυτό, η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του Απριλίου – Μαΐου 2002. Από κάθε τυχαία επιλεγθέν ζώο συλλέχθηκαν 10 ml αίματος και 10 γραμμάρια κοπράνων από το απευθυσμένο. Παράλληλα, κατεγράφησαν ατομικά στοιχεία του ζώου ως προς το είδος, την ηλικία, τον αριθμό των προηγούμενων τοκετών και τη γονιμότητα. Ένα ζώο καταγράφηκε ως γόνιμο εάν είχε γεννήσει βιώσιμο απόγονο ή απογόνους κατά την προηγούμενη περίοδο τοκετών (Νοέμβριος 2001 - Ιανουάριος 2002), ή, σε αντίθετη περίπτωση, ως μη γόνιμο.

4.3.3. Διαγνωστικές δοκιμές

Τα δείγματα των ορών εξετάστηκαν για αντισώματα κατά του MAP με την IDEXX ELISA² σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Sockett et al., 1992). Τα κόπρανα καλλιεργήθηκαν μετά από μικρή τροποποίηση ενός πρωτοκόλλου που περιγράφηκε σε πρόσφατες μελέτες (Greig et al., 1999).

Εν συντομία, 1 με 2 γραμ. κοπράνων ομογενοποιήθηκαν για 30-60 δευτερόλεπτα με 10 ml αποστειρωμένο νερό, με τη χρήση τεχνητού στομάχου (Colworth Stomacher 80, Seward Medical). Για την απομάκρυνση των επιμολύνσεων από το ομογενοποιημένο μείγμα προστέθηκαν 10ml hexadecyl pyridinium chloride (Sigma-Aldrich), πυκνότητας 1,5%. Στη συνέχεια, το μείγμα αφέθηκε σε όρθια θέση για όλο το βράδυ, σε θερμοκρασία δωματίου. Την επόμενη μέρα, το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα και φυγοκεντρήθηκε στις 3.000 στροφές ανά λεπτό, για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C. Το σχηματισθέν ίζημα διαλύθηκε εκ νέου με 10 ml αποστειρωμένου ύδατος. Η φυγοκέντρωση επαναλήφθηκε και το σχηματισθέν ίζημα διαλύθηκε με 1 ml αποστειρωμένου ύδατος. Το εναιώρημα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια μικροφυγοκέντρου και φυγοκεντρήθηκε στις 3000 στροφές ανά λεπτό, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το σχηματισθέν ίζημα ομογενοποιήθηκε με 0,5 ml αποστειρωμένου ύδατος. Από κάθε εναιώρημα, 0,1 ml ενοφθαλμίστηκε σε δύο σωλήνες που περιείχαν υπόστρωμα Herrold's egg yolk, εμπλουτισμένο με μυκοβακτήνη και αντιβιοτικά (Becton Dickinson product code: 222233). Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 30 εβδομάδες, στους 37°C. Για την επιβεβαίωση του είδους των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν, DNA από τις καλλιέργειες αποσπάστηκε και ελέγχθηκε για την παρουσία της ειδικής του MAP ένθετης ακολουθίας IS900 (Green et al., 1989). Ο υπεύθυνος για τη βακτηριολογική εξέταση ερευνητής (ΜΦ) δε γνώριζε τα αποτελέσματα της ορολογικής εξέτασης.

Για την εκτίμηση της διαγνωστικής ευαισθησίας (Eu) και ειδικότητας (Ei) της ELISA (Eu_{ELISA} και Ei_{ELISA}) και της καλλιέργειας κοπράνων (Eu_{ΚΚ} και Ei_{ΚΚ}), χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης που υπέθεταν την υπό συνθήκη ανεξαρτησία των διαγνωστικών δοκιμών. Οι εκτιμήσεις και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας (δ.α.) για τις Eu_{ELISA}, Ei_{ELISA}, Eu_{ΚΚ} και Ei_{ΚΚ} ήταν: 39% (17-67%), 98,5% (94-99%), 19% (5-41%) και 97% (94-99%) στα πρόβατα, και 64% (43-83%), 94(89-97%), 11% (4-21%) και 98% (95-99%) στις αίγες, αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκε μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes (Johnson et al., 2001). Οι εκ των προτέρων πληροφορίες που ενσωματώθηκαν στο μοντέλο, προέκυψαν με βάση τη βιβλιογραφία που αναφέρεται στον πίνακα 1. Επειδή οι αναφορές για την Eu διαφοροποιούνταν αισθητά ανά μελέτη, καμία απολύτως πληροφορία για τις Eu δεν ενσωματώθηκε στο μοντέλο. Επομένως για τις Eu χρησιμοποιήθηκε η ομοιόμορφη κατανομή, που αποδίδει ίσες πιθανότητες σε όλο το εύρος τιμών από το 0 έως το 1. Η συμφωνία των βιβλιογραφικών αναφορών στην υψηλή έως απόλυτη Ei οδήγησε στην ενσωμάτωση πολύ συγκεκριμένων πληροφοριών, με τη μορφή β κατανομών Bη (α, β) για τις Ei των διαγνωστικών δοκιμών. Συγκεκριμένα, η πιο πιθανή τιμή για την Ei_{ELISA} τέθηκε στο 0,95 και ήμασταν 95% βέβαιοι πως δεν ήταν μικρότερη από 0,90. Μια Bη με πιο πιθανή τιμή το 0,95 και 5ο εκατοστημόριο το 0,90, είναι η Bη (100, 5,5). Η πιο πιθανή τιμή για την Ei_{ΚΚ} τέθηκε στο 0,98 και ήμασταν 95% βέβαιοι πως δεν ήταν μικρότερη από 0,95. Τα στοιχεία αυτά αντιστοιχούν σε μια κατανομή Bη (100, 2).

²IDEXX laboratories, Portland, ME

Πίνακας 1. Οι αναφορές από τη διεθνή βιβλιογραφία για την ευαισθησία (Ευ) και την ειδικότητα (Ει) της ELISA και της καλλιέργειας κοπράνων (ΚΚ) για τη διάγνωση της παραφυματώσεως σε βοοειδή, αίγες και πρόβατα.

Αναφορά	Είδος	ELISA	ΚΚ
Collins et al., 1991; Ridge et al., 1991; McNab et al., 1991	Βοοειδή	Ευ ~ 45% Ει >90%	
NielEvn et al., 2002	Βοοειδή	Ευ =27-86%, Ει=55-98%	Ευ=20-73% Ει > 98%
Sockett et al., 1992	Βοοειδή	Ευ=47-65%	Ευ =45-73% Ει > 99%
Sweeney et al., 1995	Βοοειδή	Ευ=15-87%	
Whitlock et al., 2000	Βοοειδή	Ευ=15-75%	Ευ=42% Ει > 99%
Eurgeant et al., 2003	Πρόβατα	Ευ= 25-73%; 10-47% Ει>95%	
Whittington et al., 2003; Hilbink et al., 1994	Πρόβατα	Ει>97%	
Hope et al., 2000	Πρόβατα	Ευ=35-54% Ει=98,2-99,5%	
Dubash et al., 1995	Πρόβατα	Ευ=48% Ει=95%	
Rajukumar et al., 2001	Αίγες	Ευ>75% Ει>90%	
Molina et al., 1991	Αίγες	Ευ>85% Ει>93%	

4.3.4 Στατιστική ανάλυση

Ένα ζώο θεωρήθηκε υποκλινικά προσβεβλημένο αν ήταν θετικό σε τουλάχιστον μια εκ των διαγνωστικών δοκιμών. Το κατά Rogan–Gladen πραγματικό ποσοστό προσβολής (Π) των υποκλινικά προσβεβλημένων ζώων υπολογίστηκε χωριστά για τις αίγες και τα πρόβατα, με βάση το φαινομενικό ποσοστό προσβολής (ΦΠΠ) των υποκλινικά προσβεβλημένων ζώων και τις $E_{\text{ΠΑΡ}}$ και $E_{\text{ΠΑΡ}}$ της παράλληλης ερμηνείας των διαγνωστικών δοκιμών από την εξίσωση: $\Pi = (\Phi\Pi\Pi + E_{\text{ΠΑΡ}} - 1) / (E_{\text{ΠΑΡ}} + E_{\text{ΠΑΡ}} - 1)$ (Rogan and Gladen, 1978). Η $E_{\text{ΠΑΡ}}$ και η $E_{\text{ΠΑΡ}}$, υποθέτοντας την υπό συνθήκη ανεξαρτησία των διαγνωστικών δοκιμών, υπολογίστηκαν ως εξής: $E_{\text{ΠΑΡ}} = 1 - (1 - E_{\text{ELISA}}) * (1 - E_{\text{ΚΚ}})$ και $E_{\text{ΠΑΡ}} = E_{\text{ELISA}} * E_{\text{ΚΚ}}$ (Gardner et al., 2000).

Το ζώο ήταν η μονάδα αναφοράς. Επειδή οι ΑΠ και ΠΠ είναι λοιμώδεις νόσοι και υπάρχουν αναφορές σχετικές με τη συσχέτισή τους με διατροφικούς και παράγοντες διαχείρισης (Lugton, 2004), είναι πιθανή η συσχέτιση των αποτελεσμάτων των διαγνωστικών δοκιμών μεταξύ των ζώων της ίδιας εκτροφής. Εξαιτίας της συσχέτισης αυτής η διακύμανση των ΦΠΠ (επομένως και των Π) αναμενόταν μεγαλύτερη από αυτήν που αναμένεται με βάση τη διωνυμική κατανομή. Γι αυτό, υπολογίστηκε ο ΕΣΣ και

ελέγχθηκε αν διαφέρει σημαντικά από το 0 σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, όπως περιγράφεται από τον Lui (2004). Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο παράγων μεγέθυνσης της διακύμανσης (ΠΜΔ), με βάση τον στατιστικά σημαντικό ΕΣΣ, από τον τύπο: $ΠΜΔ = \sum_i m_i [1 + ΕΣΣ(m_i - 1)] / m_i$, όπου m_i είναι το μέγεθος του $i^{ου}$ κοπαδιού και $m_i = \sum_i m_i$. Ακολούθως, πολλαπλασιάστηκε ο ΠΜΔ με την προβλεπόμενη από τη διωνυμική κατανομή διακύμανση, και προέκυψε η ζυγισμένη εκτίμηση για τη διακύμανση του ΦΠΠ ($\Delta_{\Phi ΠΠ}$). Το 95% διάστημα εμπιστοσύνης (δ.ε.) υπολογίστηκε ως: $\Phi ΠΠ \pm 1,96 * \Delta_{\Phi ΠΠ}^{1/2}$ (Lui, 2004). Η ζυγισμένη διακύμανση για το Π, Δ_{Π} υπολογίστηκε ως: $\Delta_{\Pi} = \Delta_{\Phi ΠΠ} / I^2$ όπου $I = E_{\Pi AP} + E_{\Pi AP} - 1$. Το 95% δ.ε. για το Π υπολογίστηκε ως: $\Pi \pm 1,96 * \Delta_{\Pi}^{1/2}$ (Greiner and Gardner, 2000).

Η σχέση μεταξύ της γονιμότητας και της υποκλινικής λοίμωξης με MAP διερευνήθηκε με τον υπολογισμό μοντέλων στο περιβάλλον του στατιστικού λογισμικού SAS[®] (με τη χρήση της μακροεντολής GLIMMIX). Τα δεδομένα μας ήταν ιεραρχικά δομημένα, πράγμα που σημαίνει ότι η διακύμανση μεταξύ των κοπαδιών αναμένεται μεγαλύτερη από τη διακύμανση μεταξύ των ζώων μέσα σε κάθε κοπάδι. Επομένως, χρησιμοποιήθηκαν πολύ-επίπεδα μοντέλα λογιστικής ανάλυσης παλινδρόμησης με τον παράγοντα κοπάδι ως μεταβλητή με τυχαίο αποτέλεσμα. Η εξαρτημένη μεταβλητή ήταν η γονιμότητα κάθε ζώου. Αρχικά, η σχέση κάθε μιας ανεξάρτητης μεταβλητής, με σταθερό αποτέλεσμα, με τη γονιμότητα ελέγχθηκε με την εισαγωγή της κάθε μιας χωριστά στο μοντέλο. Επειδή η συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας των ζώων και του αριθμού τοκετών ήταν υψηλή ($r=0,9$, $P<0,001$), η λιγότερο σημαντική απ' αυτές τις μεταβλητές (ηλικία των ζώων) αποκλείστηκε από την περαιτέρω ανάλυση. Η ισχύς της υπόθεσης της γραμμικότητας στη λογαριθμική κλίμακα για τη συνεχή μεταβλητή αριθμός τοκετών, ελέγχθηκε γραφικά όπως προτάθηκε από τους Hosmer and Lemeshow (1989). Η μεταβλητή είδος του ζώου δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τελικά, οι στατιστικά σημαντικές, σε επίπεδο σημαντικότητας 25%, μεταβλητές κατά την αρχική διερεύνηση (αριθμός τοκετών και υποκλινική λοίμωξη με MAP), εισήχθησαν ταυτόχρονα στο μοντέλο. Ακολούθως, εισήχθη η πρώτου βαθμού αλληλεπίδρασή τους και ελέγχθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Ήταν σημαντική και διατηρήθηκε στο μοντέλο. Προκειμένου να βελτιωθεί η ερμηνεία του μοντέλου, χωρίς όμως να μειωθεί η προσαρμογή του στα δεδομένα, υπολογίστηκε, με τη χρήση εντολών CONTRAST, ο σχετικός λόγος των πιθανοτήτων (ΣΛΠ) για κάθε αριθμό προηγηθέντων τοκετών. Με βάση τις εκτιμήσεις του ΣΛΠ, ο αριθμός των τοκετών ομαδοποιήθηκε σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη περιελάμβανε ζώα που είχαν πραγματοποιήσει έως και τρεις τοκετούς, η δεύτερη ζώα με 4 έως και 6 τοκετούς, και η τρίτη ζώα με περισσότερους από 6 τοκετούς. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η καλή προσαρμογή του μοντέλου που ενσωμάτωνε τον αριθμό των τοκετών ως κατηγοριοποιημένη μεταβλητή, σε σχέση με το μοντέλο που ενσωμάτωνε τον αριθμό των τοκετών ως συνεχή μεταβλητή. Η προσαρμογή των δύο μοντέλων στα δεδομένα ήταν εξίσου καλή (δοκιμή LR χ^2 , με 2 βαθμούς ελευθερίας=2,3, τιμή $P=0,3$). Η καλή προσαρμογή του τελικού μοντέλου στα δεδομένα (που περιείχε τον αριθμό των τοκετών ως κατηγοριοποιημένη μεταβλητή) ελέγχθηκε με βάση το αν ο λόγος της δοκιμής του χ^2 κατά Pearson προς τους βαθμούς ελευθερίας του μοντέλου, αποκλίνει από τη μονάδα (Witte et al., 2000). Οι ΣΛΠ και τα 95% δ.ε. για κάθε κατηγορία αριθμού τοκετών υπολογίστηκαν με τη χρήση κατάλληλων εντολών ESTIMATE.

Τέλος, υπολογίστηκε το ζυγισμένο οφειλόμενο κλάσμα (ZOK) και τα 95% δ.ε., όπως περιγράφεται από το Lui (2001, 2004). Το ZOK είναι το ποσοστό κατά το οποίο αναμένεται να μειωθεί το ποσοστό των αγόνιμων ζώων αν δεν ήταν προσβεβλημένα από παραφουματίωση ζώα του πληθυσμού της μελέτης.

4.4. Αποτελέσματα

Δεν υπήρχαν δεδομένα σε σχέση με τον αριθμό των τοκετών για 31 ζώα που πρόσφατα αποκτήθηκαν από τους παραγωγούς. Τα ζώα αυτά αποκλείστηκαν από την ανάλυση. Δεκαοκτώ από τα 173 πρόβατα και 58 από τις 196 αίγες ήταν υποκλινικά προσβεβλημένες. Στα πρόβατα, 8 ήταν θετικά μόνο στην ΚΚ, 9 ήταν θετικά μόνο στην ELISA και 1 ήταν θετικό και στις δύο διαγνωστικές δοκιμές. Στις αίγες, 7 ήταν θετικές μόνο στην ΚΚ, 49 ήταν θετικές μόνο στην ELISA και 2 ήταν θετικές και στις δύο διαγνωστικές δοκιμές. Τριάντα τρία πρόβατα και 34 αίγες δε γέννησαν απογόνους την εποχή των τοκετών που προηγήθηκε της δειγματοληψίας. Το ΦΠΠ των υποκλινικά προσβεβλημένων ζώων ήταν 10,4% (95% δ.ε.: 3,6-17,2%) και 29,7% (13,6-45,6%) στα πρόβατα και τις αίγες, αντίστοιχα. Η κατανομή των υποκλινικά προσβεβλημένων και υγιών ζώων σε σχέση με τον αριθμό των τοκετών παρουσιάζεται στον πίνακα 2. Η Ε_{ΥΠ}ΑΡ και η Ε_{ΙΠ}ΑΡ υπολογίστηκαν 51% και 96% στα πρόβατα και 68% και 92% στις αίγες, αντίστοιχα. Το Π υπολογίστηκε 14% (0,1-28%) και 35,9% (9,2-62,7%) στα πρόβατα και τις αίγες, αντίστοιχα.

Πίνακας 2. Η κατανομή των υποκλινικά προσβεβλημένων από *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (τον Απρίλιο-Μάιο του 2002) ελληνικών προβάτων και αιγών προερχομένων από 4 κοπάδια, σε σχέση με τον αριθμό των προηγούμενων τοκετών και τη γέννηση ή όχι ζωντανών αμνών ή εριφίων κατά την προηγηθείσα περίοδο τοκετών (από το Νοέμβριο του 2001 έως τον Ιανουάριο του 2002).

Γέννηση ζωντανών αμνών ή εριφίων κατά την προηγηθείσα περίοδο τοκετών	Αριθμός προηγούμενων τοκετών	Συνολικός αριθμός ζώων	% ζώων υποκλινικά προσβεβλημένων από MAP
Ναι	< 4	138	23,2
	4 – 6	111	20,7
	> 6	53	20,7
Όχι	< 4	41	7,3
	4 - 6	21	14,3
	> 6	5	80,0

Η σχέση της γονιμότητας των προβάτων και των αιγών με την πιθανότητα υποκλινικής λοίμωξης με MAP, μεταβάλλονταν ανάλογα με τον αριθμό των τοκετών. Ο ΕΣΣ ήταν 0,1 και η μεταβλητή με τυχαίο αποτέλεσμα (κοπάδι) ήταν σημαντική (Δοκιμή LR (με 3 βαθμούς ελευθερίας)=88, τιμή $P < 0,0001$). Στον πίνακα 3 δίνονται οι εκτιμηθέντες από το τελικό μοντέλο ΣΛΠ. Ζώα με αριθμό τοκετών < 4 ήταν πιο πιθανό να ήταν γόνιμα και υποκλινικά προσβεβλημένα, παρά υγιή. Ζώα με αριθμό τοκετών > 6 ήταν πιο πιθανό να μη ήταν γόνιμα όταν ήταν υποκλινικά προσβεβλημένα, παρά υγιή. Αν τα τελευταία αυτά ζώα δεν ήταν υποκλινικά προσβεβλημένα, θα αναμενόταν 19% (13,5-65,4%) περισσότερες γεννήσεις από τα ζώα αυτής της κατηγορίας κατά την προηγηθείσα της δειγματοληψίας περίοδο τοκετών.

Πίνακας 3. Οι εκτιμήσεις και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (δ.ε.) των σχετικών λόγων πιθανοτήτων (ΣΛΠ) για τη σχέση μεταξύ της πιθανότητας γέννησης ζωντανού αμνού ή εριφίου κατά την προηγηθείσα περίοδο τοκετών και την υποκλινική λοίμωξη από MAP, ανάλογα με τον αριθμό των προηγούμενων τοκετών, σε ελληνικά πρόβατα και αίγες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης.

Αριθμός προηγούμενων τοκετών	Υποκλινική λοίμωξη MAP	ΣΛΠ με	95% δ.ε.	Τιμή P
< 4	Όχι	1	-	0,007
	Ναι	5,4	1,5-13,3	
4 – 6	Όχι	1	-	0,80
	Ναι	1,2	0,3-4,5	
> 6	Όχι	1	-	0,004
	Ναι	0,05	0,007-0,4	

Τιμή δοκιμής χ^2 του Pearson=338, βαθμοί ελευθερίας του μοντέλου=358

4.5. Συζήτηση

Η μελέτη αυτή ήταν τμήμα μίας μεγαλύτερης μελέτης, στόχος της οποίας ήταν να εξετάσει αν είδη της άγριας πανίδας που έρχονται σε επαφή με σταβλισμένα μικρά μηρυκαστικά, παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδημιολογία της παραφυματώσεως (αριθμός συμβολαίου E.E. QLK2-CT-2001-00879). Γι' αυτόν το σκοπό, 4 κοπάδια με κλινική νόσο, εργαστηριακά επιβεβαιωμένα πριν την έναρξη της μελέτης, τέθηκαν υπό εντατική παρακολούθηση για 2 χρόνια. Αρχικά, οι κτηνοτρόφοι ενημερώθηκαν για το σκοπό της μελέτης και συμφώνησαν δύο ερευνητές να επισκέπτονται τις εγκαταστάσεις των εκτροφών για να παγιδεύουν άγρια ζώα κάθε δεύτερη μέρα, για τα έτη 2001 και 2002. Αυτή η τακτική παρακολούθηση των εκτροφών δεν παρενέβαινε στην πρακτική διαχείρισης ή τις διαχειριστικές αποφάσεις που ελάμβανε ο παραγωγός με οποιονδήποτε τρόπο, ήταν όμως τέτοια, ώστε να διασφαλίσει την υψηλή ποιότητα των δεδομένων που καταγράφηκαν και αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία. Το ακολουθούμενο ημι-εντατικό σύστημα εκτροφής των κοπαδιών της μελέτης δε διέφερε από το σύνηθες σύστημα που

ακολουθείται από την πλειοψηφία των ελληνικών εκτροφών. Δεν υπάρχει, επομένως, κανείς προφανής λόγος να θεωρήσουμε ότι τα αποτελέσματά μας δεν αφορούν το μεγαλύτερο ποσοστό των ελληνικών εκτροφών μικρών μηρυκαστικών.

Οι εκτιμήσεις, κατά Rogan - Gladen, του Π των υποκλινικά προσβεβλημένων ζώων ήταν αρκετά υψηλότερες από το ΦΠΠ. Αυτό αναμενόταν επειδή και η ορολογική δοκιμή και η καλλιέργεια κοπράνων έχουν υψηλή Ει, αλλά υστερούν σε Ευ στις υποκλινικά προσβεβλημένες προβατίνες και αίγες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης (Κεφάλαιο 2 & 3). Ο ορισμός των υποκλινικά προσβεβλημένων ζώων περιελάμβανε την παράλληλη ερμηνεία δύο διαγνωστικών δοκιμών που μετρούν δύο διαφορετικά και ανεξάρτητα χαρακτηριστικά της λοίμωξης με MAP, την απέκκριση του μικροοργανισμού με τα κόπρανα και τη χυμική ανοσολογική απάντηση του οργανισμού (με παραγωγή, κυρίως, IgG1 και IgG2) στο MAP (Whittington and Sergeant, 2001). Η ταυτόχρονη χρήση τους υιοθετήθηκε πρόσφατα, προκειμένου να βελτιωθεί η διαγνωστική ευαισθησία της διαγνωστικής διαδικασίας σε προσβεβλημένους πληθυσμούς βοοειδών με μέτριο Π (Nielsen, 2002a).

Υπάρχουν βιολογικοί λόγοι που εξηγούν την έλλειψη Ευ κάθε διαγνωστικής δοκιμής και την επακόλουθη έλλειψη Ευ της παράλληλης ερμηνείας τους. Τα θετικά στην καλλιέργεια ζώα υποτίθεται ότι είναι προσβεβλημένα και επωάζουν την κλινική νόσο. Αυτή η υπόθεση συνήθως, αλλά όχι πάντα, ισχύει επειδή μπορεί να υπάρξουν σπάνιες περιπτώσεις παθητικής διάβασης των μυκοβακτηριδίων μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα (Sweeney et al., 1992). Η απέκκριση του MAP, εντούτοις, από τα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα είναι διαλείπουσα και, τουλάχιστον στα βοοειδή, η απέκκριση του μικροοργανισμού μπορεί να είναι ανομοιόμορφα κατανεμημένη στη μάζα των κοπράνων, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην ύπαρξη ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, όσον αφορά την καλλιέργεια αλλά και στην αντίληψη ότι η απέκκριση είναι διαλείπουσα (Whittington and Sergeant, 2001).

Οι βιολογικοί λόγοι για την ανεπάρκεια που εμφανίζει η δοκιμή της ELISA, βασίζονται στο ακόλουθο παθογενετικό και ανοσολογικό πρότυπο. Κατά τη λοίμωξη, μετά από τη διά στόματος πρόσληψη του MAP, τα μυκοβακτηρίδια προσλαμβάνονται στον ειλεό από τα κύτταρα -M και μεταφέρονται στα υπό και ενδο-επιθηλιακά μακροφάγα (Momotani et al., 1988). Με τη φαγοκύτωση των μυκοβακτηριδίων από τα μακροφάγα, μπορούν να εμφανιστούν δύο κύριες ανοσολογικές απαντήσεις: η κυτταρικού τύπου, που ελέγχεται από τα T_H1-λεμφοκύτταρα, ή η χυμικού τύπου, που ελέγχεται από τα T_H2-λεμφοκύτταρα (Waters, 2001; Nielsen, 2002a). Οι δύο τύποι της ανοσολογικής απάντησης βρίσκονται, ουσιαστικά, σε μια ισορροπία, στα πλαίσια της οποίας οι παράγοντες που καθορίζουν την κυριαρχία δεν είναι αρκετά κατανοητοί. Αρχικά, η κυτταρικού τύπου ανοσολογική απάντηση κυριαρχεί και το ανοσοποιητικό σύστημα είναι σε θέση να ελέγξει τη λοίμωξη, αν όχι εξουδετερώνοντας όλα τα MAP, τουλάχιστον κρατώντας τα σε χαμηλό επίπεδο στο προσβεβλημένο ζώο (Schorey et al., 1997). Κατά τη διάρκεια της κυτταρικού τύπου ανοσολογικής απάντησης, η χυμική ανοσολογική απάντηση, και επομένως η παραγωγή αντισωμάτων, είναι σε ύφεση (Chiodini, 1996). Τα γεγονότα που οδηγούν στη μετατόπιση από την κυριαρχία των T_H1-λεμφοκυττάρων στην κυριαρχία των T_H2-λεμφοκυττάρων είναι κατά ένα μεγάλο μέρος άγνωστα, αλλά γενικά θεωρείται ότι μόλις κυριαρχήσουν τα T_H2-λεμφοκύτταρα, η ανοσολογική απάντηση δεν αναστρέφεται (Waters, 2001). Με την κυριαρχία των T_H2-λεμφοκυττάρων, οι αλλοιώσεις, που αρχικά περιορίζονταν στις ειλεακές πλάκες του

Peyer, εξελίσσονται σε διάχυτη κοκκιοματώδη εντερίτιδα, χαρακτηριζόμενη από αισθητή πάχυνση του εντέρου και την παρουσία πληθώρας μυκοβακτηριδίων εντός των μακροφάγων που απαρτίζουν τα κοκκιώματα (Perez et al., 1996; Corra et al., 2000). Ο χρόνος μετάβασης από το ένα στο άλλο είδος ανοσολογικής απάντησης είναι άγνωστος. Επίσης, άγνωστη είναι η σχέση της ηλικίας με την ευαισθησία στη λοίμωξη με MAP των προβάτων και των αιγών, δεδομένου ότι δεν έχει ερευνηθεί λεπτομερώς σε άλλα προσβαλλόμενα είδη εκτός από τα βοοειδή (Chiodini and Davis, 1993; Wyatt et al., 1994). Όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν την πιθανότητα λανθασμένης ταξινόμησης των υποκλινικά προσβεβλημένων ζώων σε υγιή. Δεν υπάρχει προφανής λόγος αυτό το σφάλμα κατάταξης να μην είναι τυχαία κατανομημένο μεταξύ γόνιμων και αγόνιμων ζώων. Επομένως, αυτή η τυχαία κατανομή του λάθους μειώνει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων και συνεπώς ελαττώνει τη ένταση των παρατηρηθέντων συσχετισμών.

Η διαπίστωση ότι τα νεαρά ζώα, με αριθμό τοκετών < 4, είναι πιθανότερο να είναι γόνιμα παρά αγόνιμα όταν είναι υποκλινικά προσβεβλημένα, φαίνεται, με μια πρώτη ματιά, πως είναι δύσκολο να εξηγηθεί. Είναι γνωστό ότι η λοίμωξη με MAP είναι εύκολο να επιτευχθεί με χαμηλές δόσεις (Sweeney et al., 1992; Whittington and Sergeant, 2001) και πως, σε ένα μολυσμένο περιβάλλον, τα περισσότερα νεαρά ζώα προσβάλλονται. Ανάλογα με την παρουσία ή όχι παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της μολύνουσας δόσης, τα νεαρά ζώα είτε εξουδετερώνουν τη λοίμωξη είτε αυτή εγκαθίσταται, προκαλώντας αρχικά την ελάχιστη ιστολογική αντίδραση. Σε όσα ζώα η λοίμωξη εγκαταστάθηκε όταν ήταν πολύ νέα, η ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ως μηχανισμός μη απόρριψης του εμβρύου, φαίνεται να ευνοεί την επιδείνωση της λοίμωξης και τη μετατροπή τους σε οροθετικά. Ο Luppi (2003), σε μια πρόσφατη ανασκόπηση των ανοσολογικών μηχανισμών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης στον άνθρωπο, ανέφερε την καταστολή της δραστηριότητας των T κυττάρων ως τη βάση της αυξημένης ευαισθησίας του μητρικού οργανισμού σε λοιμώξεις προερχόμενες από ιούς και συγκεκριμένα ενδοκυτταρικά παθογόνα, όπως η *Listeria* spp., τα οποία διαφεύγουν της φαγοκυττάρωσης από τα μονοκύτταρα. Αντιθέτως, η λειτουργία των B-κυττάρων και η, μετά από εμβολιασμό, παραγωγή αντισωμάτων, ήταν κανονικές κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν ότι το μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα, όταν ενεργοποιείται, είναι πιθανότερο να ανταποκριθεί με την παραγωγή αντισωμάτων και όχι τόσο με ενεργοποιημένα T-κύτταρα. Σε συμφωνία με αυτά, οι Avelino et al. (2003) διαπίστωσαν ότι η εγκυμοσύνη ήταν παράγων επικινδυνότητας για την οροθετικότητα σε θετικές εγκύων με οξεία τοξοπλάσμωση - ένα άλλο σημαντικό στην ιατρική του ανθρώπου αλλά και την κτηνιατρική, ενδοκυτταρικό παθογόνο. Στα ζώα, ο Entrican (2002) προέβη σε εκτενή ανασκόπηση της ρύθμισης των ανοσολογικών μηχανισμών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τις αλληλεπιδράσεις ξενιστή - παθογόνου παράγοντα. Κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η προγεστερόνη ευνοεί την ανάπτυξη T_H2 λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, οι Feola et al. (1999) διαπίστωσαν ότι στα βοοειδή η προλακτίνη και η αυξητική ορμόνη μειώνουν τη δυνατότητα των μακροφάγων να ελέγξουν την ενδοκυτταρική ανάπτυξη του MAP *in vitro*, επίδραση η οποία ήταν μεγαλύτερη όταν αφαιρέθηκαν οι ορμόνες μετά από *in vitro* καλλιέργεια 5 ημερών. Συνεπώς, μπορεί να υποτεθεί ότι οι διακυμάνσεις στη συγκέντρωση αυτών των ορμονών στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια του τοκετού και της γαλακτοπαραγωγής, ίσως να καθιστούν τα φαγοκύτταρα ανεκτικά στην ενδοκυτταρική αύξηση του MAP. Υπέρ αυτής της υπόθεσης, οι προαναφερθέντες

ερευνητές παρατήρησαν αυξημένο ενδοκυτταρικό πολλαπλασιασμό του MAP in vitro σε μονοκύτταρα που ελήφθησαν από μια αγελάδα κατά τη διάρκεια της επιλόχειας περιόδου.

Η σφαγή των προβάτων σε μικρότερη ηλικία, ίσως είναι ένας τρόπος να μειωθούν οι απώλειες λόγω ΠΠ, αφού μειώνεται η μόλυνση των λειμώνων και περιορίζεται η συχνότητα κλινικής νόσου στα μεγαλύτερα σε ηλικία ζώα (Sergeant and Whittington, 2000). Σε μια μελέτη χρονικού σημείου στην Αυστραλία για τη διερεύνηση των παραγόντων που συνδέονται με την εμφάνιση κλινικής ΠΠ, ο παράγων «καθυστερημένη σφαγή ηλικιωμένων ζώων» συσχετίστηκε με την υψηλότερη συχνότητα θανάτου λόγω ΠΠ (Lugton, 2004). Εντούτοις, η πρακτική σφαγής ηλικιωμένων ζώων σπάνια υιοθετείται όπου υπάρχει δυσκολία παραγωγής αντικαταστάσεων ή όταν οδηγείται στη σφαγή υπερβολικά μεγάλος αριθμός νεαρών ζώων. Επειδή τα κοπάδια στην παρούσα μελέτη ήταν προσβεβλημένα από κλινική παραφυματίωση για πολλά χρόνια, οι κτηνοτρόφοι ήταν πεπειραμένοι και εξαιρετικά ικανοί στο να αναγνωρίζουν και να σφάζουν πρόωρα τα προσβεβλημένα ζώα, ενώ, παράλληλα, κρατούσαν τα ζώα μεγαλύτερης ηλικίας για να διατηρήσουν το συνολικό μέγεθος του κοπαδιού σχετικά σταθερό. Αυτή η πρακτική διαχείρισης, ίσως εισήγαγε μια προκατάληψη λόγω κακής επιλογής, η οποία είχε επιπτώσεις ως προς τη δυνατότητα να καταδειχθεί μια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της υποκλινικής λοίμωξης από MAP και της γονιμότητας στα ζώα με μεσαίο αριθμό τοκετών (από 4 έως και 6).

Τα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα κινδυνεύουν περισσότερο να βρεθούν σε αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο (AEI) λόγω της μειωμένης εντερικής απορρόφησης θρεπτικών ουσιών. Η κοκκιωματώδης εντερίτιδα και η πάχυνση του βλεννογόνου, που είναι χαρακτηριστικά της παραφυματίωσης, οδηγούν σε σύνδρομο δυσ-απορρόφησης και εντερίτιδας χαρακτηριζόμενης από απώλεια πρωτεϊνών (Kreger, 1991). Δεν έχει καθοριστεί εάν οι αλλοιώσεις στο έντερο υποκλινικά προσβεβλημένων ζώων μειώνουν αρκετά την απορροφητική ικανότητα του εντέρου ώστε να προκαλέσουν AEI. Εντούτοις, αγελάδες που εμφανίζουν ακόμη και μια ήπια μείωση της λειτουργικότητας του εντέρου λόγω υποκλινικής νόσου, διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο σημαντικής αρνητικής ενεργειακής ισορροπίας κατά τη διάρκεια της περιόδου αμέσως μετά τον τοκετό και μέχρι την περίοδο μέγιστης γαλακτοπαραγωγής (Johnson-Ifearulundu et al., 2000). Στις αγελάδες, αμέσως μετά τον τοκετό, η γαλακτοπαραγωγή τίθεται σε προτεραιότητα έναντι της αναπαραγωγής (Lucy et al., 1992). Έτσι η υποκλινική λοίμωξη οδηγεί τελικά σε παράταση της άνοιστης περιόδου και ως εκ τούτου στην καθυστερημένη επανάληψη των ωοθηκικών κύκλων (Beam and Butler, 1997; Stagg et al., 1998; Roche and Diskin, 2000). Στα πρόβατα και τις αίγες, αυτή η περίοδος υψηλής επικινδυνότητας για AEI, η περίοδος αμέσως μετά τον τοκετό, συμπίπτει με την άνοιστη περίοδο, και επομένως δε θα έπρεπε να αναμένεται καμία άμεση επίδραση στους αναπαραγωγικούς δείκτες. Οι αίγες και τα πρόβατα, όμως, χάνουν, συνήθως, βάρος κατά τη μακρά γαλακτική περίοδο και βρίσκονται στο τέλος της σε μη βέλτιστη θρεπτική κατάσταση, παρά την προσπάθεια κάλυψης των διατροφικών αναγκών με συμπληρώματα. Μετά την διακοπή της άμελης, τα ζώα, συνήθως, μετακινούνται στους φυσικούς λειμώνες. Η αναπαραγωγική περίοδος αρχίζει στα τέλη Ιουνίου, όταν η βλάστηση είναι φτωχή λόγω του ζεστού και ξηρού ελληνικού καλοκαιριού. Επομένως, μπορεί να υποθεθεί ότι όταν τα ζώα είναι στους λειμώνες, η καταναλισκόμενη ενέργεια πρέπει να καταναλωθεί μεταξύ της σωματικής δραστηριότητας και της συντήρησης. Αυτό, ενδεχομένως τα εκθέτει σε AEI (ακόμα και

ήπιο), το οποίο επιδεινώνεται από το οφειλόμενο στην υποκλινική λοίμωξη με MAP σύνδρομο δυσ-απορρόφησης.

Η φύση του σχεδιασμού της μελέτης (μελέτη χρονικού σημείου) δε διασφαλίζει ότι τα αγόνιμα ζώα μολύνθηκαν πράγματι πριν από τη χρονική στιγμή για την οποία καταγράφηκε η γονιμότητά τους. Εντούτοις, η μικρή χρονική περίοδος μεταξύ της αναπαραγωγικής περιόδου και της δειγματοληψίας, σε συνδυασμό με τη δεδομένη μακροχρόνια επώαση που προηγείται της εμφάνισης ανιχνεύσιμης χυμικής ανοσολογικής απάντησης και απέκκρισης του MAP με τα κόπρανα, καθιστούν αυτή την υπόθεση εύλογη.

Τα αποτελέσματα απ' αυτήν τη μελέτη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βάση για μια περισσότερο εστιασμένη διερεύνηση για τη διευκρίνιση της σχέσης αιτίου-αιτιατού. Ο αριθμός των τοκετών φαίνεται να είναι σημαντικός παράγων που τροποποιεί τη σχέση μεταξύ γονιμότητας και υποκλινικής παραφυματίωσης στις προβατίνες και τις αίγες γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την προσπάθεια ερμηνείας αυτής της σχέσης. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός των τοκετών τροποποιεί τη σχέση μεταξύ οροθετικότητας και της μορφής των καμπυλών γαλακτοπαραγωγής στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες (Nielsen et al., 2002c; Kudahl et al., 2004).

4.6. Βιβλιογραφία

1. Abbas, B., Riemann, H.P., Hird, D.W., 1983. Diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in northern California and a note on its economic significance. *Calif. Vet.* 8, 20-24.
2. Avelino, M.M., Campos, D.J., do Carmo Barbosa de Parada, J., de Castro, A.M., 2003. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 108,19-24.
3. Beam, S.W., Butler, W.R., 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56, 133-142.
4. Buergelt, C.D., Duncan, J.R., 1978. Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173, 478-480.
5. Campbell, M.K., Thomson, S., Ramsay, C.R., MacLennan, G.S., Grimshaw, J.M., 2004. Sample size calculator for cluster randomized trials. *Comput. Biol. Med.* 34,113-125.
6. Chiodini, R.J., Davis, W.C., 1993. The cellular immunology of bovine paratuberculosis: immunity may be regulated by cd4+ helper and cd8+ immunoregulatory t lymphocytes which down-regulate gamma/delta+ t-cell cytotoxicity. *Microb. Pathogen.* 14, 355-367.
7. Chiodini, R.J., 1996. Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 313-343.
8. Collins, M.T., Sockett, D.C., Ridge, S., Cox, J.C., 1991. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 29, 272-276.
9. Corpa, J.M., Garrido, J., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255-265.
10. Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J., 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using IS900 RFLP. *Aust. Vet. J.* 78, 184-190.
11. DeLisle, G.W., Milestone, B.A., 1989. The economic impact of Johne's disease in New Zealand. In: Milner, A.R., Wood, P.R. (Eds.), *Johne's Disease, Current Trends in Research, Diagnosis and Management*. CSIRO, Victoria, Australia, pp. 41-45.
12. Dubash, K., Shulaw, W.P., Bech-Nielsen, S., Stills, H.F.Jr., Slemmons, R.D., 1995. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay licensed by the USDA for use in cattle for diagnosis of ovine paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 347-351.
13. Entrican, G., 2002. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Pathol.* 126, 79-94.
14. Feola, R.P., Collins, M.T., Czuprynski, C.J., 1999. Hormonal modulation of phagocytosis and intracellular growth of *Mycobacterium avium* ss. paratuberculosis in bovine peripheral blood monocytes. *Microb. Pathogen.* 26, 1-11.
15. Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev. Vet. Med.* 45, 107-122.
16. Green, E. P., Tizard M. L., Moss M. T., Thompson J., Winterbourne D. J., McFadden J. J., Hermon-Taylor J., 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17, 9063-9073.
17. Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M.E., McKendrick, I., Sharp, J.M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1746-1751.
18. Greiner, M., Gardner, I.A., 2000. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev. Vet. Med.* 45, 43-59.
19. Hilbink, F., West, D.M., de Lisle, G.W., Kittelberger, R., Hosie, B.D., Hutton, J., Cooke, M.M., Penrose, M., 1994. Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet Microbiol.* 41, 107-116.
20. Hope, A.F., Kluver, P.F., Jones, S.L., Condrón, R.J., 2001. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J.* 78, 850-856.

21. Hosmer, D.W. Jr. and Lemeshow, S., 1989. Applied logistic regression. New York, John Wiley & Sons, Inc.
22. Johnson, W.O., Gastwirth, J.L., Pearson, L.M., 2001. Screening without a gold standard: the Hui-Walter paradigm revisited. *Am. J. Epidemiol.* 153, 921-924.
23. Johnson-Ifeorunlu, Y.J., Kaneene, J.B., Sprecher, D.J., Gardiner, J.C., Lloyd, J.W., 2000. The effect of subclinical Mycobacterium paratuberculosis infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 46, 171-181.
24. Kreeger, J.M., 1991. Ruminant paratuberculosis – a century of progress and frustration. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 373-383.
25. Kudahl, A., Nielsen, S.S., Sorensen, J.T., 2004. Relationship between antibodies against Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk and shape of lactation curves. *Prev. Vet. Med.* 62,119-134.
26. Leontides, S., Tomopoulos, D., Christopoulos, C., Tsangaris, T., Exarhopoulos, G., 1975. Paratuberculosis (Johne's disease) in goats in Greece. In: Proceedings of the XXth World Veterinary Congress, Thessaloniki, Greece, pp. 1426-1428.
27. Lucy, M.C., Staples, C.R., Thatcher, W.W., Erickson, P.S., Cleale, R.M., Firkins, J.L., Clark, J.H., Murphy, M.R., Brodie, B.O., 1992. Influence of diet composition, dry matter intake, milk production and energy balance on time of postpartum ovulation and fertility in dairy cows. *Anim. Prod.* 54, 323-331.
28. Lugton, I.W., 2004. Cross-sectional study of risk factors for the clinical expression of ovine Johne's disease in New South Wales farms. *Aust. Vet. J.* 82, 355-365.
29. Lui, K.J., 2001. Notes on interval estimation of the attributable risk in cross sectional sampling. *Stat. Med.* 20, 2051-2056.
30. Lui, K.J., 2004. Statistical estimation of epidemiological risk. New York, John Wiley and Sons, pp. 133-136.
31. Luppi, P., 2003. How immune mechanisms are affected by pregnancy. *Vaccine* 21,3352-3357
32. Merkal, R.S., Larsen, A.B., Booth, G.D., 1975. Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 36, 837-838.
33. McNab, W.B., Meek, A.H., Martin, S.W., Duncan, J.R., 1991a. Associations between dairy production indices and lipoarabinomannan enzyme-immunoassay results for paratuberculosis. *Can. J. Vet. Res.* 55, 356-361.
34. McNab, W.B., Meek, A.H., Duncan, J.R., Brooks, B.W., Van Dreumel, A.A., Martin, S.W., Nielsen, K.H., Sugden, E.A., Turcotte C., 1991b. An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Can. J. Vet. Res.* 55, 252-259.
35. Minas, A., Minas, M., Stournara, A., Tselepidis, S., 2004. The "effects" of Rev-1 vaccination of sheep and goats on human brucellosis in Greece. *Prev. Vet. Med.* 64, 41-47.
36. Molina, A., Morera, L., Llanes, D., 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against Mycobacterium paratuberculosis in goats. *Am. J. Vet. Res.* 52, 863-868.
37. Momotani, E., Whipple, D.L., Thiermann, A.B., Cheville, N.F., 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of Mycobacterium paratuberculosis into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Path.* 25, 131-137.
38. Nielsen, S.S., 2002a. Paratuberculosis in Danish dairy cattle – Interpretation of diagnostic information depending on purpose and disease stage. PhD Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, pp. 138.
39. Nielsen, S.S., Grønbaek, C., Agger, J.F., Houe, H., 2002b. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 53, 191-204.
40. Nielsen, S.S., Grohn, Y.T., Enevoldsen, C., 2002c. Variation of the milk antibody response to paratuberculosis in naturally infected dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85, 2795-2802.
41. Perez, V., Garcia Marin, J.F., Badiola, J.J., 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114, 107-122.
42. Rajukumar, K., Tripathi, B.N., Kurade, N.P., Parihar, N.S., 2001. An enzyme-linked immunosorbent assay using immunoaffinity-purified antigen in the diagnosis of caprine paratuberculosis and its comparison with conventional ELISA's. *Vet. Res. Comm.* 25, 539-553.

43. Ridge, S.E., Morgan, I.R., Sockett, D.C., Collins, M.T., Condrón, R.J., Skilbeck, N.W., Webber, J.J., 1991. Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 68, 253-257.
44. Roche, J.F., Diskin, M.G., 2000. Resumption of reproductive activity in the early postpartum period of cows. In: *Proceedings of the Conference on Fertility in the High Producing Cow*, Galway, pp.
45. Rogan, W.J., Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 107, 71-76.
46. Schorey, J.S., Carroll, M.C., Brown, E.J., 1997. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 277, 1091-1093.
47. Sergeant, E., Whittington, R.J., 2000. A modified Reed-Frost model for the spread of ovine Johne's disease within a recently infected flock. In: *Proceedings of the Ninth Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, Breckenridge, pp. 593-595.
48. Sergeant, E.S., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C., Whittington, R.J., 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61, 235-248.
49. Sockett, C.D., Conrad, A.T., Thomas, B.C., Collins, T.M., 1992. Evaluation of Four Serological Tests for Bovine Paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1134-1139.
50. Stagg, K., Spicer, L.J., Sreenan, J.M., Roche, J.F., Diskin, M.G., 1998. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. *Biol. Reprod.* 59, 777-783
51. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Hamir, A.N., Rosenberger, A.E., Herr, S.A. 1992. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1312-1314.
52. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L., Spencer, P.A., 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 488-493.
53. Waters, W.R., 2001. Immunology of inflammatory diseases of the bowel. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17, 517-534.
54. Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol.* 77, 387-398.
55. Whittington, R.J., Eamens, G.J., Cousins, D.V., 2003. Specificity of absorbed ELISA and agar gel immuno-diffusion tests for paratuberculosis in goats with observations about use of these tests in infected goats. *Aust. Vet J.* 81, 71-75.
56. Whittington, R.J., Marsh, I., Choy, E., Cousins, D.V., 1998. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. paratuberculosis, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cell. Probes* 12, 349-358.
57. Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., Marsh, I., 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3240-3248.
58. Whittington, R.J., Sergeant, E.S.G., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in animal populations. *Aust. Vet. J.* 79, 267-278.
59. Witte, J.S., Greenland, S., Kim, L.L., Arab L., 2000. Multilevel modelling in epidemiology with GLIMMIX. *Epidemiology* 11, 684-688.
60. Wyatt, C.R., Madruga, C., Cluff, C., Parish, S., Hamilton, M.J., Goff, W., Davis, W.C., 1994. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 40, 187-199.

Κεφάλαιο 5

5.1. Γενική Συζήτηση

Οι εκτιμήσεις της αξιοπιστίας των διαγνωστικών δοκιμών, που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία για την παραφυματίωση των βοοειδών, προβάτων και αιγών, βασίστηκαν σε διαγνωστικές δοκιμές επιβεβαίωσης της λοίμωξης από MAP, που, αν και δεν ήταν, θεωρήθηκαν αλάνθαστες. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα οι εκτιμηθείσες τιμές των Ευ και Ει να διαφέρουν των πραγματικών. Κυρίως, η αδυναμία των διαγνωστικών δοκιμών επιβεβαίωσης να ανιχνεύσουν επιτυχώς όλες τις λανθάνουσες μορφές της λοίμωξης από MAP οδήγησε σε υπερεκτίμηση των Ευ. Προφανώς, η υπερεκτίμηση αυτή ήταν μεγαλύτερη στα υποκλινικά από τα κλινικά προσβεβλημένα ζώα αφού και η ικανότητα ανίχνευσης των ζώων αυτών από τις διαγνωστικές δοκιμές επιβεβαίωσης ήταν μικρότερη. Ειδικά στα ζώα αυτά, τα μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης αποτελούν μια εξαιρετική εναλλακτική μέθοδο εκτίμησης της αξιοπιστίας των διαγνωστικών δοκιμών αφού η εφαρμογή τους δεν προϋποθέτει τη γνώση της πραγματικής κατάστασης της υγείας των ζώων. Η εφαρμογή της κατά Bayes μεθοδολογίας στην επίλυση των μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης, επιτρέπει αφενός την εισαγωγή εκ των προτέρων πληροφοριών για την Ευ και Ει των διαγνωστικών δοκιμών συμβάλλοντας έτσι στη βελτιστοποίηση των εκτιμήσεων, αφετέρου τον ευέλικτο έλεγχο της υπόθεσης της υπό συνθήκη ανεξαρτησίας των διαγνωστικών δοκιμών.

Η κατανομή του τύπου των στελεχών του MAP είναι διαφορετική μεταξύ βοοειδών, αιγών και προβάτων. Οι τύποι των στελεχών έχουν διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης στα τεχνητά καλλιεργητικά υποστρώματα και, ενδεχομένως, επηρεάζονται διαφορετικά από τα πρωτόκολλα απομάκρυνσης των επιμολύνσεων. Επίσης, η ευπάθεια και η ανοσολογική απάντηση στη λοίμωξη πιθανώς διαφέρει μεταξύ αιγών και προβάτων ενώ τα στελέχη που απαντώνται στις αίγες και τα πρόβατα ίσως να είναι διαφορετικής λοιμογόνου δύναμης. Επομένως, είναι λάθος, αφενός να υποθέσουμε πως η αξιοπιστία των διαγνωστικών δοκιμών δε διαφέρει μεταξύ βοοειδών και μικρών μηρυκαστικών, αφετέρου να μην αξιολογήσουμε την αξιοπιστία τους χωριστά στις αίγες και τα πρόβατα. Επειδή, εξάλλου, η Ευ των διαγνωστικών δοκιμών εξαρτάται από την κατανομή των σταδίων της λοίμωξης στον υπό μελέτη πληθυσμό αλλά και η Ει μπορεί να διαφέρει μεταξύ περιοχών με διαφορετική περιβαλλοντική μυκοβακτηριδιακή χλωρίδα, είναι προτιμότερη, από την ευθεία αναγωγή εκτιμήσεων που πραγματοποιήθηκαν σε άλλες περιοχές και πληθυσμούς ζώων, η αξιολόγηση της αξιοπιστίας των διαγνωστικών δοκιμών στις υπό μελέτη περιοχές-πληθυσμούς.

Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκαν μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης και η μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes στην αξιολόγηση της αξιοπιστίας τριών ευρύτατα χρησιμοποιούμενων διαγνωστικών δοκιμών, μιας ELISA και δύο μεθόδων καλλιέργειας κοπράνων σε υπόστρωμα HEYM και LJ, για τη διάγνωση της παραφυματίωσης, χωριστά σε αίγες και πρόβατα. Τόσο στα πρόβατα όσο και στις αίγες η εκτιμηθείσα Eu_{ELISA} ήταν μικρότερη των υπαρχόντων στη διεθνή βιβλιογραφία. Αυτό, αναμενόταν αφού οι προγενέστερες εκτιμήσεις βασίστηκαν σε διαγνωστικές δοκιμές επιβεβαίωσης που δεν ανίχνευαν με επιτυχία όλες τις λανθάνουσες μορφές της λοίμωξης με αποτέλεσμα να υπερεκτιμούν την Ευ στα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα σε άγνωστο βαθμό. Μάλιστα, ο βαθμός υπερεκτίμησης ήταν, ενδεχομένως, μεγαλύτερος στα πρόβατα παρά στις αίγες αφού η συχνότητα των υποκλινικά προσβεβλημένων προβάτων είναι συχνά μεγαλύτερη των αιγών και επομένως είναι μεγαλύτερη η πιθανότητα ψευδώς αρνητικών

αποτελεσμάτων των διαγνωστικών δοκιμών επιβεβαίωσης σε αυτά. Η παραδοχή αυτή βασίζεται στην πρόσφατη παρατήρηση ελάχιστου αριθμού φυσικά προσβεβλημένων αιγών με εστιακές αλλοιώσεις και υψηλότερου αριθμού αιγών με διάχυτες αλλοιώσεις, σε σύγκριση με ανάλογες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε φυσικά προσβεβλημένα πρόβατα. Η παρατήρηση αυτή αποδόθηκε σε πιθανή αυξημένη ευπάθεια των αιγών σε σχέση με τα πρόβατα αφού η παρουσία διάχυτων αλλοιώσεων συνδέεται με την αποτυχία της αποτελεσματικής (κυτταρικής) ανοσολογικής απάντησης και την επακόλουθη ανάπτυξη χυμικής ανοσίας. Αυτή η πιθανότητα διαφορετικής ανοσολογικής απάντησης μεταξύ προβάτων και αιγών μπορεί βιολογικά να εξηγήσει τη σημαντικά μεγαλύτερη εκτιμηθείσα Eu_{ELISA} στις αίγες απ' ό,τι στα πρόβατα. Επιπλέον, η πιθανή διαφορά στη λοιμογόνο δύναμη μεταξύ του είδους των στελεχών που κυριαρχούν στα πρόβατα και τις αίγες ίσως να εξηγήσει περαιτέρω τη διαφορετική Eu_{ELISA} μεταξύ των ειδών.

Η διακριτική ικανότητα της ELISA, και για τα δύο είδη, ήταν μέτρια ($0.7 < AUC \leq 0.9$). Το εμβαδόν της καμπύλης ROC ήταν μεγαλύτερο στις αίγες παρά στα πρόβατα, καταδεικνύοντας τη μεγαλύτερη συνολική διακριτική ικανότητα της ELISA στις αίγες. Κατά τη διαδικασία επιλογής βέλτιστων κ.σ.δ., λαμβανομένου υπόψη του σχετικού κόστους ψευδώς αρνητικών και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων καθώς και του αναμενόμενου πραγματικού ποσοστού προσβολής στον υπό μελέτη πληθυσμό, τα επιλεχθέντα βέλτιστα κ.σ.δ. ήταν διαφορετικά για τις αίγες και τα πρόβατα. Οι σχετικές συνέπειες των ψευδώς αρνητικών και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων μιας διαγνωστικής δοκιμής διαφέρουν ανάλογα με το σκοπό της εξέτασης και την υπό μελέτη νόσο. Αποδίδοντας, πενταπλάσιο κόστος μη ανίχνευσης ενός προσβεβλημένου ζώου, σε σχέση με το κόστος μη ανίχνευσης ενός υγιούς, επιλέχθηκαν αισθητά μειωμένα βέλτιστα κ.σ.δ., τα οποία ήταν επίσης διαφορετικά μεταξύ αιγών και προβάτων. Επομένως, είναι σαφές πως η επιλογή του κ.σ.δ. με βάση το είδος του ζώου (αίγα ή πρόβατο) αλλά και το σκοπό της μελέτης θα βελτιώνει την αξιοπιστία της ELISA. Αξίζει να σημειωθεί πως η μείωση των κ.σ.δ. και στα δύο είδη ζώων βελτίωσε σημαντικά την Eu_{ELISA} με μικρή μόνο μείωση της Ei_{ELISA} .

Οι εκτιμήσεις των Eu και των δύο KK ήταν χαμηλές. Ένας από τους λόγους για αυτό ήταν πως οι εκτιμήσεις βασίστηκαν σε δεδομένα προερχόμενα από κλινικά υγιή ζώα. Η Eu_{KK} εξαρτάται από το στάδιο της λοίμωξης, το οποίο συσχετίζεται με το βαθμό απέκκρισης του μικροοργανισμού με τα κόπρανα. Στα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα, ο αριθμός βακτηριδίων στα κόπρανα είναι χαμηλός, συνήθως μη ανιχνεύσιμος και η απέκκρισή διαλείπουσα και μη ομοιογενώς κατανομημένη στη μάζα των κοπράνων με αποτέλεσμα, το ποσοστό των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων να αναμένεται υψηλό. Σε σχέση με τις υπάρχουσες στη βιβλιογραφία εκτιμήσεις για τα βοοειδή, η Eu και των δύο KK ήταν αισθητά χαμηλότερη. Εντούτοις, οι προϋπάρχουσες εκτιμήσεις, όπως και στην περίπτωση της ELISA, ήταν στην πραγματικότητα σχετικές εκτιμήσεις Eu ακόμα και σε σχέση με την ίδια την KK με αποτέλεσμα να υπερεκτιμούν την Eu_{KK} σε άγνωστο βαθμό. Για παράδειγμα, οι Whitlock et al. (2000) χρησιμοποίησαν εσφαλμένα την επαναλαμβανόμενη θετική KK ως αλάνθαστη διαγνωστική δοκιμή αναφοράς, και υπολόγισαν την Eu_{KK} ίση με 42%. Αυτή η εκτίμηση τους έπεσε στο 25% όταν αρνητικά στην επαναλαμβανόμενη KK ζώα, βρέθηκαν θετικά στην ιστοπαθολογική εξέταση που ακολούθησε τη σφαγή, και ορθά κατατάχθηκαν στα προσβεβλημένα. Ακόμα κι έτσι, μερικά προσβεβλημένα ζώα δεν ανιχνεύθηκαν. Συνεπώς, ακόμα και η τιμή του 25% υπερεκτιμά την Eu_{KK} σε κάποιο βαθμό (αν και σαφώς μικρότερο από το 45%), στις

γαλακτοπαραγωγές αγελάδες. Πρόσφατα, αποδόθηκε με τη χρήση μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης και την εξίσωση της μεγίστης πιθανοφάνειας, Eu_{KK} ίση με 20% στα υποκλινικά προσβεβλημένα βοοειδή. Οι υπολογισμοί όμως αυτοί βασίστηκαν σε δεδομένα προερχόμενα από ζώα σε όλα τα στάδια της λοίμωξης, και επομένως και αυτή η εκτίμηση υπερβαίνει την πραγματική τιμή. Πάντως, οι τελευταίες αυτές εκτιμήσεις βρίσκονται πιο κοντά στις δικές μας, που βασίστηκαν μόνο σε υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα και αφορούν αποκλειστικά αυτά. Αν, μάλιστα, ληφθούν υπόψη οι δυσκολίες που παρουσιάζει η καλλιέργεια των στελεχών των μικρών μηρυκαστικών σε σχέση με την καλλιέργεια των στελεχών των βοοειδών, οι εκτιμήσεις μας είναι απολύτως ρεαλιστικές. Στα πρόβατα κυριαρχούν τα στελέχη τύπου I, των οποίων η συντριπτική πλειοψηφία δεν αναπτύσσεται καλά σε τεχνητά υποστρώματα. Στις αίγες απαντώνται στελέχη ίδιου τύπου (II) με τα βόεια. Περιγράφηκαν όμως τελευταία και στελέχη τύπου III, με χαρακτηριστικά ανάπτυξης που παραπέμπουν στα στελέχη τύπου I. Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από φυσικά προσβεβλημένα κοπάδια αιγών γειτνιάζοντα με κοπάδια προβάτων κάτι που ίσχυε και στην παρούσα μελέτη. Η πιθανή επικράτηση στελεχών τύπου I και III στις υποκλινικά προσβεβλημένες αίγες και πρόβατα αυτής της μελέτης περαιτέρω εξηγούν την εκτιμηθείσα Eu_{KK} .

Η Ei_{KK} και στα δύο είδη ήταν σχεδόν αλλά όχι απόλυτη. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζει τη μικρή, αλλά υπαρκτή, πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που μπορεί να οφείλεται (α) στο παθητικό πέρασμα του μικροοργανισμού από τον πεπτικό σωλήνα χωρίς «εγκατάσταση» της λοίμωξης ή (β) ,σπάνια, στην πιθανότητα επιμόλυνσης κατά την επεξεργασία των δειγμάτων.

Η ELISA και η KK ήταν υπό συνθήκη ανεξάρτητες μεταξύ τους. Το φαινόμενο αυτό απαντάται συνηθέστερα σε διαγνωστικές δοκιμές που βασίζονται σε διαφορετική βιολογική αρχή όπως εδώ μεταξύ ELISA και KK. Υπό συνθήκη εξαρτημένες είναι συνήθως οι διαγνωστικές δοκιμές που βασίζονται στη ίδια βιολογική αρχή. Όμως, οι KK αν και εμφάνιζαν εξάρτηση των αποτελεσμάτων τους στα υγιή ζώα ήταν ανεξάρτητες στα υποκλινικά προσβεβλημένα. Η διαπίστωση αυτή εξηγεί και την παρατηρηθείσα φτωχή συμφωνία συνολικά των αποτελεσμάτων των δύο KK που είναι σύμφωνη με προηγούμενες παρατηρήσεις στα βοοειδή. Οι διαγνωστικές δοκιμές μπορεί να εμφανίζουν εξάρτηση των αποτελεσμάτων τους είτε μεταξύ των προσβεβλημένων είτε μεταξύ των υγιών ζώων. Σε αυτή την περίπτωση, πρέπει να διερευνάται η χρήση μοντέλων ημι-εξάρτησης που περιλαμβάνουν είτε μόνο τον γ_{Eu} είτε μόνο τον γ_{Ei} , αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, η αξιολόγηση της αξιοπιστίας των διαγνωστικών δοκιμών με τη χρήση μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης κατέδειξε (α) την ύπαρξη διαφορετικού ορολογικού προφίλ μεταξύ αιγών και προβάτων (β) την ανάγκη επιλογής κ.σ.δ. με βάση το είδος του ζώου, αλλά και το σκοπό της μελέτης (γ) ότι η μείωση του κ.σ.δ. βελτιώνει την Eu_{ELISA} χωρίς να μειώνει την Ei_{ELISA} και στα δύο είδη ζώων (δ) ότι οι KK έχουν πολύ χαμηλή Eu στις υποκλινικά προσβεβλημένες αίγες και πρόβατα (ε) ότι οι μέθοδοι KK μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικές δοκιμές επιβεβαίωσης, λόγω της υψηλής έως και απόλυτης Ei_{KK} και (στ) ότι η παράλληλη ερμηνεία της ELISA και της KK, ως υπό συνθήκη ανεξάρτητων διαγνωστικών δοκιμών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό τη μείωση των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων στα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει διάσταση απόψεων όσον αφορά τη σχέση μεταξύ της γονιμότητας και της λοίμωξης από MAP, στα βοοειδή. Ανάλογες μελέτες δεν

έχουν πραγματοποιηθεί στις αίγες ή τα πρόβατα. Η ασυμφωνία πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι ο ορισμός της νόσου, το είδος και η αξιοπιστία των διαγνωστικών δοκιμών διαφοροποιούνται μεταξύ των δημοσιευμένων μελετών. Εκτός αυτών, στην υπάρχουσα ασυμφωνία πιθανώς συνέβαλε το γεγονός ότι σε ορισμένες μελέτες δε διερευνήθηκε η πιθανή τροποποίηση της σχέσης μεταξύ λοίμωξης με MAP και γονιμότητας ανάλογα με το παραγωγικό στάδιο των ζώων. Πρόσφατα διαπιστώθηκε η τροποποίηση των αποτελεσμάτων των ορολογικών δοκιμών ανάλογα με τον αριθμό των πραγματοποιηθέντων τοκετών και το στάδιο της γαλακτοπαραγωγής. Σε κάθε περίπτωση, τα σφάλματα κατάταξης των διαγνωστικών δοκιμών επηρεάζουν τη διερεύνηση των επιδημιολογικών συσχετισμών. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε η παράλληλη ερμηνεία των δύο εκ των τριών διαγνωστικών δοκιμών που ήταν υπό συνθήκη ανεξάρτητες και είχαν την υψηλότερη Ευ (ELISA και HEYM) με σκοπό τη μείωση των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων στις υποκλινικά προσβεβλημένες αίγες και πρόβατα. Με τον τρόπο αυτό περιορίστηκε η επίπτωση των σφαλμάτων κατάταξης στη μελέτη της σχέσης μεταξύ υποκλινικής παραφυματίωσης και γονιμότητας. Συμπεράναμε ότι η σχέση μεταξύ υποκλινικής λοίμωξης και γονιμότητας μεταβάλλονταν ανάλογα με τον αριθμό των τοκετών που είχαν πραγματοποιήσει τα πρόβατα και οι αίγες. Ζώα με λίγους τοκετούς (<4) ήταν πιθανότερο να είναι γόνιμα παρά αγόνιμα όταν ήταν υποκλινικά προσβεβλημένα. Ζώα με πολλούς τοκετούς (>6) ήταν πιθανότερο να είναι αγόνιμα παρά γόνιμα όταν ήταν υποκλινικά προσβεβλημένα. Πειραματικά και κλινικά δεδομένα στον άνθρωπο και τα ζώα καταδεικνύουν πως η ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ως μηχανισμός μη απόρριψης του εμβρύου, φαίνεται να ευνοεί την επιδείνωση λοιμώξεων οφειλόμενων σε ενδοκυτταρικά παθογόνα, όπως το MAP, καθώς και την ανάπτυξη χυμικής ανοσολογικής απάντησης. Επιπλέον, στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες έχει διαπιστωθεί ότι η προλακτίνη και η αυξητική ορμόνη μειώνουν τη δυνατότητα των μακροφάγων να ελέγξουν την ενδοκυτταρική ανάπτυξη του MAP in vitro. Συνεπώς, μπορεί να υποτεθεί ότι οι διακυμάνσεις στη συγκέντρωση αυτών των ορμονών στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια του τοκετού και της γαλακτοπαραγωγής, ίσως να καθιστούν τα φαγοκύτταρα ανεκτικά στην ενδοκυτταρική αύξηση του MAP. Υπέρ αυτής της υπόθεσης, παρατηρήθηκε αυξημένος ενδοκυτταρικός πολλαπλασιασμός του MAP in vitro σε μονοκύτταρα που ελήφθησαν από μια αγελάδα κατά τη διάρκεια της επιλόχειας περιόδου. Πιθανώς η ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ως μηχανισμός μη απόρριψης του εμβρύου, καθώς και οι συγκεντρώσεις των ορμονών κατά τον τοκετό και την επιλόχεια περίοδο συμβάλλει στην επιδείνωση της λοίμωξης και κατ' επέκταση την ανάπτυξη χυμικής ανοσίας σε νεαρά ζώα, τα οποία μολύνθηκαν στην αρχή της ζωής τους. Στα μεγαλύτερα ζώα, η κοκκιωματώδης εντερίτιδα και η πάχυνση του βλεννογόνου, που είναι χαρακτηριστικά της παραφυματίωσης, οδηγούν σε σύνδρομο δυσαπορρόφησης χαρακτηριζόμενο από απώλεια πρωτεϊνών. Λόγω αυτού, τα υποκλινικά προσβεβλημένα ζώα κινδυνεύουν να βρεθούν σε ΑΕΙ. Αγελάδες που εμφανίζουν ακόμα και μια ήπια μείωση της λειτουργικότητας του εντέρου λόγω υποκλινικής νόσου, διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο σημαντικού ΑΕΙ κατά τη διάρκεια της περιόδου αμέσως μετά τον τοκετό και μέχρι την περίοδο μέγιστης γαλακτοπαραγωγής. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι, αμέσως μετά τον τοκετό, η γαλακτοπαραγωγή τίθεται σε προτεραιότητα έναντι της αναπαραγωγής, οδηγεί τελικά σε παράταση της άνοιστρης περιόδου και ως εκ τούτου

στην καθυστερημένη επανάληψη των ωοθηκικών κύκλων. Στα πρόβατα και τις αίγες, αυτή η περίοδος, συμπίπτει με την άνοιστρον περίοδο, και επομένως δε θα έπρεπε να αναμένεται καμία άμεση επίδραση στους αναπαραγωγικούς δείκτες. Εντούτοις, οι αίγες και τα πρόβατα παρουσιάζουν συνήθως επιδείνωση της θρεπτικής τους κατάστασης κατά το τέλος της μακράς γαλακτοπαραγωγικής περιόδου. Μετά την ξήρανση, τα ζώα μετακινούνται στους φυσικούς λειμώνες. Η αναπαραγωγική περίοδος που αρχίζει στα τέλη Ιουνίου συμπίπτει με την εποχή που η βλάστηση είναι φτωχή λόγω του ζεστού και ξηρού ελληνικού καλοκαιριού. Επομένως, μπορεί να υποθεθεί ότι όταν τα ζώα είναι στους λειμώνες, η καταναλισκόμενη ενέργεια πρέπει να κατανεμηθεί μεταξύ της σωματικής δραστηριότητας και της συντήρησης. Αυτό, ενδεχομένως εκθέτει τα ζώα σε ΑΕΙ (ακόμα και ήπιο), το οποίο επιδεινώνεται από το οφειλόμενο στην υποκλινική λοίμωξη με ΜΑΡ σύνδρομο δυσαπορρόφησης.

5.2. Προοπτικές μελλοντικής έρευνας

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοντέλα λανθάνουσας κατάστασης και μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes για την εκτίμηση της Ευ και της Ει διαγνωστικών δοκιμών στο επίπεδο του ζώου. Για την πιστοποίηση ολόκληρων εκτροφών ή περιοχών είναι απαραίτητη η περαιτέρω εφαρμογή αυτών των μοντέλων και της μεθοδολογίας επίλυσης κατά Bayes, στην εκτίμηση της Ευ και της Ει σε επίπεδο εκτροφής. Η Ευ και η Ει των διαγνωστικών δοκιμών για την παραφυματίωση στο επίπεδο του ζώου βρέθηκαν να διαφέρουν μεταξύ ομάδων βοοειδών διαφορετικής ηλικίας ή/και παραγωγικού σταδίου. Επομένως, η ακρίβεια των εκτιμήσεων της αξιοπιστίας των δοκιμών στο επίπεδο της αιγός ή του προβάτου (και ακολούθως στο επίπεδο της εκτροφής) αναμένεται να βελτιωθεί αν εντοπισθούν παρόμοιοι με τα βοοειδή συσχετισμοί και μεταξύ αυτών.

Το απαιτούμενο ελάχιστο μέγεθος δείγματος εξαρτάται, μεταξύ άλλων, από τις πραγματικές τιμές των προς εκτίμηση παραμέτρων και από τη μεθοδολογία επίλυσης που επιλέγεται. Πρόσφατα, προτάθηκε τρόπος προσδιορισμού του μεγέθους δείγματος που απαιτείται για την εκτίμηση της Ευ και της Ει κατά τον προσδιορισμό των λύσεων μεγίστης πιθανοφάνειας. Ο τρόπος αυτός αφορά την εφαρμογή δύο υπό συνθήκη ανεξάρτητων διαγνωστικών δοκιμών σε δύο πληθυσμούς. Είναι απαραίτητη η γενίκευση του τρόπου υπολογισμού του απαιτούμενου μεγέθους δείγματος για κάθε συνδυασμό αριθμού διαγνωστικών δοκιμών και αριθμού πληθυσμών και μεθοδολογίας επίλυσης (όταν χρησιμοποιείται μεθοδολογία επίλυσης κατά Bayes θα πρέπει επιπλέον να λαμβάνεται υπόψη ο αριθμός των παραμέτρων για τις οποίες είναι διαθέσιμες εκ των προτέρων πληροφορίες, καθώς και το εύρος των τιμών και η πρόβλεψη της πιθανότερης τιμής για την παράμετρο). Επιπλέον, πρέπει να αναπτυχθεί τρόπος υπολογισμού του απαιτούμενου ελάχιστου μεγέθους δείγματος για την εκτίμηση της Ευ και της Ει υπό συνθήκη εξαρτημένων διαγνωστικών δοκιμών.

Τα σφάλματα κατάταξης των διαγνωστικών δοκιμών εισάγουν προκατάληψη λόγω κακής πληροφoρίας στις επιδημιολογικές μελέτες και επηρεάζουν τις εκτιμήσεις των μέτρων επιδημιολογικού συσχετισμού. Ενδιαφέρουσα είναι η ανάπτυξη μοντέλων που κατά την εκτίμηση των μέτρων επιδημιολογικού συσχετισμού, θα επιτρέπουν την ενσωμάτωση, με τη μορφή εκ των προτέρων πληροφοριών, της Ευ και της Ει των

διαγνωστικών δοκιμών. Αναπόφευκτα, αυτή η προσέγγιση προϋποθέτει την χρήση της κατά Bayes μεθοδολογίας επίλυσης στα μοντέλα διερεύνησης πιθανών επιδημιολογικών συσχετισμών.

Τέλος, στην προοπτική εφαρμογής μεγάλων προγραμμάτων ελέγχου και πιστοποίησης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η χρήση των μοντέλων λανθάνουσας κατάστασης και της μεθοδολογίας επίλυσης κατά Bayes στην ποιοτική και ποσοτική διερεύνηση της σχέσης μεταξύ ατομικής και ομαδικής Ευ και Ει των διαγνωστικών δοκιμών όταν χρησιμοποιούνται στον έλεγχο ομάδων δειγμάτων. Στη διεθνή βιβλιογραφία, όποτε εφαρμόζεται ο ομαδικός έλεγχος, είθισται η Ευ και η Ει του να θεωρούνται ίδιες με την Ευ και Ει του ατομικού ελέγχου. Συχνά, όμως η υπόθεση αυτή δεν ισχύει. Ίσως χρειάζεται τροποποίηση των διαγνωστικών κριτηρίων κατάταξης των θετικών και αρνητικών στη διαγνωστική δοκιμή ομάδων για τη βελτιστοποίηση της Ευ και Ει του ομαδικού ελέγχου, ώστε να είναι δυνατή η ευρύτερη εφαρμογή του.

Παράρτημα

1. Κώδικας του λογισμικού WinBugs για την εκτίμηση των Ευ, των Ει και των πραγματικών ποσοστών προσβολής, κατόπιν της εφαρμογής δύο υπό συνθήκη ανεξάρτητων διαγνωστικών δοκιμών σε N πληθυσμούς (N=3).

```
model;
{
y1[1:Q, 1:Q] ~ dmulti(p1[1:Q, 1:Q], n1)
y2[1:Q, 1:Q] ~ dmulti(p2[1:Q, 1:Q], n2)
y3[1:Q, 1:Q] ~ dmulti(p3[1:Q, 1:Q], n3)
p1[1,1] <- pi1*Selisa*Selj + (1-pi1)*(1-Spelisa)*(1-Splj)
p1[1,2] <- pi1*Selj*(1-Selisa) + (1-pi1)*(1-Splj)*Spelisa
p1[2,1] <- pi1*(1-Selj)*Selisa + (1-pi1)*Splj*(1-Spelisa)
p1[2,2] <- pi1*(1-Selisa)*(1-Selj) + (1-pi1)*Spelisa*Splj
p2[1,1] <- pi2*Selisa*Selj + (1-pi2)*(1-Spelisa)*(1-Splj)
p2[1,2] <- pi2*Selj*(1-Selisa) + (1-pi2)*(1-Splj)*Spelisa
p2[2,1] <- pi2*(1-Selj)*Selisa + (1-pi2)*Splj*(1-Spelisa)
p2[2,2] <- pi2*(1-Selisa)*(1-Selj) + (1-pi2)*Spelisa*Splj
p3[1,1] <- pi3*Selisa*Selj + (1-pi3)*(1-Spelisa)*(1-Splj)
p3[1,2] <- pi3*Selj*(1-Selisa) + (1-pi3)*(1-Splj)*Spelisa
p3[2,1] <- pi3*(1-Selj)*Selisa + (1-pi3)*Splj*(1-Spelisa)
p3[2,2] <- pi3*(1-Selisa)*(1-Selj) + (1-pi3)*Spelisa*Splj
Separ <- 1-(1-Selisa)*(1-Selj)
Sppar <- Spelisa*Splj
Eppv1 <- pi1*Selisa/(pi1*Selisa+(1-pi1)*(1-Spelisa))
Enpv1 <- (1-pi1)*Spelisa/((1-pi1)*Spelisa+pi1*(1-Selisa))
Fppv1 <- pi1*Selj/(pi1*Selj+(1-pi1)*(1-Splj))
Fnpv1 <- (1-pi1)*Splj/((1-pi1)*Splj+pi1*(1-Selj))
Eppv2 <- pi2*Selisa/(pi2*Selisa+(1-pi2)*(1-Spelisa))
Enpv2 <- (1-pi2)*Spelisa/((1-pi2)*Spelisa+pi2*(1-Selisa))
Fppv2 <- pi2*Selj/(pi2*Selj+(1-pi2)*(1-Splj))
Fnpv2 <- (1-pi2)*Splj/((1-pi2)*Splj+pi2*(1-Selj))
Eppv3 <- pi3*Selisa/(pi3*Selisa+(1-pi3)*(1-Spelisa))
Enpv3 <- (1-pi3)*Spelisa/((1-pi3)*Spelisa+pi3*(1-Selisa))
Fppv3 <- pi3*Selj/(pi3*Selj+(1-pi3)*(1-Splj))
Fnpv3 <- (1-pi3)*Splj/((1-pi3)*Splj+pi3*(1-Selj))
Selisa ~ dbeta(3.3, 4)
Spelisa ~ dbeta(120, 6)
Selj ~ dbeta(2.9, 4)
Splj ~ dbeta(100, 2)
pi1 ~dbeta(2,5)
pi2 ~ dbeta(2,21)
pi3 ~dbeta(9,10)
}

list(n3=27, n2=92, n1=54,
```

```

y1=structure(.Data=c(0,1,4,49),.Dim=c(2,2)),
y2=structure(.Data=c(0,6,1,85),.Dim=c(2,2)),
y3=structure(.Data=c(1,0,5,21),.Dim=c(2,2)),
Q=2)

```

```
list(pi1=0.50, pi2=0.50, pi3=0.50, Selisa=0.40, Spelisa=0.95, Selj=0.30, Splj=0.95)
```

2. Κώδικας του λογισμικού WinBugs για την εκτίμηση των Ευ, των Ει και των πραγματικών ποσοστών προσβολής, μετά από την εφαρμογή δύο υπό συνθήκη εξαρτημένων διαγνωστικών δοκιμών σε Ν πληθυσμούς (N=3).

```

model;
{
y1[1:Q, 1:Q] ~ dmulti(p1[1:Q, 1:Q], n1)
y2[1:Q, 1:Q] ~ dmulti(p2[1:Q, 1:Q], n2)
y3[1:Q, 1:Q] ~ dmulti(p3[1:Q, 1:Q], n3)
alpha1 <- Selj*Selisa +D
alpha2 <- (1-Splj)*(1-Spelisa) +H
beta1 <- Selj*(1-Selisa) - D
beta2 <-(1-Splj)*Spelisa - H
gamma1 <-(1-Selj)*Selisa - D
gamma2 <-Splj*(1-Spelisa)- H
delta1 <-(1-Selisa)*(1-Selj) + D
delta2 <-Spelisa*Splj + H
z1 <- 1-pi1
z2 <- 1-pi2
z3 <- 1-pi3
p1[1,1] <- pi1*alpha1 + z1*alpha2
p1[1,2] <- pi1*beta1 + z1*beta2
p1[2,1] <- pi1*gamma1 + z1*gamma2
p1[2,2] <- pi1*delta1 + z1*delta2
p2[1,1] <- pi2*alpha1 + z2*alpha2
p2[1,2] <- pi2*beta1 + z2*beta2
p2[2,1] <- pi2*gamma1 + z2*gamma2
p2[2,2] <- pi2*delta1 + z2*delta2
p3[1,1] <- pi3*alpha1 + z3*alpha2
p3[1,2] <- pi3*beta1 + z3*beta2
p3[2,1] <- pi3*gamma1 + z3*gamma2
p3[2,2] <- pi3*delta1 + z3*delta2
Separ <- 1-(1-Selisa)*(1-Selj) - D
Sppar <- Spelisa*Splj + H
Selisa ~ dbeta(3.3, 4)
Spelisa ~ dbeta(120, 6)
Selj ~ dbeta(2.9, 4)
}

```

```

Splj ~ dbeta(100, 2)
pi1 ~dbeta(2,5)
pi2 ~ dbeta(2,21)
pi3 ~dbeta(9,10)
H ~dunif(-1,1)
D ~dunif(-1,1)

```

```

}

```

```

list(n3=65, n2=92, n1=38,
y1=structure(.Data=c(0,0,2,36),.Dim=c(2,2)),
y2=structure(.Data=c(1,3,24,64),.Dim=c(2,2)),
y3=structure(.Data=c(1,3,23,38),.Dim=c(2,2)),
Q=2)

```

```

list(pi1=0.50, pi2=0.50, pi3=0.50, Selisa=0.40, Spelisa=0.95, Selj=0.30, Splj=0.95,
D=0.1, H=0.1)

```

3. Κώδικας του λογισμικού WinBugs για την εκτίμηση των E_u , των E_i και των πραγματικών ποσοστών προσβολής, μετά από την εφαρμογή δύο διαγνωστικών δοκιμών με εξάρτηση των E_i και ανεξαρτησία των E_u , σε N πληθυσμούς ($N=3$)

```

model;
{
y1[1:Q, 1:Q] ~ dmulti(p1[1:Q, 1:Q], n1)
y2[1:Q, 1:Q] ~ dmulti(p2[1:Q, 1:Q], n2)
y3[1:Q, 1:Q] ~ dmulti(p3[1:Q, 1:Q], n3)

alpha1 <- Selj*Selisa
alpha2 <- (1-Splj)*(1-Spelisa) +H
beta1 <- Selj*(1-Selisa)
beta2 <-(1-Splj)*Spelisa - H
gamma1 <-(1-Selj)*Selisa
gamma2 <-Splj*(1-Spelisa)- H
delta1 <-(1-Selisa)*(1-Selj)
delta2 <-Spelisa*Splj + H
z1 <- 1-pi1
z2 <- 1-pi2
z3 <- 1-pi3

p1[1,1] <- pi1*alpha1 + z1*alpha2
p1[1,2] <- pi1*beta1 + z1*beta2
p1[2,1] <- pi1*gamma1 + z1*gamma2
p1[2,2] <- pi1*delta1 + z1*delta2

```

```

p2[1,1] <- pi2*alpha1 + z2*alpha2
p2[1,2] <- pi2*beta1 + z2*beta2
p2[2,1] <- pi2*gamma1 + z2*gamma2
p2[2,2] <- pi2*delta1 + z2*delta2
p3[1,1] <- pi3*alpha1 + z3*alpha2
p3[1,2] <- pi3*beta1 + z3*beta2
p3[2,1] <- pi3*gamma1 + z3*gamma2
p3[2,2] <- pi3*delta1 + z3*delta2

```

```

a1<- -(1-Selisa)*(1-Selj)
b1<- -Selisa*Selj
c1<- Selj*(1-Selisa)
d1<- Selisa*(1-Selj)
A1<- max(a1,b1)
B1<- min(c1,d1)
a2<- -(1-Spelisa)*(1-Splj)
b2<- -Spelisa*Splj
c2<- Splj*(1-Spelisa)
d2<- Spelisa*(1-Splj)
A2<- max(a2,b2)
B2<- min(c2,d2)

```

```

Selisa ~ dbeta(1,1)
Spelisa ~ dbeta(100,2)
Selj ~ dbeta(1,1)
Splj ~ dbeta(100,2)

```

```

pi1 ~dbeta(3.09,7.25)
pi2 ~ dbeta(2.84,56.4)
pi3 ~dbeta(8.11,7.91)

```

```

Separ<- 1- (1-Selisa)*(1-Selj)
Spar<- Spelisa*Splj+H

```

```

H ~dunif(A2,B2)
RH<-H/B2

```

```

}

```

```

list(n3=27, n2=92, n1=54,
y1=structure(.Data=c(0,1,1,52),.Dim=c(2,2)),
y2=structure(.Data=c(0,6,2,84),.Dim=c(2,2)),
y3=structure(.Data=c(0,1,0,26),.Dim=c(2,2)),
Q=2)

```

list(pi1=0.50, pi2=0.50, pi3=0.50, Selisa=0.40, Spelisa=0.95, Selj=0.30, Splj=0.95, H=0)

4. Παράδειγμα της χρήσης της αυτοτελούς λογισμικής μονάδας CODA στο περιβάλλον R για την εφαρμογή της μεθόδου των Raftery και Lewis.

Ακολουθούν αποτελέσματα από το λογισμικό R-CODA, όσον αφορά την εκτίμηση του 50ού εκατοστημορίου με ακρίβεια 1% και βεβαιότητα 95%, καθώς και ο υπολογισμός του παράγοντα I . Αρχικά το πρόγραμμα μάς ενημερώνει για τα δοκιμαστικά δεδομένα που θα χρησιμοποιηθούν. Εν προκειμένω, χρησιμοποιούνται οι πρώτες 10.000 επαναλήψεις της MCMC αλυσίδας.

Iterations used = 1:10.000

με $k=1$

Thinning interval = 1

Sample size per chain = 10.000

Ακολουθεί το όνομα του αρχείου που περιέχει τα δεδομένα:

"c:\my.out"

Στη συνέχεια επιλέγει το επιθυμητό εκατοστημόριο (π.χ. 50ό) καθώς και την επιθυμητή ακρίβεια (π.χ. 0,01) και βεβαιότητα των εκτιμήσεων (π.χ. 0,95 ή 95%):

Quantile (q) = 0.5

Accuracy (r) = +/- 0.01

Probability (s) = 0.95

Εν συνεχεία, το πρόγραμμα μάς δίνει τις τιμές M , N , N_{MIN} και I για την παράμετρο (εδώ, Selisa).

	<i>Burn-in</i> (M)	<i>Total</i> (N)	<i>Lower bound</i> (N_{min})	<i>Dependence factor</i> (I)
<i>Selisa</i>	10	33.816	9.604	3.52

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έχει ως εξής: ο ελάχιστος αριθμός επαναλήψεων N_{MIN} που απαιτούνται για την εκτίμηση του συγκεκριμένου εκατοστημορίου στην επιθυμητή ακρίβεια είναι 9.604, ο προτεινόμενος N είναι 33.816 και ο αριθμός των πρώτων επαναλήψεων M , για τις οποίες δεν έχει επέλθει σύγκλιση τιμών και θα πρέπει να καούν (φάση προσαρμογής), είναι 10. Η τιμή του I είναι μικρότερη του 5, με αποτέλεσμα να μην καταδεικνύεται πρόβλημα σύγκλισης τιμών.

5. Η κατανομή β.

Στη θεωρία των πιθανοτήτων και τη στατιστική, η βήτα κατανομή είναι μια συνεχής κατανομή πιθανότητας που ορίζεται από την εξίσωση:

$$f(x; \alpha, \beta) = \frac{1}{\mathbf{B}(\alpha, \beta)} x^{\alpha-1} (1-x)^{\beta-1}$$

όπου α και β είναι παράμετροι που πρέπει να είναι μεγαλύτερες από μηδέν και \mathbf{B} είναι η Βήτα συνάρτηση. Η Βήτα συνάρτηση είναι μια σταθερά κανονικοποίησης για να εξασφαλίσει ότι το ολοκλήρωμα της πυκνότητας πιθανότητας της κατανομής θα είναι ίσο με 1:

$$\begin{aligned} f(x; \alpha, \beta) &= \frac{x^{\alpha-1} (1-x)^{\beta-1}}{\int_0^1 u^{\alpha-1} (1-u)^{\beta-1} du} \\ &= \frac{\Gamma(\alpha + \beta)}{\Gamma(\alpha)\Gamma(\beta)} x^{\alpha-1} (1-x)^{\beta-1} \\ &= \frac{1}{\mathbf{B}(\alpha, \beta)} x^{\alpha-1} (1-x)^{\beta-1} \end{aligned}$$

όπου Γ είναι η συνάρτηση Γάμμα..

Μια ειδική περίπτωση της βήτα κατανομής όταν $\alpha=1$ και $\beta=1$ είναι η ομοιόμορφη κατανομή. Η μέση τιμή $E(X)$ και η διακύμανση $\text{var}(X)$ μιας τυχαίας μεταβλητής X που ακολουθεί β κατανομή με παραμέτρους α και β δίνεται από τους τύπους:

$$E(X) = \frac{\alpha}{\alpha + \beta},$$

$$\text{var}(X) = \frac{\alpha\beta}{(\alpha + \beta)^2(\alpha + \beta + 1)}.$$

και η κύρτωση ή υπερβολή είναι:

$$6 \frac{\alpha^3 - \alpha^2(2\beta - 1) + \beta^2(\beta + 1) - 2\alpha\beta(\beta + 2)}{\alpha\beta(\alpha + \beta + 2)(\alpha + \beta + 3)}$$

Αντιστρόφως, με $E(X)$ και $\text{var}(X)$ γνωστές οι παράμετροι α και β υπολογίζονται από τους τύπους:

$$\alpha = E(X) \left(\frac{E(X)}{\text{var}(X)} [1 - E(X)] - 1 \right),$$

$$\beta = \alpha \frac{1 - E(X)}{E(X)}$$

με $0 < E(X) < 1$ και $0 < \text{var}(X) < E(X)(1 - E(X))$.

Μορφές

Η β κατανομή μπορεί να πάρει τις διαφορετικές μορφές ανάλογα με τις τιμές των δύο παραμέτρων α και β :

$\alpha = \beta = 1$ είναι η ομοιόμορφη κατανομή

$\alpha = \beta$ είναι συμμετρική περίπου στο 0.5

$\alpha < 1, \beta < 1$ είναι σε σχήμα \cup

$\alpha > 1, \beta = 1$ αυξάνεται αυστηρά

$\alpha = 1, \beta > 1$ μειώνεται αυστηρά

$\alpha > 1, \beta > 1$ είναι δίκορφη

Άρθρα στην αγγλική γλώσσα

1. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in Greek dairy sheep and goats

P. Kostoulas^{a*}, L. Leontides^a, C. Enøe^b, C. Billinis^c, M. Florou^a, M. Sofia^c,

^aLaboratory of Epidemiology, Biostatistics and Economics of Animal Production, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece.

^bThe National Committee for Pig Production, Danish Bacon and Meat Council, Axelborg, Axeltorv 3, DK-1609, Copenhagen V, Denmark.

^cLaboratory of Microbiology and Parasitology, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece.

*Corresponding author:

P. Kostoulas

Laboratory of Epidemiology, Biostatistics and Economics of Animal Production
School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, 224 Trikalon st., 43100 Karditsa,
Greece

Tel +30 24410 66092

Fax +30 24410 66047

Email: pkost@vet.uth.gr

Abstract

Latent class models were used to estimate the sensitivity (Se) and the specificity (Sp) of a serum ELISA and a faecal culture (FC) method for the diagnosis of paratuberculosis separately, in sheep and goats. The estimates were obtained by a Bayesian method. Possible dependence of diagnostic errors was investigated by comparing models where independence was assumed to models allowing for conditional dependence given the true disease status. ROC analysis for the serum ELISA was also performed and optimized cut-off values based on the misclassification cost term were determined.

No evidence of conditional dependence was found. Assuming independence, posterior medians and 95% credible intervals for the Se_{ELISA} , Sp_{ELISA} , Se_{FC} and Sp_{FC} , were 63% (42, 93%), 95% (90, 98%), 8% (2, 17%) and 98% (95.0, 100%) in goats and 37% (10, 80%), 97% (93, 99%), 16% (2, 48%) and 97% (95, 99%) in sheep. AUC was calculated 0.702 for sheep and 0.847 for goats. For the serum ELISA, there is need of species- and purpose-specific cut-off selection. For instance, with 20% prevalence situation and assuming equal and five fold cost of a false negative to a false positive test result, the optimal cut-off is 0.3 and 0.05 in sheep, respectively, while it is 0.6 and 0.1 in goats, respectively. Serum ELISA performed better in goats than in sheep. Lowering the cut-off improved the Se_{ELISA} without seriously compromising specificity in either species.

Keywords: paratuberculosis, ELISA, faecal cultural, latent class models, Bayesian estimation, ROC analysis.

1. Introduction

Successful control and eradication of paratuberculosis has been largely impeded by the lack of accurate diagnostic tests that are able to correctly classify individuals especially at the early stages of infection (National Research Council, 2003). Previous estimates of the diagnostic sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the ELISA in dairy cattle (Collins et al., 1991; Ridge et al., 1991; McNab et al., 1991; Sweeney et al., 1995), sheep (Hilbink et al., 1994; Dubash et al., 1995; Clarke et al., 1996; Hope et al., 2001; Sergeant et al., 2003), goats (Molina et al., 1991; Rajukumar et al., 2001) and in mixed sheep and goat flocks (Munjhal et al., 2004) and of faecal culture (FC) in dairy cattle (Whitlock et al., 2000; Sockett et al., 1992) were based on cases of paratuberculosis confirmed by histopathological examination, or on positive culture from faecal or tissue samples, or on repeated faecal culture measurements. However, these reference tests are not perfect and do not include all latent cases of infection (Nielsen et al., 2002). Infection may not always be detected because (i) in the case of histopathology and tissue culture, the bacteria may have not yet caused detectable pathological changes (Whittington et al., 1999) and (ii) in the case of faecal culture, shedding usually does not occur at the early silent stages of infection whereas in the later stages shedding may occur unevenly (Whittington and Sergeant, 2001). Thus, published Se and Sp estimates were in reality relative Se and Sp estimates to imperfect reference tests.

An alternative approach is to use latent class models with two or more diagnostic tests applied in one or more populations. None of the methods will be the reference test, hence the disease status of the study subjects is designated latent; existing but not presently evident or realised. Non-gold standard methods were first introduced by Hui

and Walter (1980) and extensively reviewed by Walter and Irwig (1988). Bayesian methodology has also been used for the model proposed by Hui and Walter, and ones like it, considering cases of either conditional independence (Johnson et al., 2000; Joseph et al., 1995), dependence (Georgiadis et al., 2003; Dendukuri and Joseph 2001) or both (Black and Graig, 2002). Recently, frequentist and Bayesian diagnostic test modelling strategies were extensively reviewed (Enoe et al., 2000) and the computational aspects involved in a fully Bayesian approach were extensively described (Branscum et al., 2005). A latent class model approach was recently utilized in conjunction with maximum likelihood estimation of the Se's and Sp's of a serum ELISA and a faecal culture in dairy cattle (Nielsen et al., 2002). However, there is paucity of comparable results for sheep and goats.

It is well documented that the Se of the tests for paratuberculosis depends on the distribution of the infection stages in the test population (Collins and Sockett, 1993) and that differences in the Sp are likely between different areas with different environmental mycobacteriological flora (Nielsen et al., 2002). Furthermore, different strains seem to predominate in sheep and goats (de Juan L. et al., 2005; Stevenson et al., 2002) that may be of different virulence (Saxegaard, 1990) and affect the diagnostic performance of tests. Recently, Corpa et al. (2000) discussed the likely difference in susceptibility and immune response between sheep and goats. Ovine and some caprine strains (de Juan L. et al., 2005) have different growth index on artificial media (Collins et al., 1990) and are potentially affected in a different way by the decontamination procedures than cattle strains (Reddacliff et al., 2003). Thus, it would be unwise (i) to simply extrapolate results of validation studies from cattle to sheep and goats and (ii) not to evaluate diagnostics separately in sheep and in goats and treat them as a single species instead.

In this study we used the latent class approach in a Bayesian framework to estimate Se and Sp of an ELISA and a FC separately for Greek dairy sheep and goats. The possibility of conditional dependence between the tests was investigated. For the ELISA, ROC analysis was performed to assess the potential need of species- and purpose- specific cut-off selection.

2. Materials and methods

2.1. Definition of infection

The latent class models create their own probabilistic definition of infection, which is based on the implicit assumption that both tests are directed towards the same target disorder (Enoe, 2003). In our case the definition, in biological terms, is similar to that described by Nielsen et al. (2002). Hence, by 'infection' we mean that sheep or goats carry *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) intracellularly; substantial replication need not take place because the infection can be latent. Entrance and persistence of MAP have lasted long enough to give an immune response at any time during their life; we assumed that once an animal has an established infection, the infection persists for life.

2.2. Population under study

Four dairy sheep and goat flocks, with a size ranging from 250 to 350 animals, were selected for the study. The flocks had a history of clinical paratuberculosis and

vaccination against MAP had never been applied. One of the flocks was a sheep-only flock, another was a goat-only flock and the remaining two were mixed, one with 60-40% and one with 40-60% sheep-to-goat ratios.

2.3. Sampling strategy

One hundred clinically healthy animals from each flock older than one year of age were randomly sampled from the flock's registry. Data from dairy cows suggested that the sensitivity of serological testing was optimized towards the end of the lactation period (Nielsen et al., 2002). Therefore, sampling of the animals was done during April and May, shortly before the mating season that runs from June to September. From each sampled animal approximately 10 ml of blood and 10 grams of faeces from the rectum were collected.

2.4. Testing

Serum samples were tested for antibodies to MAP via the commercial IDEXX ELISA test kit³ using the manufacturer's recommended protocol (Sockett et al., 1992). Each faecal specimen was cultured onto two slopes of Herrold's egg yolk medium supplemented with mycobactin J and antibiotics (Becton Dickinson product code: 222233) after a decontamination procedure described in recent studies (Greig et al., 1999). The cultures were incubated at 37°C for up to 30 weeks and examined biweekly for bacterial growth. To confirm the identity of colonies grown, DNA from the colonies was extracted and screened for the presence of the MAP-specific insertion sequence IS900 (Green et al., 1989).

2.5. Statistical analysis

2.5.1 Model and assumptions

We applied latent-class models (Enoe et al., 2000; Walter and Irwig, 1988; Hui and Walter 1980) in a Bayesian framework (Branscum et al., 2005; Johnson et al., 2001) to estimate the Se and Sp of the ELISA and the FC (Se_{ELISA} , Sp_{ELISA} , Se_{FC} and Sp_{FC} , respectively), separately in sheep and in goats.

The estimation of Se and Sp of the ELISA and the FC was based on their cross-classified results. For the method to be valid, three main assumptions need to be met: (a) the diagnostic tests should be conditionally independent of each other (Gardner et al., 2000); (b) the target population should consist of two or more subpopulations with different prevalence (P); and (c) in these subpopulations, the Se and Sp of the diagnostic tests should be constant. These assumptions were validated as follows:

a. Assumption of conditional independence - Choosing between the independence and dependence model

Tests (ELISA and FC) were expected to be conditionally independent since they were based on a different biological principle (Toft et al., 2005). Thus, we initially considered the independence model as described by Johnson et al. (2001). To assess

³ IDEXX Laboratories, Portland, ME

whether the assumption of independence holds we also considered the dependence model as described by Dendukuri and Joseph (2001). We preferred the parameterization proposed by Dendukuri and Joseph (2001) to the one proposed by Georgiadis et al. (2003) as it directly incorporates the covariance of the Se's (γ_{Se}) and the Sp's (γ_{Sp}) between the two tests (Branscum et al., 2005). For both models software codes (that were recently reviewed by Branscum et al. (2005)) were modified for use in the analysis of three subpopulations.

We used the *DIC Tool* dialog box in the WinBUGS environment to estimate the *Deviance Information Criterion* (DIC) for the independence and dependence model in sheep and in goats. The difference in the DIC of the two models was less than 2 (0.1 for sheep and 1.3 for goats), suggesting that the two models fitted the data equally well (Spiegelhalter et al., 2002). Additionally, under the dependence model, we estimated γ_{Se} and γ_{Sp} and the corresponding 95% credible intervals (CrIs). The estimated CrIs included zero and consequently the null hypothesis of conditional independence was not rejected (Gardner et al., 2000). Hence, the independence model was further adopted in the analysis.

b. Assumption of difference in prevalence

The practising veterinarian supervising the flocks was asked to rank the prevalence of chronic recurring diarrhoea, as an indication of the prevalence of clinical paratuberculosis. Based on his ranking, three subpopulations of sheep and three subpopulations of goats were formulated in which low, medium and high prevalence of paratuberculosis was suspected.

c. Assumption of constant Se and Sp across subpopulations

To validate this assumption, we re-analyzed all possible pairs of sub-populations, effectively running the models for three times, for each species. Each time the model and prior information considered were identical to the model and the priors used in the three sub-population case. Se and Sp results from all paired sub-population analyses were similar to the results from three sub-population analysis, suggesting that the assumption of constant accuracy was not unreasonable, in sheep and in goats.

2.5.2. Priors

Beta distributions Be (a, b), were used as priors for the parameters of interest (Se's, Sp's, and P's). The same priors were used for these parameters for the independence and dependence model and for both species.

A uniform prior distribution on the range from 0 to 1 was chosen for Se_{ELISA} and Se_{FC} , Be (1,1). Based on the available literature for cattle, sheep and goats (Table 1), the most probable value of Sp_{ELISA} was determined to be 0.95, while we were 95% sure that it was more than 0.90. The Be with mode 0.95 and 5th percentile 0.90 is Be(100,5.5). The most probable value of Sp_{FC} was 0.98, and it was thought to be at least 0.95 with 95% certainty. This corresponded to a Be(100,2).

The most probable values for P's in the low, medium and high prevalence subpopulations were set at 3, 25 and 50%, respectively and we were 95% sure that they should not be more than 10 and 55% in the low and medium prevalence subpopulations

and not less than 30% in the high prevalence subpopulations. The corresponding distributions were Be (2.84, 56.40), Be (3.09, 7.25), and Be (8.11, 7.91), respectively.

Finally, for the dependence model, uniform prior distributions over the ranges of the two covariances were used. The magnitude of the conditional covariances is directly affected by the magnitude of the Se and Sp values. The limits for γ_{Se} , γ_{Sp} were $\max(-(1-Se_1)*(1-Se_2), -Se_1*Se_2) \leq \gamma_{Se} \leq \min(Se_1*(1-Se_2), Se_2*(1-Se_1))$ and $\max(-(1-Sp_1)*(1-Sp_2), -Sp_1*Sp_2) \leq \gamma_{Sp} \leq \min(Sp_1*(1-Sp_2), Sp_2*(1-Sp_1))$, respectively (Gardner et al., 2000).

2.5.3. Comparing Se and Sp of the ELISA and FC between sheep and goats.

In order to test whether Se_{ELISA} was higher in goats than in sheep, a possibility previously reported (Corpa et al., 2000), we calculated $X = Se_{ELISA}(\text{goats}) - Se_{ELISA}(\text{sheep})$ and used the step function in the WinBUGS. In this function $\text{step}(X)=1$ if $X \geq 0$ and 0 otherwise. Hence, the mean of X was the Monte Carlo estimate of the posterior probability of Se_{ELISA} being higher in goats than in sheep. Potential differences between Sp_{ELISA} , Se_{FC} , and Sp_{FC} between sheep and goats were similarly assessed.

2.5.4. Sensitivity analysis

To assess the influence of prior information (Branscum et al., 2005; Georgiadis et al., 2003; Joseph et al., 2000, Enoe et al., 2000) on the estimates of the model parameters two additional different sets of prior information were considered: (II) uniform priors on the range from 0 to 1 for Se's and the informative priors for Sp's used for the primary analysis and (III) uniform priors on the range from 0 to 1 for Se's and Sp's, Be (1,1). For both (II) and (III) the same more diffuse priors for all P's were considered: for the low prevalence subpopulations a uniform distribution on 0 to 50%, and for medium and high prevalence subpopulations most probable prevalence values of 25 and 75% and 95th and 5th percentiles of 65 and 35%, respectively. These priors correspond to a Be (1,1) truncated over the range from 0 to 50%, Be (2, 4) and Be (4, 2), respectively.

2.5.5. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis

In each subpopulation, 2 x 2 tables were created at a number of cut-off values for the ELISA (with classification as ELISA + or ELISA -) cross-tabulated with FC+ and FC- individuals. After creating all the 2 x 2 tables, the Se's and Sp's were estimated using both the independence and dependence models. The potential conditional dependence between ELISA and FC was evaluated as earlier described. No evidence of conditional dependence was found, for any cut-off, in sheep or in goats. In all analyses, the informative priors of the primary analysis were used only for the P's and uniform priors Be (1,1) for the Se's and Sp's so as not to influence Se and Sp estimates. ROC-curves were produced based on the posterior medians of Se_{ELISA} and Sp_{ELISA} , at the different cut-off values, for sheep and for goats.

Subsequently, the S/P value corresponding to the point on the ROC curve closest to the upper left corner that optimises prevalence-independent summary measures of Se and Sp such as the Youden index ($J=Se+Sp-1$) was selected as a potential cut-off. Furthermore, we calculated the area under the curves (AUC's), using "the trapezoidal rule" (Hanley and McNeil, 1982), in order to compare the overall diagnostic performance of ELISA between sheep and goats (Greiner et al., 2000). To investigate the need of species- and purpose-specific cut-off selection, the constructed curves for sheep and

goats were used to derive optimal cut-off values with regard to a given prevalence and a ratio of the costs of the false positive to the false negative test outcomes (CFP and CFN, respectively). Cut-off selection was based on minimisation of the misclassification cost term (MCT), which was calculated as: $MCT = CFN/CFP * P * (1 - Se_{ELISA}) + (1 - P) * (1 - Sp_{ELISA})$ (Zweig and Campbell, 1993; Greiner et al., 2000). The challenge of this approach is that it requires the users to quantify the consequences of each false test outcome. Smith (1995) gave an example for selection of an optimal cut-off in paratuberculosis affected dairy cattle when considering equal and fivefold cost of a FN to a FP test result and under certain prevalence assumptions. We selected cut-offs for sheep and goats at the same cost ratios for a disease prevalence of 20%, which is commonly met in endemically infected Greek sheep and goat flocks (unpublished data). Finally, because the AUC summarises the ROC curve as a whole, and therefore attributes the same weighting to both relevant and irrelevant parts of the curve (Greiner et al., 2000), we also calculated partial AUC for Sp values of 0.80 and higher because our previous results indicated that over this range of Sp values we could improve Se and optimise the MCT.

2.5.6. Assessment of convergence

In order to use Markov Chain Monte Carlo (MCMC) it is necessary to determine how long the simulation needs to be run. It is also important to diagnose lack of convergence that may be due to bad starting values, high posterior correlations or “stickiness” of the chain (Raftery and Lewis, 1992). However, convergence diagnostics are not foolproof. Therefore, a combination of diagnostics plus visual inspection of the trace plots and summary statistics is recommended (Best et al., 1995). We used both the Raftery and Lewis method and the Gelman–Rubin diagnostic. Autocorrelations were also checked.

Initially, convergence of the iterates to the stationary distributions was assessed, by using the Raftery and Lewis method for diagnosing convergence to single chains. A threshold value of the factor I equal to 5 was used to assess convergence. Values of $I > 5$ indicate high within chain correlations and probable convergence failure (Raftery and Lewis, 1992). We estimated the value of I for the 2.5th, 50th and 97.5th percentile. Furthermore, the results of the Raftery & Lewis method were used to assess the number of iterations (N) that should be run to obtain with 95% confidence parameter estimates of the median, the 2.5th and 97.5th percentile with ± 0.01 accuracy. Parameter estimates were based on analytical summaries of 49500 iterations of the Gibbs sampler after a burn-in phase of 500 iterations, which was adequate because the Raftery and Lewis method suggested that analytical summaries of 45000 iterations after a burn-in of 15 iterations were needed.

Subsequently, we ran three parallel chains with different starting values of the parameters and used the Gelman–Rubin convergence statistic, as modified by Brooks and Gelman (1998), which essentially is a comparison of the within- and between-chain variances for each variable to assess convergence. Autocorrelations were also checked.

For all models, both the Raftery and Lewis and the Gelman-Rubin method suggested that convergence occurred and autocorrelations dropped-off fast.

2.5.8. Statistical software

Models were run in the freeware program WinBUGS (Spiegelhalter et al., 1996). The same program was used to check the Gelman-Rubin diagnostic and the autocorrelations. For the Raftery and Lewis method, we used the R-CODA (Best et al., 1996), which stands for Convergence Diagnostic and Output Analysis software. This is a menu-driven set of R-Plus functions which serves as an output processor for WinBUGS.

3. Results

Of the 400 animals initially sampled, results on both FC and ELISA for 368 were obtained. For each species, cross-classified results of the ELISA and FC by subpopulation are in Table 2.

At the recommended ELISA cut-off (S/P value = 0.4), posterior medians obtained under the independence model for the Se_{ELISA} , Sp_{ELISA} , Se_{FC} and Sp_{FC} , were 63% (95%CrIs:42, 93%), 95% (90, 98%), 8% (2, 17%) and 98 (95, 100%) in goats and 37% (10, 80%), 97% (93, 99%), 16%(2, 48%) and 97%(95, 99%) in sheep, respectively. Applying the step function, the posterior probability of Se_{ELISA} being higher in goats than in sheep was 93%. Therefore we were 93% sure that Se_{ELISA} was higher in goats. The corresponding values for Sp_{ELISA} , Se_{FC} and Sp_{FC} were 20, 46 and 77%, respectively.

Under the dependence model posterior medians of γ_{Se} and γ_{Sp} were -0.04 (-0.11, 0.001) and 0.004 (-0.0004, 0.02) in goats, while in sheep were 0.009(-0.14, 0.07) and 0.003(-0.001, 0.02), respectively (Figure 1).

Independence and dependence model estimates for Se's, Sp's and P's for sheep and goats are in Table 3. Results of the independence model when incorporating different sets of prior information are in Table 4.

For the ELISA, the AUC was calculated as 0.847 for goats and 0.702 for sheep. Partial AUC were calculated as 0.078 for goats and 0.048 for sheep. An S/P value equal to 0.1 and 0.05 optimises J for goats and sheep, respectively (Figure 2). ELISA S/P values that minimise MCT, when considering equal and five fold cost of FN to FP test result, were 0.3, 0.05 for sheep and 0.6, 0.1 for goats, respectively for a 20% prevalence situation (Figure 3). At these optimal cut-offs, Se_{ELISA} and Sp_{ELISA} are estimated to be 59% and 95%, 79% and 84% for goats and 41% and 98%, 57% and 89% for sheep, respectively. These estimates indicate that lowering the cut-off in either species improves Se without seriously compromising Sp; 75% reduction of the normal cut-off resulted in 11% and 7% loss for the point estimate of Sp_{ELISA} in goats and in sheep, respectively.

4. Discussion

Tests based on a different biological principle are expected to be conditionally independent (Toft et al., 2005; Enoe et al., 2000; Greiner and Gardner, 2000); this has been recently demonstrated for the ELISA and the FC for diagnosis of paratuberculosis in cattle (Nielsen et al., 2002). For our data, the difference in the DIC values between the independence and dependence model suggested that both models fitted the data equally well. Furthermore, the covariance estimates under the dependence model provided no evidence of conditional dependence between ELISA and FC. Latent-class models of dependency for two tests lack identifiability and the use of more than two populations does not further reduce the identifiability problem although it decreases the reliance on additional prior information. Since the model is not identifiable, the results (and thus the power to detect dependence) necessarily depend heavily on prior information (Georgiadis

et al., 2003). We re-evaluated the assumption of conditional independence at every set of prior information and any considered ELISA cut-off. The independent model was adopted for all the analyses. This choice was based on the different biological principles of the tests, the DIC values and the range of the covariances.

As prevalence estimates indicated, the assumption of distinct difference in prevalence was valid. Importantly, the stratifier for subpopulations (the level of clinical disease) did not obviously interact with the tests' outcomes so as to violate the assumption of constant Se and Sp across sub-populations (Nielsen et al., 2002; Toft et al., 2005). Results of pair-population analyses were consistent with those obtained from three-population analysis in either species, suggesting that the assumption of constant Se and Sp was not unreasonable (Georgiadis et al., 2003). Pair population analyses results were also consistent to three-population analysis when the alternative sets of prior information II and III were used (data not shown).

Bayesian methods allow for the incorporation of published estimates and/or expert knowledge into the modeling process (Branscum et al., 2005). The inclusion of informative priors that distinguish amongst the components of the latent-class models prevents label switching which can occur in the Bayesian estimation of mixture models (Stephens, 2000). Selection of uniform priors for Se 's reflected our ignorance of the distribution of infection stages in the population that is believed to affect the test's performance in the target population (Collins and Sockett, 1993). Published estimates greatly varied depending on the stage of infection (Sergeant et al., 2003; Hope et al., 2000; Dubash et al., 1995). The undisputed absolute to high Sp for both ELISA and FC justified the adoption of the very informative priors for Sp 's. Relatively diffuse informative priors were used to reflect both our uncertainty and general idea about the true prevalence in the subpopulations. More diffuse prevalence priors were also considered in the sensitivity analysis. Sensitivity analysis suggested that our results were moderately dependent on prior information but were qualitatively the same (tables 3 and 4). We, also, considered the effect of slight perturbations of the data on the final inferences to determine the impact on our analysis if one or more of the zeros in the data had actually been observed to be one. Modifying every one and all of the zeros in our data had a minimum impact on the results indicating that we could be confident about the results of our analysis (Enoe et al., 2000).

Se_{ELISA} was higher in goats than in sheep. This difference was also observed when the different sets of prior information II and III were used for the analysis. Rajukumar et al. (2001) and Molina et al. (1991) estimated Se_{ELISA} in goats as at least 75% and 85%, respectively. Hope et al. (2000) and Dubash et al. (1995) estimated Se_{ELISA} in sheep as 48% and 35-54%. These estimates were based on confirmation of infection by faecal culture, faecal examination and histopathology. Hence, these estimates were not adjusted for the imperfect Se of the reference test and are likely to overestimate the true values of Se to an unknown extent (Staquet et al., 1981). This overestimation might be greater in sheep and goats with early paucibacillary lesions (Sergeant et al., 2003). The Se of tests detecting humoral response to paratuberculosis is inversely related to the extent of lesions and disease stage (Hilbink et al., 1994; Dubash et al., 1995; Perez et al., 1997; Sergeant et al., 2003). Corpa et al. (2000) argued that the scarcity of goats with focal lesions along with the higher number of goats with diffuse lesions when compared with studies carried out in sheep (Perez et al., 1996) may indicate that goats have only limited ability to

control infection. Such lesions are associated with failure of effective immune mechanisms (National Research Committee, 2003) and subsequent humoral response development (Sergeant et al., 2003, Perez et al., 1997, Clarke et al., 1996). Therefore, a potential difference in the immune response to paratuberculosis between sheep and goats may biologically explain the difference of Se_{ELISA} between the two species. Nevertheless, ovine paratuberculosis predominantly results from infection with sheep strains of MAP (Whittington et al., 1998; Cousins et al., 2000) while caprine paratuberculosis may result from infection of goats with cattle adapted strains of MAP (Cousins et al., 2000; Whittington et al., 2000). Subsequently, difference in strain virulence along with host preference may also account for the different Se_{ELISA} between species. Saxegaard (1990) reported a strain of MAP that was pathogenic for goats and non-pathogenic for cattle and sheep suggesting that certain strains may have a host preference for goats.

In both species, Se_{FC} was lower than Se_{ELISA} . At a first glance our estimates of Se_{FC} seem considerably lower than published estimates (Table 1). Yet, published estimates of Se_{FC} , as for Se_{ELISA} , were based on confirmation procedures that did not include all latent cases of infection and tended to overestimate Se_{FC} . In dairy cattle, Whitlock et al. (2000) used the repeated FC positive results as his gold standard method and provided a Se estimate of 42%. This dropped below 25% if FC negative animals that had infected tissues when examined at slaughter were considered infected. Even so some infected animals were missed implying that a value of 25% still overestimated Se_{FC} in dairy cattle. This estimate is closer to our estimates that accounted for all latently infected animals. Furthermore, we should also consider the difficulties FC has in sheep and goats in comparison to cattle faecal and tissue samples. Type I strains appear to have a strong host preference for sheep (Stevenson et al., 2002). Many ovine strains do not grow well on artificial media (Collins et al., 1990; Juste et al., 1991). Although most caprine strains belong to the cattle group or Type II (Collins et al., 1990; Whipple et al., 1990; Thoresen and Olsaker, 1994; Pavlik et al., 1995; Cousins et al., 2000), lately, a type III profile was described (de Juan L et al., 2005) that appears to be intermediate between Type I and Type II and phenotypically are slow growing like Type I strains. The latter strains were from goat flocks neighbouring with sheep flocks, which was also the case in this study. Possible predominance of type I and III strains in Greek dairy sheep and goats, respectively, would further explain the very low Se_{FC} estimate. Finally, there is only one published report (Reddacliff et al., 2003) on the effects of decontamination procedures on the sheep strains, and it would be unwise to simply extrapolate from cattle strain findings since these two are very different in their cultural requirements. Sp of FC was always close to unity but not absolute. This reflects either the potential of pass through of orally ingested organism by uninfected animals (Sweeney et al., 1992) or the small yet existent possibility of false positive FC results in high prevalence infected flocks where the premises are likely to be heavily contaminated (Manning et al., 2003) or the likelihood of laboratory processing errors, including cross-contamination of the samples.

The AUC and the partial AUC was higher in goats than in sheep indicating the higher discriminatory power of ELISA in goats. According to a guideline provided by Greiner et al. (2000), the ELISA could be described, for both species, as a moderately accurate test. When considering equal cost of false negative and false positive test results at a 20% prevalence different cut-off values were suggested for sheep and goats based on MCT (Figure 2). Different and quite lowered cut-off values were suggested when

considering a five-fold cost of losing an infected animal to losing a healthy one, at a 20% prevalence situation. Cut-off selection is an informed procedure that takes into account the epidemiologic situation such as prevalence in the target population and the relative consequences of false negative and false positive test results which also differ for every decision making situation (Greiner et al., 2000). Hence, species-adjusted and purpose-specific cut-offs for paratuberculosis serum ELISA in sheep and goats would improve its diagnostic performance.

Nielsen et al. (2002) reported that maximum likelihood estimates of Se_{FC} increased with increasing milk ELISA cut-off when the cross classified results of FC with the results of milk ELISA were analysed. They suggested that this observation represented the higher Se_{FC} in terminal disease stage animals with high antibody levels in milk. In our study, the Se_{FC} in sheep and goats remained similar with increasing cut-off of the serum ELISA (data not shown here), which indicates that the FC results were evenly distributed over the range of the ELISA values, in the subpopulation of infected individuals. To investigate whether the Se and Sp of a conditionally independent dichotomous test remain constant with changing cut-off of a continuous test we carried out a simulation study. We considered two tests, test 1 with a continuous outcome and test 2 with a dichotomous outcome. Outcomes (S/P values) for the healthy individuals of test 1 had a mode of 0.1 and a 95th percentile of 0.4 (Be(2,9)) and for the latently infected individuals a mode of 0.5 and a 5th percentile of 0.14 (Be (2,2)). The true Se and Sp for test 1 at a series of considered cut-off values were estimated from the appropriate percentiles of these distributions. For test 2, healthy individuals had an equal probability of 0.98 to be classified as healthy and infected individuals had an equal probability of 0.400 to be classified as infected. Hence, test 2 had a Se of 0.400 and a Sp of 0.980. The equal probability for the outcomes of test 2 over the range of the S/P values of test 1 satisfies the assumption of conditional independence (even distribution of test results). Subsequently, for both tests 10,000 individual data were generated for two populations of prevalence 0.050 and 0.200 and the cross-classified results were subjected to latent class analysis at each considered cut-off. Uniform priors were used for all parameters (Se's, Sp's and p's), Be (1,1). Simulation results suggested that Se and Sp of the dichotomous test remained constant with changing ELISA cut-off.

Our Se estimates had wide credible intervals. Contributors to variation of latent class models estimates are low true values of parameters (Se's and Sp's), small sample size per parameter and small difference in prevalence between subpopulations (Enoe et al., 2000; Georgiadis et al., 2005; Toft et al., 2005). In our case, the most important factor was the first one (low true Se). Note that Sp estimates did not have wide intervals even when not using informative priors for them (Table 4). Other studies with a total sample size at most half than ours (Enoe et al., 2000; Joseph et al., 2000; Frossling et al., 2003) provided narrower intervals due to the fact that true Se and Sp values were higher and the difference in disease prevalence was greater. At an attempt to further assess the impact of sample size on our data we analysed multiples of 10 and 100 times of the original data (Johnson et al., 2001), assuming conditional independence. Multiples of the original data 10 times (that is an impressive hypothetical total of 3860 animals tested) would still give wide intervals for Se_{ELISA} in sheep. Only the consideration of 100 multiples (resulting in the extreme total of 38600 animals) would provide narrow intervals for all Se's. Hence, variation may be primarily attributed to low true Se's of both tests.

Latent-class models provide an alternative method of evaluating diagnostic tests that account for all latent cases of infection. Bayesian estimation procedures have the advantage of incorporating well-documented prior information that summarizes expert opinion and/or current published knowledge for the parameters of interest (Se's, Sp's and P's). Our results suggest a different serological profile between sheep and goats and therefore the need of species-specific cut-off selection. Furthermore, lowering of the cut-off in both species would improve Se_{ELISA} without significantly compromising Sp_{ELISA} , thus improving the performance of ELISA in either species. FC, although highly specific lacks in Se.

Acknowledgements

This work was partly funded by a European Union project entitled “The role of wildlife in the epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in domestic ruminants in Europe” (contract number: QLK2-CT-2001-00879).

References

1. Best, N.G., Cowles, M.K., Vines, S.K., 1995. CODA Manual Version 0.30. MRC Biostatistics Unit, Cambridge, UK.
2. Black, M.A., Craig, B.A., 2002. Estimating disease prevalence in the absence of a gold standard. *Stat. Med.* 21, 2653–2669.
3. Brooks, S. P., Gelman, A., 1998. Alternative methods for monitoring convergence of iterative simulations. *Journal of Computational and Graphical Statistics.* 7, 434-455.
4. Branscum A.J. , Gardner I.A., Johnson W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modelling. *Prev. Vet. Med.* 68, 145–163.
5. Clarke, C.J., Patterson, I.A., Armstrong, K.E., Low, J.C., 1996. Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *Vet Rec.* 139, 618-621.
6. Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridisation. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591–1596.
7. Collins, M.T., Sockett, D.C., 1993. Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc.* 203, 1456-1463.
8. Collins, M.T., Sockett, D.C., Ridge, S., Cox, J.C., 1991. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 29, 272-276.
9. Corpa, J.M., Garrido, J., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255-265.
10. Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J., 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aus. Vet.* 78, 184-190.
11. de Juan L., Mateos, A., Dominguez, L., Sharp, J.M., Stevenson, K., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Mic.* 106, 249-257.
12. Dendukuri, N., Joseph, L., 2001. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics* 57, 158–167.
13. Dubash, K., Shulaw, W.P., Bech-Nielsen, S., Stills, H.F.Jr., Slemons, R.D., 1995. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay licensed by the USDA for use in cattle for diagnosis of ovine paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 347-351.
14. Enøe, C., 2003. Measures of disease in pigs: Validation and Inference. PhD. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, pp 62.
15. Enøe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease status is unknown. *Prev. Vet. Med.* 45, 61–81.

16. Frossling, J., Bonnett, B., Lindberg, A., Bjo'rkman, C., 2003. Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. *Prev. Vet. Med.* 57, 141–153.
17. Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev. Vet. Med.* 45, 107-122.
18. Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Stat. Sci.* 7, 457– 511.
19. Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., Gardner, I.A., 2005. Sample size determination for estimation of the accuracy of two conditionally independent tests in the absence of a gold standard. *Prev. Vet. Med.* 71, 1-10.
20. Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., Gardner, I.A., Singh, R., 2003. Correlation-adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Appl. Stat.* 52, 63–76.
21. Green, E. P., Tizard M. L., Moss M. T., Thompson J., Winterbourne D. J., McFadden J. J., Hermon-Taylor J., 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17, 9063–9073.
22. Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Mic.* 37, 1746-1751.
23. Greiner, M., Gardner, I.A., 2000. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev. Vet. Med.* 45, 43-59.
24. Greiner, M., Pfeiffer, D., Smith, R.D., 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45, 23-41.
25. Hanley, J.A., McNeil, B.J., 1983. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Rad.* 148, 839-843.
26. Hilbink, F., West, D.M., de Lisle, G.W., Kittelberger, R., Hosie, B.D., Hutton, J., Cooke, M.M., Penrose, M., 1994. Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet Microbiol.* 41, 107-116.
27. Hope, A.F., Kluver, P.F., Jones, S.L., Condron, R.J., 2001. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J.* 78, 850-856.
28. Hui, S.L., Walter, S.D., 1980. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 36, 167– 171.
29. Johnson, W.O., Gastwirth, J.L., Pearson, L.M., 2001. Screening without a gold standard: the Hui-Walter paradigm revisited. *Am. J. Epidemiol.* 153, 921-924.
30. Joseph, L., Gyorkos, T.W., Coupal, L., 1995. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am J Epidemiol.* 141, 263-272.
31. Juste, R.A., Marco, J.C., Saez de Ocariz, C. and Aduriz, J.J., 1991. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 28, 385–390.
32. Manning, E.J., Kucera, T.E., Gates, N.B., Woods, L.M., Fallon-McKnight, M., 2003. Testing for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd. *J. Wildl. Dis.* 39, 323-328.
33. McNab, W.B., Meek, A.H., Duncan, J.R., Brooks, B.W., Van Dreumel, A.A., Martin, S.W., Nielsen, K.H., Sugden, E.A., Turcotte C., 1991. An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Can. J. Vet. Res.* 55, 252-259.
34. Molina, A., Morera, L., Llanes, D., 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Am. J. Vet. Res.* 52, 863-868.
35. Munjal, S.K., Boehmer, J., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K., Homuth, M., 2004. Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet Microbiol.* 103, 107-114.
36. National Research Council, 2003. Diagnosis and control of Jhne's disease. The National Academies Press, Washington, D.C.
37. Nielsen, S.S., Grønbaek, C., Agger, J.F., Houe, H., 2002. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 53, 191–204.
38. Pavlik, I., Bejckova, L., Pavlas, M., Rozsypalova, Z., Koskova, S., 1995. Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine

- and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.* 45, 311–318.
39. Perez, V., Tellechea, J., Badiola, J.J., Gutierrez, M., Garcia Marin, J.F., 1997. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res.* 58, 799-803.
 40. Perez, V., Garcia Marin, J.F., Badiola, J.J., 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114, 107-122.
 41. Raftery, A.L., Lewis, S., 1992. Comment: one long run with diagnostics: implementation strategies for Markov chain Monte Carlo. *Stat. Sci.* 7, 493–497.
 42. Rajukumar, K., Tripathi, B.N., Kurade, N.P., Parihar, N.S., 2001. An enzyme-linked immunosorbent assay using immunoaffinity-purified antigen in the diagnosis of caprine paratuberculosis and its comparison with conventional ELISA's. *Vet. Res. Comm.* 25, 539-553.
 43. Reddacliff, L.A., Vadali, A., Whittington, R.J., 2003. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolated from tissues and faeces. *Vet. Microbiol.* 95, 271-282.
 44. Redner, R. A., Walker, H. F., 1984. Mixture densities, maximum likelihood and the EM algorithm. *SIAM Review*, 26, 195–239.
 45. Ridge, S.E., Morgan, I.R., Sockett, D.C., Collins, M.T., Condron, R.J., Skilbeck, N.W., Webber, J.J., 1991. Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J.* 68, 253-257.
 46. Saxegaard, F., 1990. Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* 102, 149-156.
 47. Sergeant, E.S., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C., Whittington, R.J., 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61, 235-248.
 48. Smith, R.D., 1995. Evaluation of diagnostic tests. In: *Veterinary Clinical Epidemiology. A Problem-Oriented Approach.* CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 31–43.
 49. Sockett, C.D., Conrad, A.T., Thomas, B.C., Collins, T.M., 1992. Evaluation of Four Serological Tests for Bovine Paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1134-1139.
 50. Spiegelhalter, D., Thomas, A., Best, N., Gilks W., 1996. BUGS: Bayesian Inference Using Gibbs Sampling, Version 0.50. MRC Biostatistics Unit, Cambridge. <http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>
 51. Spiegelhalter, D. J., Best, N. G., Carlin, B. P., van der Linde, A., 2002. Bayesian measures of model complexity and fit (with discussion). *J. Roy. Statist. Soc. B.* 64, 583-640.
 52. Staquet, M., Rozencweig, M., Lee, Y.J., Muggia, F.M., 1981. Methodology for the assessment of new dichotomous diagnostic tests. *J. Chronol. Dis.* 34, 599–610.
 53. Stephens, M., 2000. Dealing with label switching in mixture models. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B.* 62, 795-809.
 54. Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
 55. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L., Spencer, P.A., 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 488-493.
 56. Thoresen, O.F., Olsaker, I., 1994. Distribution and hybridization patterns of the insertion element IS900 in clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 293–303.
 57. Toft, N., Jørgensen, E., Højsgaard, S., 2005. Diagnosing diagnostic tests: evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. *Prev. Vet. Med.* 68, 19–33.
 58. Walter S.D. and Irwig L.M, 1988. Estimation of test error rates, disease prevalence and relative risk from misclassified data: a review. *J. Clin. Microbiol.* 41, 923–937.
 59. Whipple, D.L., Kapke, P., Vary, C., 1990. Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2561–2564.

60. Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol.* 77, 387-398.
61. Whittington, R., Marsh, I., Choy, E., Cousins, D., 1998. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cel. Prob.* 12, 349-358.
62. Whittington, R.J., Eamens, G.J., Cousins, D.V., 2003. Specificity of absorbed ELISA and agar gel immuno-diffusion tests for paratuberculosis in goats with observations about use of these tests in infected goats. *Aust. Vet J.* 81, 71-75.
63. Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall D.J., Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1077-1083.
64. Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., Marsh, I., 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Micr.* 38, 3240-3248.
65. Whittington, R.J., Sergeant, E.S., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations. *Aus. Vet.* 79, 267-278.
66. Zweig, M.H., Campbell, G., 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 39, 561-577.

Table 1. Published estimates of the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the serum ELISA and the faecal culture (FC) for the diagnosis of paratuberculosis in cattle, sheep and goats.

Reference	Species	ELISA	FC
Collins et al., 1991; Ridge et al., 1991; McNab et al., 1991	Cattle	Se ~ 45% Sp >90%	
Nielsen et al., 2002	Cattle	Se =27-86%, Sp=55-98%	Se=20-73% Sp > 98%
Sockett et al., 1992	Cattle	Se=47-65%	Se =45-73% Sp > 99%
Sweeney et al., 1995	Cattle	Se=15-87%	
Whitlock et al., 2000	Cattle	Se=15-75%	Se=42% Sp > 99%
Sergeant et al., 2003	Sheep	Se= 25-73%; 10-47% Sp>95%	
Whittington et al., 2003;	Sheep	Sp>97%	
Hilbink et al., 1994			
Hope et al., 2000	Sheep	Se=35-54% Sp=98.2-99.5%	
Dubash et al., 1995	Sheep	Se=48% Sp=95%	
Rajukumar et al., 2001	Goats	Se>75% Sp>90%	
Molina et al., 1991	Goats	Se>85% Sp>93%	

Table 2. Cross-classified results of FC and serum ELISA¹ in subpopulations of Greek dairy sheep and goats with low, medium and high prevalence of paratuberculosis (subpopulations 1, 2 and 3, respectively).

		Sheep		Goats	
		ELISA+	ELISA-	ELISA+	ELISA-
Sub-population 1	FC +	0	6	0	0
	FC -	1	85	2	36
Sub-population 2	FC +	0	1	1	3
	FC -	4	49	24	64
Sub-population 3	FC +	1	0	1	3
	FC -	5	21	23	38

¹: ELISA results were interpreted at an S/P value of 0.4 (IDEXX Laboratories, Portland, ME)

Table 3. Median and 95 Credible Intervals (CrIs) for the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the FC and ELISA and true prevalence (Ps) of low, medium and high prevalence subpopulations, under the independence and dependence model

Model			Median (95% CrIs)	
			Sheep	Goats
Independence	ELISA	Se	37 (10-80)	63 (42-93)
		Sp	97 (93-99)	95 (90-98)
	FC	Se	16 (2-48)	8 (2-17)
		Sp	97 (95-99)	98 (95-100)
	Subpopulation 1	P1	3 (0.7-9)	4 (0.8-10)
	Subpopulation 2	P2	19 (5-45)	36 (20-57)
	Subpopulation 3	P3	50 (28-73)	54 (35-74)
	ELISA	Se	32 (13-68)	69 (46-91)
		Sp	97 (94-99)	95 (90-98)
	Dependence	FC	Se	16 (0.4-26)
Sp			96 (93-98)	99 (96-100)
Subpopulation 1		P1	3 (0.7-9)	4 (0.8-10)
Subpopulation 2		P2	21 (7-48)	33 (20-52)
Subpopulation 3		P3	51 (29-74)	50 (34-70)

Table 4. Median (95% CrIs) for the Se and Sp of the FC and ELISA under the independence model using different sets of prior information.

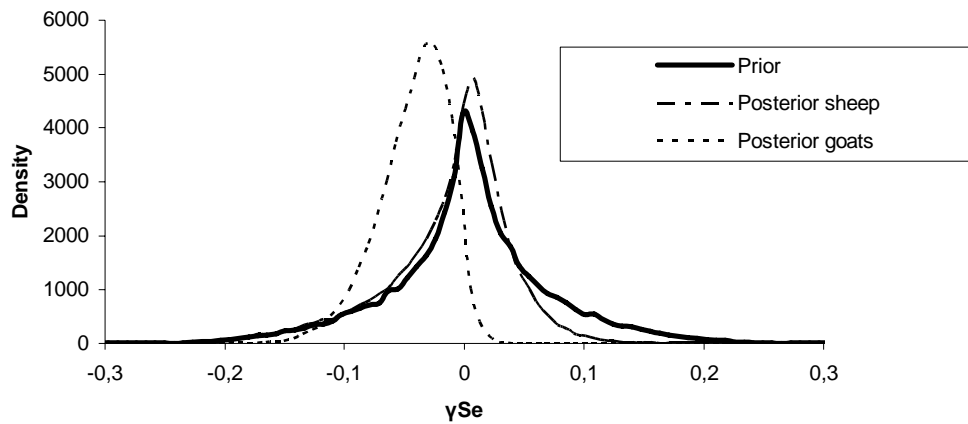
Prior			Median (95% CrIs)	
			<u>Sheep</u>	<u>Goats</u>
II ⁺	ELISA	Se	24 (0.7-62)	50 (34-80)
		Sp	97 (93-99)	95 (90-98)
	FC	Se	8 (1-26)	7 (3-15)
		Sp	97 (94-99)	98 (96-99)
III ⁺⁺	ELISA	Se	26 (10-64)	49 (32-84)
		Sp	98 (94-100)	94 (80-99)
	FC	Se	6 (0.7-22)	7 (2-15)
		Sp	95 (90-98)	97 (91-100)

⁺: Se's had uniform priors Be (1,1), Sp_{ELISA} , Sp_{FC} , low, medium and high prevalence subpopulations had Be (100, 5.5), Be (100,2), a uniform (0, 0.5), Be (2,4) and Be (4,2), respectively.

⁺⁺: Se's and Sp's had uniform priors Be (1,1), low medium and high prevalence subpopulations had a uniform (0, 0.5) Be (2,4) and Be (4,2), respectively.

Figure 1. Prior density and marginal posterior density of the conditional covariances γ_{Se} (1a) and γ_{Sp} (1b) for sheep and for goats.

1a



1b

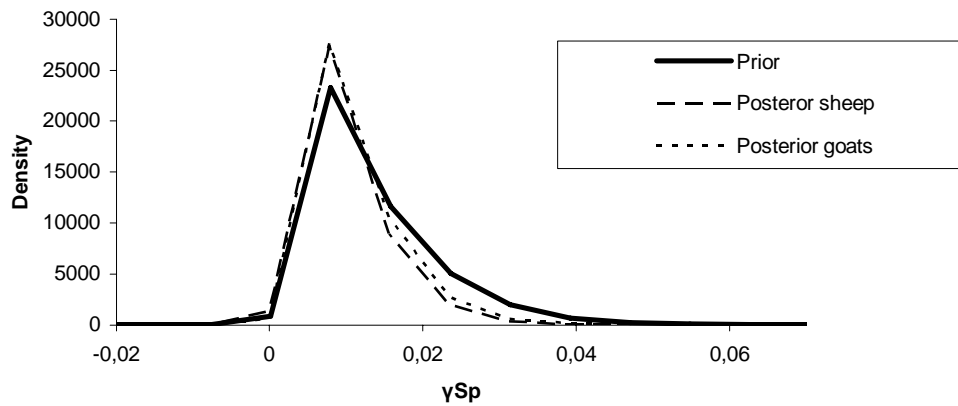


Figure 2. ROC curves for the ELISA from Bayesian estimation of Se and Sp in sheep (dotted line) and goats (continuous line). The ROC-curves were calculated assuming conditional independence between the ELISA and the FC. Marked points correspond to the S/P values closest to the upper left corner of the unit square.

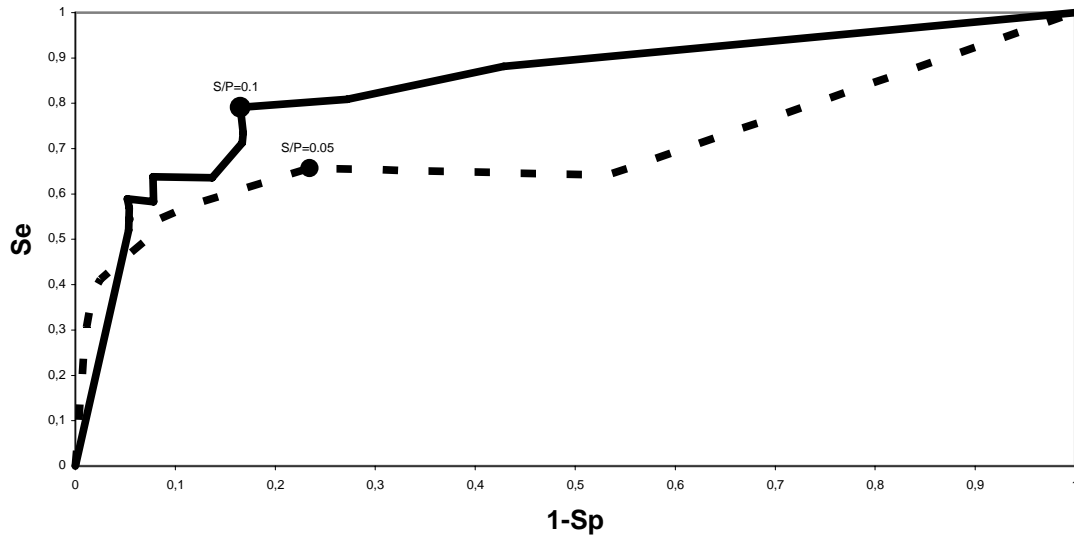
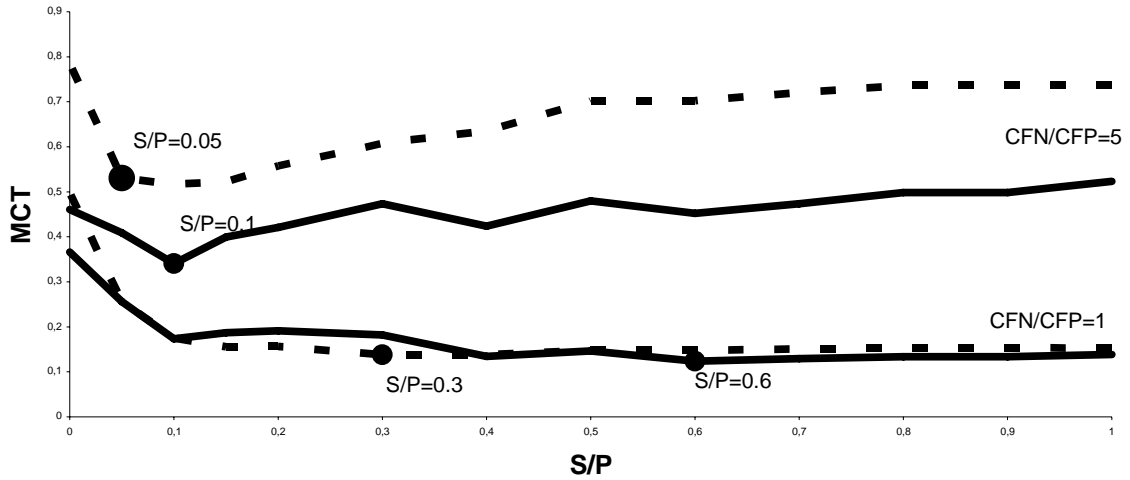


Figure 3. Misclassification cost term (MCT) for 20% prevalence as a function of the cut-off (S/P) value for ELISA in sheep (dotted line) and goats (continuous line). MCT's were estimated considering equal and five fold cost of a false negative (CFN) to a false positive (CFP) test result. Marked points correspond to S/P values that minimize MCT.



2. Application of a semi-dependent latent model in the Bayesian estimation of the sensitivity and specificity of two faecal-culture methods for diagnosis of paratuberculosis in sub-clinically infected Greek dairy sheep and goats

P. Kostoulas^{a*}, L. Leontides^a, C. Billinis^b, M. Florou^a

^aLaboratory of Epidemiology, Biostatistics and Animal Health Economics, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece.

^bLaboratory of Microbiology and Parasitology, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Trikalon 224, GR-43100, Karditsa, Greece.

*Corresponding author:

P. Kostoulas

Laboratory of Epidemiology, Biostatistics and Economics of Animal Production
School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, 224 Trikalon st., 43100 Karditsa,
Greece

Tel +30 24410 66092

Fax +30 24410 66047

Email: pkost@vet.uth.gr

Abstract

In this study, we compared the frequency of isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from faecal samples grown on Herrold's egg - yolk medium (HEYM) or on Lowenstein-Jensen (LJ) medium and estimated the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the methods separately in sub-clinically infected Greek dairy sheep and goats, using latent-class models and Bayesian estimation procedures. Faecal and blood samples were collected from 400 animals ≥ 1 year old in April – May 2002. The HEYM supported growth of MAP better than the LJ method and their agreement was very poor (weighted kappa=0.062 (95% CI: -0.098, 0.222)). There was no evidence of dependence between the Ses whereas the Sps were positively correlated. Thus, a semi-dependent model that assumed independence of Ses and accounted for the dependence of Sps was adopted. Under this model, the parallel interpretation of the results of the two methods gave median estimates and 95% credible intervals (CrIs) for Se_{par} , Sp_{par} of 15% (CrIs: 3, 45%), 96% (92, 98%) in sheep and 16% (6, 36%) and 97% (94, 99%) in goats.

Keywords: paratuberculosis, Herrold's egg-yolk medium, Lowenstein-Jensen, latent-class models, conditional semi-dependence, Bayesian estimation.

1. Introduction

Occasionally and erroneously, faecal-culture (FC) has been regarded as a gold-standard method for determining an animal's *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) infection status (National Research Council, 2003). However, at the early stages, infection cannot be detected by FC (Whitlock and Buergelt, 1996) and in late stages uneven shedding of bacteria can occur (Whittington and Sergeant, 2001). Early infection can go undetected even with histopathology because the pathology may not yet be detectable (Whittington et al., 1999; Nielsen et al., 2002). The actual lack of gold-standard methods explains the few, in reality relative, sensitivity (Se) and specificity (Sp) estimates of FC in dairy cattle (Sockett et al. 1992, Stabel 1997; Whitlock et al., 2000; Eamens et al., 2000) and the absence of similar studies in sheep and goats. Non-gold standard methods (“latent-class models”), which were introduced by Hui and Walter (1980) and recently reviewed by Enoe et al. (2000), provide an efficient alternative to Se and Sp estimation. Bayesian methodology, recently reviewed by Branscum et al. (2005), has the advantage of including prior information about the parameters to be estimated and allowing flexible investigation of the potential conditional dependence between tests' outcomes. The latter is crucial for the validity of the Se and Sp estimates when tests are based on the same biological principle and are likely to be dependent (Gardner et al., 2000; Enoe et al., 2000; Georgiadis et al., 2003; Toft et al., 2005).

It is unwise to extrapolate Se and Sp estimates from dairy cattle to sheep and goats because ovine and some caprine strains (de Juan et al., 2005) have different growth rates on artificial media (Collins et al., 1990; Juste et al., 1991; Marsh and Whittington, 2005) and are potentially affected differently by the decontamination procedures (Reddacliff et al., 2003). Furthermore, different strains, that could be of different virulences (Saxegaard 1990), predominate in sheep and goats (Stevenson et al. 2002, de Juan L et al., 2005) and might affect the performances of diagnostic tests. Hence, validation of diagnostics should be carried out separately in sheep and in goats.

In this study, we compared the frequency of isolation of MAP from FCs grown on Herrold's egg-yolk medium (HEYM) or on Lowenstein-Jensen (LJ) medium; we estimated the Se and Sp of the methods separately in sub-clinically infected Greek dairy sheep and goats, using latent-class models and Bayesian estimation procedures. The potential dependence between the Ses and Sps was also assessed and was accounted for (when present).

2. Materials and methods

2.1. Definition of infection

Both tests applied here aim at detecting faecal excretion of MAP. Hence, we adopted (after modifications) the definition of infection for paratuberculosis in dairy cattle as given by Nielsen et al. (2002): “... infection here means that sheep or goats carry the bacteria intracellularly; substantial replication need not take place because the infection can be latent; we assumed that once an animal has an established infection, the infection persists for life”. Thus, infected animals potentially excrete MAP.

2.2. Population under study

Four dairy sheep and goat flocks (250 to 350 animals each), were selected for this study. One of the flocks was a sheep-only flock, another was a goat-only flock and the remaining two were mixed, one with 60-40% and one with 40-60% sheep-to-goat ratios. All flocks had a history of clinical paratuberculosis; vaccination against MAP had never been applied. They were selected to participate in a larger study designed to evaluate the role of wildlife in the epidemiology of paratuberculosis in small ruminants. To fulfil the tasks of this study the owners of these flocks agreed to permit close monitoring for 2 consecutive years (2001-2002). Sheep and goats were of various domestic breeds (e.g. Chios, Karagouniko, *Capra prisca*) or their crosses; no flock had a distinct breed pattern. The animals were kept, under semi-intensive management, for milk production, which was the primary breeding goal. They grazed on pasture throughout most of the year and were additionally fed concentrates. They spent most of the day outside and were moved into the shed during the night

2.3. Sampling strategy

One hundred female animals clinically healthy at the day of sampling, older than one year of age were randomly (from the flocks' registry using a computer-generated list) selected for sampling from each flock. From each sampled animal, 10 grams of faeces from the rectum were collected.

2.4. Testing

2.4.1 HEYM method

Faeces were cultured following a slight modification of a protocol described in recent studies (Greig et al., 1999). Briefly, 1-2 grams of faeces were homogenized for 30 sec in 10 ml of sterile distilled water using a Colworth Stomacher 80 (Seward Medical). Homogenates were then decontaminated by adding 10 ml of 1.5% hexadecyl pyridinium chloride (Sigma-Aldrich) and left to stand overnight at room temperature. The resulting supernatants were centrifuged at 3080 rpm for 20 minutes at 4°C, and each pellet was re-suspended into 10 ml of sterile distilled water. The centrifugation step was repeated, and each pellet was re-suspended into 1 ml of sterile distilled water. Suspensions were then transferred to microcentrifuge tubes and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at room temperature. The pellets were re-suspended in 0.5 ml of sterile distilled water. Following decontamination procedures, two slants of HEYM supplemented with mycobactin J and antibiotics (Becton Dickinson product code: 222233) were inoculated with 0.1 ml of the prepared suspension.

2.4.2 LJ method

Faeces were cultured as described earlier (Whitlock and Rosenberger, 1990). Briefly, 1-2 grams of faeces were homogenised for 30 sec in 10 ml of sterile distilled water with a Colworth Stomacher 80 (Seward Medical). The homogenates were transferred to a fresh tube containing 25 ml of 0.9% Hexadecylpyridinium chloride (HPC, Sigma) in half strength BHI broth (Oxoid) and allowed to stand at 37°C for 24h. Then, the supernatants were centrifuged at 1000 g for 30 min and the pellet was collected and re-suspended in 1 ml half-strength BHI broth, containing vancomycin (100 mg/ml), nalidixic acid (100 mg/ml) and amphotericin B (50 mg/ml) (all Sigma antibiotics). The

tube containing the pellet with the mixture of antibiotics was incubated for 48 h at 37°C. The prepared sediment was divided in three and ~300 µl (6 drops) was inoculated onto each of three slopes of LJ solid medium (2 with mycobactin and pyruvate and 1 plain).

2.4.3 Reading of results and confirmation of MAP growth

The inoculated slants were incubated for 6 months at 37°C. A sample was defined as positive if at least one tube had detectable growth. To confirm the identity of colonies grown, DNA was extracted and screened for the presence of the MAP-specific insertion sequence IS900 (Green et al., 1989). Prior to culturing, samples were divided to two equal parts and each part was coded differently. Thus, the authors responsible for culturing and confirmation procedures were unable to cross-reference their results.

2.5. Evaluation of MAP growth and measurement of agreement between HEYM and LJ.

MAP growth was evaluated only for samples that were positive after 30-week-long incubation. Contaminated samples were excluded. The frequency of MAP isolates was compared between the methods with the McNemar's test. Exact weighted kappas were calculated to determine the agreement between the two methods.

2.6. Bayesian estimation of sensitivity and specificity for HEYM and LJ in sheep and in goats.

2.6.1 Models and assumptions

We applied latent-class models (Hui and Walter 1980; Vacek 1985; Walter and Irwig 1988; Enoe et al. 2000) in a Bayesian framework (Johnson et al. 2001; Dendukuri and Joseph 2001; Branscum et al., 2005). The estimation of Se and Sp for HEYM and LJ (Se_{HEYM} , Sp_{HEYM} , Se_{LJ} and Sp_{LJ} , respectively) in sheep and in goats was based on their cross-classified results in three subpopulations of sheep and three subpopulations of goats (for details on the division to sub-populations see below).

To validly use the method, we had to meet three main assumptions. (a) The diagnostic tests should be conditionally independent of each other, given the true disease status (Gardner et al., 2000); otherwise, models adjusting for the likely conditional dependence between the tests should be used (Enoe et al, 2000; Branscum et al., 2005). (b) The subpopulations should be of different prevalence (P). (c) In these subpopulations, the Se and Sp of the tests should be constant (Hui and Walter, 1980). These assumptions were validated as follows:

a. Assumption of conditional independence

We were highly concerned about the assumption of conditional independence because both tests were based on the same biological principle. Therefore, we considered the dependence model as proposed by Dendukuri and Joseph (2001) that directly incorporates the covariance of the Ses (γ_{Se}) and the Sps (γ_{Sp}) between the two tests and the independence model as proposed by Johnson et al. (2001). Both models were modified accordingly for the analysis of three subpopulations (conditionally independent and dependent models for the two test/two subpopulation case were recently reviewed by Branscum et al. (2005)).

The assumption of conditional independence was assessed in two ways: (i) Under the dependence model, we estimated γ_{Se} and γ_{Sp} and the corresponding 95% credible intervals (CrIs) and (ii) we estimated the *Deviance Information Criterion* (DIC) for the independence and dependence model in sheep and in goats. DIC is given by $D_{hat} + 2 * pD$, where D_{hat} is a point estimate of the deviance and pD is the posterior mean of the deviance minus the deviance of the posterior means. The model with the smallest DIC is the model that fits the data best (Spiegelhalter et al., 2002). If estimated CrIs included zero (Gardner et al., 2000) and the difference in the DIC value of the two models was < 2 (Spiegelhalter et al., 2002) the assumption of conditional independence was valid. The DIC difference between the two models was < 2 (1.8 for sheep and 1.7 for goats with the dependent model having the smallest value) indicating that they fitted the data equally well. Furthermore, 95% CrIs of γ_{Se} included zero, suggesting that tests were independent between infected individuals. Although the left bound of 95% CrIs for γ_{Sp} was equal to zero, the 5th percentile of the posterior distribution of γ_{Sp} was always > 0.0 . This meant that there was a posterior probability of at least 95% that the tests' outcomes were positively correlated among healthy individuals. Hence, a semi-dependent model that incorporated only γ_{Sp} was adopted (see appendix).

b. Assumption of difference in prevalence

According to the responsible practising veterinarian, the incidence of chronic recurring diarrhoea (an indication of clinical paratuberculosis) was $< 10\%$, 10-30% (2 flocks) and $> 30\%$. Accordingly, three subpopulations of sheep and three subpopulations of goats were formed in which low, medium and high prevalence of paratuberculosis was expected.

c. Assumption of constant Se and Sp across subpopulations

To check the validity of the assumption of equal accuracy across subpopulations, we re-analyzed all possible pairs of sub-populations, effectively running the models three times for sheep and three times for goats. Each time, the model and prior information used were identical to the model and the priors used in the three-subpopulation case. Results from all paired sub-population analyses were consistent with the three-subpopulation analysis, indicating that the assumption of constant accuracy was valid, in both sheep and goats.

2.6.2. Quantification of the magnitude of conditional dependence.

Because covariances do not provide a direct measure of the magnitude of dependence, it is useful to express the covariance as a percentage ($R\gamma_{Sp}$) of the maximal possible value (Gardner et al., 2000). The maximal possible value for γ_{Sp} was $M = \min(Sp_{HEYM} * (1 - Sp_{LJ}), Sp_{LJ} * (1 - Sp_{HEYM}))$. Median and 95% CrIs of $R\gamma_{Sp}$ was estimated by Gibbs sampling as $R\gamma_{Sp} = \frac{\gamma_{Sp}}{M} 100\%$.

2.6.3 Parallel interpretation of FC methods

To maximize Se to detect faecal shedding in MAP sub-clinically infected sheep and goats, we also considered the parallel interpretation of the two FC methods. Under parallel interpretation an animal was considered positive if positive on at least one FC

method and negative otherwise. Se_{par} and Sp_{par} of the parallel-interpretation scheme were estimated by Gibbs sampling as $Se_{par}=1-(1-Se_{LJ})*(1-Se_{HEYM})$ and $Sp_{par}=Sp_{LJ}*Sp_{HEYM}+\gamma_{Sp}$ (Gardner et al., 2000).

2.6.4. Prior information and sensitivity analysis

Due to the absence of relevant studies in sheep and goats, we used non-informative priors for Se_s and informative priors for Sp_s , which were based on published estimates from dairy cattle. Beta distributions $Be(a, b)$, were used as priors for the parameters of interest (Se_s , Sp_s , and Ps). The same priors were used for both sheep and goats. The undisputed high to absolute Sp for FCs (Sockett et al., 1992; Whitlock et al., 2000; Nielsen et al., 2002) justified the adoption of very informative Sp_s priors. For both Sp_s , the most-probable value was determined to be 0.98, and it was thought to be at least 0.95 with 95% certainty. This corresponded to a $Be(100,2)$. For prevalence priors, the most-probable values for Ps in the low-, medium-, and high-prevalence subpopulations were set at 3, 25 and 50%, respectively and we were 95% sure that they should not be more than 10 and 55% in the low- and medium-prevalence subpopulations and \geq than 30% in the high-prevalence subpopulations. The corresponding distributions were $Be(2.84, 56.40)$, $Be(3.09, 7.25)$, and $Be(8.11, 7.91)$, respectively.

To assess the influence of prior information on the estimates of the model parameters (Joseph et al., 1995; Enoe et al., 2000; Georgiadis et al., 2003; Branscum et al., 2005) two additional different sets of prior information were considered: (II) the abovementioned prevalence priors and uninformative Se_s and Sp_s priors and (III) wide prevalence priors, uninformative Se_s priors and the abovementioned informative Sp_s priors. We used uninformative priors for Sp_s 's in prior set II to check whether our initial Sp -prior selection severely affected the estimates. Also, because there might be differences between the true and the assumed prevalences, which were based on the veterinarian's classification, we used wider prevalence priors, in prior set III, to assess the effect of extra uncertainty on our estimates. For the latter prior set (III), the low-prevalence subpopulation's prior allowed for equal probability of the prevalence over the range from 0 to 50%, and for medium- and high-prevalence subpopulations, the most-probable prevalence values were set to 25 and 75% and 95th and 5th percentiles to 65 and 35%, respectively. These priors correspond to a $Be(1,1)$ truncated over the range from 0 to 50%, $Be(2, 4)$ and $Be(4, 2)$, respectively.

Finally, for the semi-dependent and dependent models, uniform prior distributions over the ranges of the two covariances were used. The magnitude of the conditional covariances is directly affected by the magnitude of the Se_s and Sp_s . Hence, the limits for γ_{Se} , γ_{Sp} were $\max(-(1-Se_{HEYM})*(1-Se_{LJ}), -Se_{HEYM} * Se_{LJ}) \leq \gamma_{Se} \leq \min(Se_{HEYM}*(1-Se_{LJ}), Se_{LJ}*(1-Se_{HEYM}))$ and $\max(-(1-Sp_{HEYM})*(1-Sp_{LJ}), -Sp_{HEYM}*Sp_{LJ}) \leq \gamma_{Sp} \leq \min(Sp_{HEYM}*(1-Sp_{LJ}), Sp_{LJ}*(1-Sp_{HEYM}))$, respectively (Gardner et al., 2000).

Under every considered set of prior information, assumption (a) was assessed as previously described. In all cases, the semi-dependent model was selected.

2.6.5. Assessment of convergence

Convergence diagnostics of Markov chain-Monte Carlo (MCMC) sampling are not foolproof. Therefore, we did a combination of diagnostics plus visual inspection of the trace plots - as recommended (Best et al., 1996). Standard diagnostic procedures

(Heidelberger and Welch, 1983; Raftery and Lewis, 1992; Gelman and Rubin 1992) revealed no convergence problems. We also checked autocorrelations by visual inspection of the autocorrelation plot for each parameter.

In addition, the results of the Raftery & Lewis method indicated that, in all cases, analytical summaries of 49,500 iterations after a burn-in phase of 500 iterations were adequate to obtain, with 95% confidence, parameter estimates of the median, the 2.5th and 97.5th percentiles with ± 0.01 accuracy.

2.6.6. Statistical software

McNemar's test and weighted kappa were calculated using the statistical package StatXact, version 4.0.1 for Windows (Cytel Software Corporation, 1999). Significance was evaluated at the 5% level.

Latent-class models were run in the freeware program WinBUGS (Spiegelhalter et al., 1996). The same program was used to check the Gelman-Rubin diagnostic and the autocorrelations. For the Raftery & Lewis and the Heidelberger & Welch methods, we used the R-CODA (Best et al., 1996), which stands for Convergence Diagnostic and Output Analysis software. This is a menu-driven set of R-Plus functions which serve as an output processor for WinBUGS.

3. Results

After 30 weeks of incubation, 32 were contaminated in either or both media. Eleven out of 173 sheep and 11 out of 195 goats were positive in at least one of the FCs (Table 2). In sheep, 8 were HEYM positive and 3 were LJ positive. The corresponding numbers in goats were 8 and 4. Growth was significantly more successful on HEYM than on LJ (McNemar's $\chi^2 = 3.86$, 1 d.f., $p=0.049$), with 4.3% apparent prevalence of faecal excretion on HEYM compared with 1.9% in LJ. Only 1/368 (0.27%) faecal samples was positive in both cultures. The agreement between the two media was very poor: kappa = 0.062 (95% CI: -0.098, 0.222).

The S_{es} and S_{ps} for the single-test situations are in Table 4. Under the prior information used in the primary analysis (prior set I) the γ_{Sp} and $R\gamma_{Sp}$ were 0.0017 (0, 0.01) and 16% (0, 81%) in sheep while were 0.0043 (0, 0.02) and 49% (2, 97%) in goats. For prior set II, γ_{Sp} and $R\gamma_{Sp}$ were 0.0022 (0, 0.02) and 26% (0, 93%) in sheep and 0.0049 (0, 0.02), 50% (7, 97%) in goats, respectively. For prior set III, the corresponding values of γ_{Sp} and $R\gamma_{Sp}$ were 0.0024 (0, 0.01) and 30% (0-94%) in sheep and 0.0078 (0, 0.036) and 50% (7, 97%) in goats, respectively. Parallel interpretation of the two methods resulted in S_{par} and Sp_{par} of 15% (3, 45%) and 96% (92, 98%) in sheep. In goats, S_{par} and Sp_{par} were 16% (6, 36%) and 97% (94, 99%), respectively.

4. Discussion

The HEYM method supported growth significantly better than the LJ method. Contrarily, Juste et al. (1991) reported better growth of sheep and goat isolates on LJ than HEYM. In dairy cattle, Nielsen et al. (2004) reported higher frequency of MAP isolates on HEYM than on LJ; their finding was also in contrast to previous findings (Whipple et al., 1991). In our study the agreement between the two methods was very poor; only one sample was positive on both media. Poor agreement between HEYM and LJ was also

recently reported in dairy cattle (Nielsen et al., 2004). Gardner et al. (2000) reported that the magnitude of kappa in a mixed population of infected and non-infected animals depends on the prevalence of infection and the Se and Sp of the tests and their covariances. In our study, although Sps were high and dependent, the Ses were low and independent – adversely affecting agreement.

Because Se and Sp had low and high true values, respectively, by definition the range of the conditional covariances, γ_{Se} and γ_{Sp} , was small and the Se and Sp estimates under any considered model were close. That is why DIC (a measure of overall model fit) indicated that the independent, semi-dependent and dependent models fitted the data equally well. The γ_{Se} suggested that the results of HEYM and LJ were independent for sub-clinically infected individuals. This is generally not expected for tests based on the same biological principle (Enoe et al., 2000; Gardner et al., 2000; Toft et al., 2005). The γ_{Sp} was small because both FCs were highly specific, but $R\gamma_{Sp}$ indicated that the magnitude of dependence of the FCs among healthy individuals was moderate to high. Consequently, it was both biologically and computationally correct to adopt the semi-dependent model that accounted for dependence of Sps and assumed independence of Ses.

Se estimates of both FCs were very low. Se_{FC} depends on the stage of infection, which affects faecal-shedding of bacteria (Crossley et al., 2005). In sub-clinically infected animals the number of bacteria in faeces is low (Reddacliff et al., 2003), and intermittent and uneven shedding of bacteria occurs (Whittington and Sergeant, 2001). At a first glance, both Ses seem considerably lower than published estimates in dairy cattle (Table 1). However, the published estimates of Se_{FC} in dairy cattle were actually relative Se estimates (Sockett et al. 1992, Stabel 1997; Eamens et al., 2000) even to the FC itself (Whitlock et al., 2000) and overestimated Se_{FC} to an unknown extent (Sergeant et al., 2003). Whitlock et al. (2000) faecally sampled the same group of cattle repeatedly. When they classified as positive those that were positive in at least one from the series of FCs, they estimated the Se of the first FC at 42%. This dropped below 25% if FC-negative animals that had infected tissues when examined at slaughter were considered infected. Nielsen et al. (2002) recently reported a maximum likelihood Se estimate of 20% for a FC method for sub-clinically infected dairy cattle. Furthermore, we should also consider the difficulties FC has in sheep and goats in comparison to cattle. Type I strains appear to have a strong host preference for sheep (Stevenson et al. 2002). Many ovine strains do not grow well on artificial media (Collins et al., 1990; Juste et al., 1991; Marsh and Whittington, 2005). Although most caprine strains belong to the cattle (Type II) group (Collins et al., 1990; Whipple et al., 1990; Thoresen and Olsaker, 1994; Pavlik et al., 1995; Cousins et al., 2000), lately, a Type-III profile was described (de Juan et al., 2005) that appears to be intermediate between Type I and Type II and phenotypically are slow growing like Type-I strains. The latter strains were from goat flocks neighbouring to sheep flocks, which was also the case in this study. Possible predominance of Type-I and -III strains in Greek dairy sheep and goats, respectively, would further explain the very low Se_{FC} estimate.

Sp of both FCs was always close to unity but not absolute. This small false-positive fraction reflects either the potential of pass-through of orally ingested organisms by uninfected animals (Sweeney et al., 1992), or false-positive FC results in high-

prevalence flocks where the premises are likely to be heavily contaminated (Manning et al., 2003), or the small yet existent possibility of laboratory contamination.

Tests of independent Ses should be preferred when parallel interpretation of tests is used to maximize sensitivity (Gardner et al., 2000). In our case, although both tests were based on the same biological principle, independence of Ses justified parallel interpretation. In addition, Sp of parallel testing was not seriously compromised because both Sps were high. The loss in Sp_{par} was further reduced due to the positive correlation of the Sps ($\gamma_{Sp}>0$).

Bayesian methodology has the advantage of including prior information about the parameters to be estimated and provides improved inference if substantive prior information are available (Joseph et al., 1995; Branscum et al., 2005; Toft et al., 2005). However, good Bayesian analysis should include a judgement of the importance of the prior (Joseph et al., 1995; Toft et al., 2005; Branscum et al., 2005). Sensitivity analysis suggested that our results were moderately dependent on prior information but qualitatively the same (see table 4). That Sps remained the same when using non-informative priors (set II) supported our original Sp prior selection. Moreover, independence of Ses and dependence of Sps was observed under each considered set of prior information. Finally, we considered the effect of slight perturbations of the data on the final inferences to determine the impact on our analysis if the zeros in each subpopulation had actually been observed to be one. We modified all zeros of each subpopulation each time and re-analyzed the data. The analysis of the perturbed data had a minimum impact on the results, which indicated that we could be confident of the results from the analysis of the observed data (Enoe et al., 2000).

In the dependence model initially proposed by Dendukuri and Joseph (2001) the lower bound of the conditional covariances was fixed to zero, because negative correlation between tests outcomes was considered a rare phenomenon. For our models, we adopted the definition of the limits of the covariances proposed by Gardner et al. (2000) that allowed for both positive and negative correlation of test outcomes (see appendix). Doing so, we could separately investigate the significant difference of each covariance from zero by inspection of its posterior probability. In this way, we selected the semi-dependent model based not only on a measure of the overall model fit, such as DIC, but also on the judgement of the importance of each covariance parameter separately.

We found poor agreement between the results of FC on HEYM and LJ ($\kappa=0.062$) in sub-clinically infected Greek dairy sheep and goats. Both FCs had very low Se, which improved by their parallel interpretation. The Se_{par} was 15% and 16% in sheep and goats, respectively.

Acknowledgements

This work was partly funded by a European Union project entitled “The role of wildlife in the epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in domestic ruminants in Europe” (contract number: QLK2-CT-2001-00879).

Appendix

The n_k observations from population k lead to the data vector for the joint test results $y_k=(y_{11k}, y_{12k}, y_{21k}, y_{22k})$ where y_{11k} (y_{22k}) is the number of sampled animals from

population 1 that test positive (negative) on both tests and y_{12k} (y_{21k}) is the number of animals sampled from population k that test positive (negative) on test 1 and negative (positive) on test 2. The data y_k are assumed to have independent multinomial sampling distribution:

$$y_k \sim \text{multinomial}(n_k, (p_{11k}, p_{12k}, p_{21k}, p_{22k})), \quad k = 1, 2, \dots, L$$

where the multinomial cell probabilities for population k are given by

$$p_{11k} = P(T_1^+, T_2^+) = \pi_\kappa (Se_1 Se_2) + (1 - \pi_\kappa) ((1 - Sp_1)(1 - Sp_2) + \gamma_{Sp})$$

$$p_{12k} = P(T_1^+, T_2^-) = \pi_\kappa (Se_1 (1 - Se_2)) + (1 - \pi_\kappa) ((1 - Sp_1) Sp_2 - \gamma_{Sp})$$

$$p_{11k} = P(T_1^-, T_2^+) = \pi_\kappa ((1 - Se_1) Se_2) + (1 - \pi_\kappa) (Sp_1 (1 - Sp_2) - \gamma_{Sp})$$

$$p_{11k} = P(T_1^-, T_2^-) = \pi_\kappa (1 - Se_1)(1 - Se_2) + (1 - \pi_\kappa) (Sp_1 Sp_2 + \gamma_{Sp})$$

with π_κ the prevalence in the k^{th} population.

The two sensitivities (Se_1 and Se_2) and the two specificities (Sp_1 and Sp_2) are assumed to have independent beta prior distributions. Because prior information about the covariance often will be absent, one may use uniform prior distribution over the range of the covariance. The covariance between the test outcomes for the non-infected subpopulation satisfies $\max(-(1 - Sp_1) * (1 - Sp_2), -Sp_1 * Sp_2) \leq \gamma_{Sp} \leq \min(Sp_1 * (1 - Sp_2), Sp_2 * (1 - Sp_1))$, (Gardner et al., 2000).

This is essentially a modification of the model initially proposed by Dendukuri and Joseph (2001) that (i) incorporates only γ_{Sp} and (ii) definition of the range for γ_{Sp} allows for both negative and positive correlation of test outcomes for uninfected individuals.

References

1. Best, N.G., Cowles, M.K., Vines, S.K., 1996. CODA Manual Version 0.30. MRC Biostatistics Unit, Cambridge, UK.
2. Branscum A.J. , Gardner I.A., Johnson W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modelling. *Prev. Vet. Med.* 68, 145–163.
3. Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridisation. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591–1596.
4. Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J., 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aus. Vet.* 78, 184–190.
5. Crossley, B.M., Zagmutt-Vergara, F.J., Fyock, T.L., Whitlock, R.H., Gardner, I.A., 2005. Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Vet. Mic.* 107, 257–263.
6. Cytel Software Corporation, 1999. User's manual. StatXact The Statistical Package, version 4.0.1 for Windows.
7. de Juan L., Mateos, A., Dominguez, L., Sharp, J.M., Stevenson, K., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Mic.* 106, 249–257.

8. Dendukuri, N., Joseph, L., 2001. Bayesian approaches to modeling the conditional dependence between multiple diagnostic tests. *Biometrics* 57, 158–167.
9. Eamens, G.J., Whittington, R.J., Marsh, I.B., Turner, M.J., Saunders, V., Kemsley, P.D., Rayward, D., 2000. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet. Mic.* 20, 357-367.
10. Enøe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease status is unknown. *Prev. Vet. Med.* 45, 61–81.
11. Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev. Vet. Med.* 45, 107-122.
12. Gelman, A., Rubin, D.B., 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Stat. Sci.* 7, 457– 511.
13. Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., Gardner, I.A., Singh, R., 2003. Correlation-adjusted estimation of sensitivity and specificity of two diagnostic tests. *Appl. Stat.* 52, 63–76.
14. Green, E. P., Tizard M. L., Moss M. T., Thompson J., Winterbourne D. J., McFadden J. J., Hermon-Taylor J., 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17, 9063–9073.
15. Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Mic.* 37, 1746-1751.
16. Heidelberger, P. and Welch, P., 1983. Simulation run length control in the presence of a initial transient. *Operations Research* 31, 1109-1144.
17. Hui, S.L., Walter, S.D., 1980. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 36, 167– 171.
18. Johnson, W.O., Gastwirth, J.L., Pearson, L.M., 2001. Screening without a gold standard: the Hui-Walter paradigm revisited. *Am. J. Epidemiol.* 153, 921-924.
19. Joseph, L., Gyorkos, T.W., Coupal, L., 1995. Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am J Epidemiol.* 141, 263-272.
20. Juste, R.A., Marco, J.C., Saez de Ocariz, C. and Aduriz, J.J., 1991. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 28, 385–390.
21. Manning, E.J., Kucera, T.E., Gates, N.B., Woods, L.M., Fallon-McKnight, M., 2003. Testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd. *J. Wildl. Dis.* 39, 323-328.
22. Marsh, I.B. and Whittington, R.J., 2005. Deletion of an *mmpL* gene and multiple associated genes from the genome of the S strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* identified by representational difference analysis and in silico analysis. *Mol. Cell. Prob.*, In press.
23. National Research Council, 2003. *Diagnosis and control of Johne's disease*. The National Academies Press, Washington, D.C.
24. Nielsen, S.S., Grønbaek, C., Agger, J.F., Houe, H., 2002. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 53, 191–204.
25. Nielsen, S.S., Kolmos, B., Christoffersen, A.B., 2004. Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. *J. Appl. Microbiol.* 96, 149-153.
26. Pavlik, I., Bejckova, L., Pavlas, M., Rozsypalova, Z., Koskova, S., 1995. Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.* 45, 311–318.
27. Raftery, A.L., Lewis, S., 1992. Comment: one long run with diagnostics: implementation strategies for Markov chain Monte Carlo. *Stat. Sci.* 7, 493–497.
28. Reddacliff, L.A., Vadali, A., Whittington, R.J., 2003. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet. Microbiol.* 95, 271-282.
29. Saxegaard, F., 1990. Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* 102, 149-156.

30. Sergeant, E.S., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C., Whittington, R.J., 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61, 235-248.
31. Sockett, D.C., Carr, D.J., Collins, M.T., 1992. Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 56, 148-153.
32. Spiegelhalter, D. J., Best, N. G., Carlin, B. P., van der Linde, A., 2002. Bayesian measures of model complexity and fit (with discussion). *J. Roy. Statist. Soc. B.* 64, 583-640.
33. Spiegelhalter, D., Thomas, A., Best, N., Gilks W., 1996. BUGS: Bayesian Inference Using Gibbs Sampling, Version 0.50. MRC Biostatistics Unit, Cambridge. <http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/winbugs/contents.shtml>
34. Stabel, J.R., 1997. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 375-380.
35. Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
36. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Hamir, A.N., Rosenberger, A.E., Herr, S.A., 1992. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1312-1314.
37. Thoresen, O.F., Olsaker, I., 1994. Distribution and hybridization patterns of the insertion element IS900 in clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 293-303.
38. Toft, N., Jørgensen, E., Højsgaard, S., 2005. Diagnosing diagnostic tests: evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. *Prev. Vet. Med.* 68, 19-33.
39. Vacek, P.M., 1985. The effect of conditional dependence on the evaluation of diagnostic tests. *Biometrics* 41, 959-968.
40. Walter S.D. and Irwig L.M, 1988. Estimation of test error rates, disease prevalence and relative risk from misclassified data: a review. *J. Clin. Microbiol.* 41, 923-937.
41. Whipple, D.L., Callihan, D.R., Jarnagin, J.L., 1991. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagn. Inv.* 3, 368-373.
42. Whipple, D.L., Kapke, P., Vary, C., 1990. Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2561-2564.
43. Whitlock, R. H. and Rosenberger, A. E., 1990. Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis* a recommended procedure. Proceedings of the 94th Annual Meeting of the USAHA, pp. 280-285.
44. Whitlock, R.H., Buergelt, C., 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 12, 345-356.
45. Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol.* 77, 387-398.
46. Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall D.J., Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1077-1083.
47. Whittington, R.J., Sergeant, E.S., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations. *Aus. Vet.* 79, 267-278.

Table 1. Published estimates of the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of various faecal culture (FC) methods for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle

Reference	Species	Faecal culture
Nielsen et al., 2002	Cattle	Se=20-73% Sp > 98%
Sockett et al., 1992	Cattle	Se =45-73% Sp > 99%
Whitlock et al., 2000	Cattle	Se=42% Sp > 99%

Table 2. Cross-classified results from faecal samples of 173 Greek dairy sheep and 195 goats, older than one year at sampling in April – May 2002, from four *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) sub-clinically infected flocks, that were cultured on Herrold's egg-yolk medium (HEYM) and Lowenstein-Jensen medium (LJ).

Assumed prevalence		Sheep		Goats	
		LJ+	LJ-	LJ+	LJ-
<10%	HEYM +	0	6	0	0
	HEYM -	2	84	1	37
10-30%	HEYM +	0	1	1	3
	HEYM -	1	52	2	86
>30%	HEYM +	0	1	0	4
	HEYM -	0	26	0	61

Table 3. Parameters a and b of the Beta distributions (Be(a,b)) that were used as priors for the Se and Sp of the HEYM and the LJ method (Se_{HEYM} , Sp_{HEYM} , Se_{LJ} and Sp_{LJ} , respectively) and for the assumed prevalence of paratuberculosis, under the semi-dependent model in each set of prior information (I, II and III)

Prior Set	Se or Sp	Assumed prevalence		
		a, b		a, b
I	Se_{HEYM}	1, 1	<10%	2.84, 56.4
	Sp_{HEYM}	100, 2	10-30%	3.09, 7.25
	Se_{LJ}	1, 1	>30%	8.11, 7.91
	Sp_{LJ}	100, 2		
II	Se_{HEYM}	1, 1	<10%	2.84, 56.4
	Sp_{HEYM}	1, 1	10-30%	3.09, 7.25
	Se_{LJ}	1, 1	>30%	8.11, 7.91
	Sp_{LJ}	1, 1		
III	Se_{HEYM}	1, 1	<10%	1, 1 ⁺
	Sp_{HEYM}	100, 2	10-30%	2, 4
	Se_{LJ}	1, 1	>30%	4, 2
	Sp_{LJ}	100, 2		

⁺ truncated over the range from 0 to 0.5

Table 4. Median and 95% credible intervals (CrIs) for the Se and Sp of the HEYM and the LJ method under the semi-dependent model with prior information sets I, II and III.

Prior		Sheep		Goats	
		<u>Median</u>	<u>95% CrIs</u>	<u>Median</u>	<u>95% CrIs</u>
I	Se _{HEYM}	8	1-37	12	4-30
	Sp _{HEYM}	97	94-99	99	96-100
	Se _{LJ}	5	0-23	3	0-14
	Sp _{LJ}	99	96-100	98	96-100
II	Se _{HEYM}	5	0-26	11	2-28
	Sp _{HEYM}	94	89-98	98	93-100
	Se _{LJ}	5	0-22	3	0-13
	Sp _{LJ}	98	94-100	97	93-100
III	Se _{HEYM}	11	0-29	9	3-24
	Sp _{HEYM}	98	95-100	99	96-100
	Se _{LJ}	4	0-14	3	0-12
	Sp _{LJ}	99	96-100	98	95-100

3. The association of sub-clinical paratuberculosis with the fertility of Greek dairy ewes and goats varies with parity



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Preventive Veterinary Medicine xxx (2006) xxx–xxx

www.elsevier.com/locate/prevetmed

**PREVENTIVE
VETERINARY
MEDICINE**

The association of sub-clinical paratuberculosis with the fertility of Greek dairy ewes and goats varies with parity

P. Kostoulas^{a,*}, L. Leontides^a, C. Billinis^b,
G.S. Amiridis^c, M. Florou^a

^a *Laboratory of Epidemiology, Biostatistics and Animal Health Economics, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, 224 Trikalon st., 43100 Karditsa, Greece*

^b *Laboratory of Microbiology and Parasitology, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, 224 Trikalon st., 43100 Karditsa, Greece*

^c *Department of Obstetrics and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of Thessaly, 224 Trikalon st., 43100 Karditsa, Greece*

Received 26 April 2005; received in revised form 7 November 2005; accepted 2 December 2005

Abstract

Our cross-sectional study investigated the association of sub-clinical *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) infection with failing to produce a live offspring the season of lambing/kidding (November 2001 to January 2002) before testing (in April–May 2002), in four dairy-sheep and/or goat flocks in Greece (369 animals \geq 1.5-year-old). From each selected animal 10 ml of blood and 10 g of feces from the rectum were obtained. The harvested sera were tested for antibodies to MAP with a commercial ELISA test kit; the feces were cultured on Herrold's egg-yolk medium supplemented with mycobactin J and antibiotics. An animal was considered sub-clinically infected when found either seropositive or culture positive. The true prevalence of sub-clinically infected animals, adjusted for the sensitivity and specificity of the parallel testing, was 14% (0.1–28%) and 35.9% (9.2–62.7%) in sheep and goats, respectively. The association of fertility of sheep and goats with sub-clinical paratuberculosis was investigated in random-effects logistic models. Sub-

* Corresponding author. Tel.: +30 24410 66092; fax: +30 24410 66047.
E-mail address: pkost@vet.uth.gr (P. Kostoulas).

clinically infected animals (compared to uninfected) had OR for live offspring the previous year of 5.4 for parity <4, OR = 0.05 for parity >6, and a non-significant OR for the middle parity category. © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Paratuberculosis; Fertility; Parity; Sheep; Goats

1. Introduction

Ovine paratuberculosis (OP) predominantly results from infection with sheep strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (Whittington et al., 1998, 2000; Cousins et al., 2000). Caprine paratuberculosis (CP) predominantly results from infection of goats with cattle-adapted strains of MAP (Cousins et al., 2000; Whittington et al., 2000). OP and CP cause morbidity, mortality and production losses in flocks and first were recognized in Greece in 1969 (Leontides et al., 1975).

Perhaps because case definitions and tests differed, the literature on the fertility effects of MAP in cattle are inconsistent; detrimental effects were found by Merkal et al. (1975), Buergelt and Duncan (1978), Abbas et al. (1983) and Johnson-Ifearulundu et al. (2000), but no association was found by DeLisle and Milestone (1989) and McNab et al. (1991a). In addition to the variable results across diagnostic techniques and case definitions, Nielsen et al. (2002c) found a modification of serological results by parity and stage of lactation.

Because there are no studies looking at these in small ruminants we designed this cross-sectional study. Our purpose was to evaluate the association of MAP-infection with the delivery of full-term live lambs or kids during the lambing/kidding season before sampling.

2. Materials and methods

2.1. Population under study

Four sheep and goat flocks, with sizes ranging from 250 to 350 animals, were selected for this study, which was part of a larger study designed to evaluate the role of wildlife in the epidemiology of paratuberculosis in small ruminants. To fulfil the tasks of the larger study the owners of these flocks agreed to permit close monitoring (every other day) and intensive sampling (carried out by two of us, PK and MF) for 2 consecutive years (2001–2002). All flocks had a history of clinical paratuberculosis and vaccination against MAP had never been applied. According to the responsible practising veterinarian, the incidence of chronic recurring diarrhoea, as an indication of the incidence of clinical paratuberculosis was <10% (one flock), 10–30% (two flocks) and >30% (one flock). Ewes and goats were of various domestic breeds (e.g. Chios, Karagouniko, *Capra prisca*) or their crosses; no flock had a distinct breed pattern. The animals were kept under semi-intensive management for milk production, which was the primary breeding goal. The farmers selected replacements among the daughters of high-yielding ewes and goats. The males bought into the flocks originated from high-yielding animals from other flocks. The general husbandry of the flocks was similar. The animals grazed on pasture throughout most of the year and

were additionally fed concentrates. They spent most of the day outside and were moved into the shed during the night. They were mated to rams or bucks, in an unsupervised manner, in June–August and delivered from November to January of the following year. The lambs and kids were weaned 45–60 day after birth; subsequently ewes and goats were hand-milked. Milking was ceased abruptly when the stockman felt that the milk yield was so reduced that it did not pay off the milking routine and the extra feeding. In these flocks the mean lactation length, the average yearly yield and the mean number of live offspring per bred animal was 180 day, 160 kg and 1.4 lambs/kids, respectively. The annual replacement risk was 20%, which was the same as the culling risk because the farmers received subsidies on the basis of flock size.

2.2. Sampling strategy

One hundred clinically healthy animals with no sign of paratuberculosis (chronic or intermittent diarrhea or loss of weight that was unresponsive to anthelmintic or antimicrobial treatment) from each flock were randomly selected (from the flocks' registry using a computer-generated list) for sampling, after excluding animals that were <1.5 years of age. Given a Type-I error of 5% and Type-II error of 20%, and assuming an intra-flock correlation coefficient (ICC) for the incidence of animals failing to produce an offspring of 0.01, the objective was to detect a minimum difference in fertility percentages between sub-clinically infected and not infected individuals of 15%. This low ICC value, which measures the among-flock variation, was felt to be valid because the breeding and nutritional management of the flocks was similar and because there was neither variation in the control of brucellosis (for a review of the National Brucellosis Control Program see [Minas et al., 2004](#)) nor difference in the seroprevalence of *Chlamydophila abortus* among the flocks; the latter two are the leading infectious causes of reproductive failure in Greek sheep and goats (unpublished data). Using the method described by [Campbell et al. \(2004\)](#), the required sample size was one hundred animals in each of four clusters leading to a total of 400. Data from dairy cows suggested that the sensitivity of serological testing was optimized towards the end of the lactation period while the specificity remained constant ([Nielsen et al., 2002c](#)). Therefore, sampling of the animals was done during April and May 2002. From each sampled animal approximately 10 ml of blood and 10 g of feces from the rectum were collected. At the same time, individual animal data regarding species, age, parity and fertility status were also obtained. An animal was recorded as being fertile if it gave birth to live offspring(s) the previous lambing/kidding season (November 2001 to January 2002) or being otherwise infertile.

2.3. Testing

Serum samples were tested for antibodies to MAP via the commercial IDEXX ELISA kit¹ using the manufacturer's recommended protocol ([Sockett et al., 1992](#)). Feces were cultured following a slight modification of a protocol described in recent studies ([Greig et al., 1999](#)). Briefly, 1–2 g of feces were homogenized for 30–60 min in 10 ml of sterile

¹ IDEXX Laboratories, Portland, ME.

distilled water using a Colworth Stomacher 80 (Seward Medical). Homogenates were then decontaminated by adding 10 ml of 1.5% hexadecyl pyridinium chloride (Sigma–Aldrich) and left to stand overnight at room temperature. The resulting supernatants were centrifuged at 3080 rpm for 20 min at 4 °C, and each pellet was re-suspended into 10 ml of sterile distilled water. The centrifugation step was repeated, and each pellet was re-suspended into 1 ml of sterile distilled water. Suspensions were then transferred to microcentrifuge tubes and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min at room temperature. The pellets were re-suspended in 0.5 ml of sterile distilled water. A sample of 0.1 ml of each suspension was then inoculated onto two slopes of Herrold's egg-yolk medium supplemented with mycobactin J and antibiotics (Becton Dickinson product code: 222233). The cultures were incubated at 37 °C for up to 30 weeks and examined biweekly for bacterial growth. To confirm the identity of colonies grown, DNA from the colonies was extracted and screened for the presence of the MAP-specific insertion sequence IS900 (Green et al., 1989). The author responsible for the bacteriological examination (MF) was unaware of the results of the serological examination.

Latent-class models, where conditional independence of the test outcomes was assumed (Nielsen et al., 2002b), were used to determine the Se and Sp of the ELISA (Se_{ELISA} and Sp_{ELISA}) and of the fecal culture (Se_{FC} and Sp_{FC}), separately in sheep and goats. The estimated Se_{ELISA} , Sp_{ELISA} , Se_{FC} and Sp_{FC} and the associated 95% credible intervals were 39% (17–67%), 98.5% (94–99%), 19% (5–41%) and 97% (94–99%) in sheep and 64% (43–83%), 94% (89–97%), 11% (4–21%) and 98% (95–99%) in goats, respectively. The estimates were obtained by a Bayesian method (Johnson et al., 2001). The same priors, which were derived from the literature summarized in Table 1, were used for both species. Because the literature regarding Se was inconsistent, a non-informative uniform prior distribution on the range from 0 to 1 was chosen for tests' Se. Informative priors (in the form of beta distributions, $Be(a,b)$) were chosen for Sp because the literature consistently agreed that Sp of the methods was high for cattle, sheep and goats. Based on the available literature for cattle, sheep and goats (Table 1), the most probable value of Sp_{ELISA} was determined to be 0.95, while we were 95% sure that it was more than 0.90. The Be with mode 0.95 and 5th percentile 0.90 is $Be(100,5.5)$. The most probable value of Sp_{FC} was 0.98, and it was thought to be at least 0.95 with 95% certainty. This corresponded to a $Be(100,2)$.

2.4. Statistical analysis

An animal was considered sub-clinically infected when found either seropositive or culture positive. Rogan–Gladen estimates of the true prevalence (TP) of sub-clinically infected animals were calculated separately for sheep and goats using the observed prevalence of sub-clinically infected animals (AP) and the sensitivity (Se_p) and specificity (Sp_p) of the parallel testing by the equation $TP = (AP + Sp_p - 1)/(Se_p + Sp_p - 1)$ (Rogan and Gladen, 1978). The Se_p and Sp_p of the parallel testing, assuming conditional independence of the Se and Sp of the tests used, were estimated as: $Se_p = 1 - (1 - Se_{ELISA}) \times (1 - Se_{FC})$ and $Sp_p = Sp_{ELISA} \times Sp_{FC}$ (Gardner et al., 2000).

The animal was the unit of concern. Because of the contagious nature of OP and CP and reported associations with management and nutritional factors (Lugton, 2004) and therefore, the likely positive correlation in the diagnostic results of animals from the same

Table 1

Published estimates of the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the serum ELISA and the fecal culture (FC) for the diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection in cattle, sheep and goats

Reference	Species	ELISA	FC
Collins et al. (1991), Ridge et al. (1991), McNab et al. (1991b)	Cattle	Se ~ 45% Sp > 90%	– –
Nielsen et al. (2002b)	Cattle	Se = 27–86%, Sp = 55–98%	Se = 20–73% Sp > 98%
Sockett et al. (1992)	Cattle	Se = 47–65% –	Se = 45–73% Sp > 99%
Sweeney et al. (1995)	Cattle	Se = 15–87%	–
Whitlock et al. (2000)	Cattle	Se = 15–75% –	Se = 42% Sp > 99%
Sergeant et al. (2003)	Sheep	Se = 25–73%; 10–47% Sp > 95%	– –
Whittington et al. (2003), Hilbink et al. (1994)	Sheep	– Sp > 97%	– –
Hope et al. (2000)	Sheep	Se = 35–54% Sp = 98.2–99.5%	– –
Dubash et al. (1995)	Sheep	Se = 48% Sp = 95%	– –
Rajukumar et al. (2001)	Goats	Se > 75% Sp > 90%	– –
Molina et al. (1991)	Goats	Se > 85% Sp > 93%	– –

flock there was a priori concern for variability in the AP – and hence the TP – proportions in excess of the binomial variance. Thus, we estimated the intra-flock correlation coefficient (ICC) and evaluated its significance at the 5% level as proposed by Lui (2004). We estimated, subsequently, a variance-inflation factor (VIF), based on the significant ICC, with the following formula: $VIF = \sum_i m_i [1 + ICC(m_i - 1)] / m.$, where m_i is the i th flock sample size and $m. = \sum_i m_i$, and multiplied the VIF with the simple binomial variance to obtain the adjusted variance VAR_{AP} for AP and calculated the 95% confidence interval as $AP \pm 1.96 \times VAR_{AP}^{1/2}$ (Lui, 2004). The adjusted variance of TP was estimated as $VAR_{TP} = VAR_{AP} / J^2$ where $J = Sp_p + Se_p - 1$. The 95% confidence for TP was calculated as $TP \pm 1.96 \times VAR_{TP}^{1/2}$ (Greiner and Gardner, 2000).

The association between fertility and sub-clinical MAP-infection was modeled using the GLIMMIX macro in SAS[®]. The data were hierarchically structured, meaning that one would expect that the variation between flocks was larger than the variation within flocks. Therefore, multi-level logistic regression models with flock as random-effect term were fitted. The outcome of interest was the fertility status of each animal. Initially, each fixed-effect variable was offered to the model one by one. Age and parity were highly correlated ($r = 0.9$, $P < 0.001$) and the least significant of them (age) was not further considered. The validity of the assumption of linearity of parity in the logit scale was graphically assessed as

proposed by Hosmer and Lemeshow (1989). The effect of animal species was non-significant. Then, the variables that were significant at $P = 25\%$ (parity and sub-clinical infection) in the initial screening were simultaneously offered to the model. Their first-order interaction was included and tested for significance ($P < 0.05$) with the likelihood-ratio (LR) test. It was significant and was retained in the model. To improve the interpretability of this model without compromising its fit to the data we investigated the results from a series of CONTRAST statements at every parity value. Based on these, parity was categorized into three groups with the first including animals in parities 1–3, the second animals in parities 4–6 and the last animals in parities >6 and the model was re-fitted. The fit of this model was not significantly different from the one with parity as continuous variable (LR χ^2 2 d.f. = 2.3, $P = 0.3$). The fit of the final model to the data was checked by evaluating whether the ratio between the Pearson's Chi-square statistic and the model's degrees of freedom was close to 1 (Witte et al., 2000). Odds ratios and 95% confidence intervals for each parity group were obtained using the appropriate ESTIMATE statements.

Lastly, the adjusted attributable fraction, which is interpreted as the proportion by which the prevalence of animals failing to produce live offsprings is reduced if the whole population is hypothesized to attain the same risk of disease as the animals without sub-clinical paratuberculosis, and its respective 95% confidence interval was estimated as described by Lui (2001, 2004).

3. Results

Parity data were not recorded for 31 animals that were recently purchased by the producers. These animals were excluded from the analysis. Eighteen of 173 sheep and 58/196 goats were sub-clinically infected. In sheep, eight were only FC positive, nine were only ELISA positive and one was positive in both tests. In goats, 7 were only FC positive, 49 were only ELISA positive and 2 were positive in both tests. Thirty-three sheep and 34 goats failed to produce a live offspring the season before sampling.

The observed prevalence of sub-clinically infected animals was 10.4% (95% CI: 3.6–17.2%) and 29.7% (13.6–45.6%) in sheep and goats, respectively. The observed distribution of sub-clinically infected and not infected animals by parity is in Table 2. Se_p

Table 2

The sub-clinically MAP-infected and not-infected Greek dairy sheep and goats from four flocks in April–May 2002 by live lambing/kidding in the previous season (November 2001 to January 2002)

Lambd or kidded the previous season	Parity	Total number of animals	% Sub-clinically infected
Yes	<4	138	23.2
	4–6	111	20.7
	>6	53	20.7
No	<4	41	7.3
	4–6	21	14.3
	>6	5	80.0

Table 3

The logistic regression model of the association between producing a live offspring in the previous season (yes = code 1 vs. no offspring = code 0) and sub-clinical MAP-infection in Greek dairy sheep and goats

Parity	Sub-clinical infection	Odds ratio	95% CI	P-value
<4	No	1	–	0.007
	Yes	5.4	1.5–13.3	
4–6	No	1	–	0.80
	Yes	1.2	0.3–4.5	
>6	No	1	–	0.004
	Yes	0.05	0.007–0.4	

Pearson's Chi-square = 338, d.f. = 358.

and Sp_p were calculated as 51 and 96% in sheep and 68 and 92% in goats, respectively. The true prevalence of sub-clinically infected animals was estimated as 14% (0.1–28%) and 35.9% (9.2–62.7%) in sheep and goats, respectively.

The fertility of sheep and goats was associated with sub-clinical paratuberculosis but the effect was modified by parity. The ICC was 0.1 and the random-effect term was significant (LR χ^2 3 d.f. = 88, $P < 0.0001$). In Table 3 the final model is summarized. Animals of low parity (parity <4) were more likely to be fertile when sub-clinically infected than non-infected. Animals of parities >6 were more likely to fail to produce a live offspring when sub-clinically infected than non-infected. If the latter animals were not infected, one should have expected 19% (13.5–65.4%) more live births from this age group in the lambing/kidding season before sampling.

4. Discussion

This study was part of a larger study aiming to identify whether there is a key-role of wildlife, interfacing with farmed small ruminants, in the epidemiology of paratuberculosis (European Union Contract Number QLK2-CT-2001-00879). To this end, four flocks with clinical disease, which was diagnostically verified before the beginning of the study, were intensively monitored for 2 years. The flock-owners were informed on the study's tasks and accepted that two of the authors (PK and MF) would visit their flock sheds to trap wildlife every second day in 2001 and 2002. The monitoring did not interfere with the routine management or affected management decision in any way, but the quality of the data recorded and analyzed in this paper was high. The semi-intensive management of these flocks was similar to that of the majority of Greek sheep and goat flocks. We have, therefore, no grounds to believe that our results cannot be generalized to the largest proportion of the Greek population of small ruminants.

The Rogan–Gladen estimates of the true prevalence of sub-clinically infected animals were considerably higher than the observed prevalences. This was expected because both serology and culture have high Sp but lack Se in sub-clinically infected dairy ewes and goats (Kostoulas et al., unpublished data). Our definition of sub-clinically infected animals included the parallel interpretation of the results of two tests that measure two different and

independent characteristics of the infection with MAP, fecal shedding of MAP and humoral response (primarily IgG1 and IgG2) to MAP (Whittington and Sergeant, 2001). Their concurrent use was recently advocated to improve the diagnostic sensitivity of the testing procedure in moderately infected cow-populations (Nielsen, 2002a). There are biologic grounds to explain the lack of Se of either test and the subsequent lack of Se of the parallel interpretation. Animals with culture-positive results were assumed to be infected and incubating clinical disease; this assumption usually but not always is valid because there might exist rare cases of bacteria passing through the gastro-intestinal tract of uninfected animals (Sweeney et al., 1992). Shedding of MAP, however, from sub-clinically infected animals is intermittent and, at least in cattle, the organism can be unevenly distributed within the feces, contributing to false-negative cultures or the perception that shedding is intermittent (Whittington and Sergeant, 2001). The biologic grounds for the ELISA shortcomings are based on the pathogenetic and immunological paradigm which states that upon infection through oral uptake of MAP, the bacteria are taken up in the ileum by M-cells and transferred to sub- and intra-epithelial macrophages (Momotani et al., 1988). With the phagocytosis of the bacteria by macrophages two main immunological responses can occur: the cell-mediated T_H1 -lymphocyte dominated reaction or the humoral T_H2 -lymphocyte dominated reaction (Waters, 2001; Nielsen, 2002a). The two types of immune responses are essentially in an equilibrium in which the factors determining dominance are not quite understood. Initially, the cell-mediated immune reaction dominates and the immune system is able to control the infection, keeping the number of MAP, if not eliminated, at a low level in the infected animal (Schorey et al., 1997). During the cell-mediated immune response the humoral response with production of antibodies is depressed (Chiodini, 1996). The events leading to the shift from the T_H1 - to the T_H2 -lymphocyte dominance are largely unknown, but it is generally thought that once T_H2 -dominance has occurred, the reaction does not reverse again (Waters, 2001). With T_H2 -dominance, lesions which initially were confined to ileal Peyer's patches progress to diffuse granulomatous enteritis with marked thickening of the intestine and many mycobacteria in the macrophages in the granulomas (Perez et al., 1996; Corpa et al., 2000). The timing of the shift in the type of the immunological response is unknown. Also unknown is the age-related susceptibility to MAP-infection of sheep and goats since it has not been investigated thoroughly in species other than cattle (Chiodini and Davis, 1993; Wyatt et al., 1994). All of the above suggest misclassification of infected animals as uninfected ones. We believe that this inaccuracy would have been random across fertility status. Such random misclassification reduces the precision of the analytical results and consequently the strength of the observed associations is diminished.

The finding that young animals, of parities <4 , are more likely to be fertile when sub-clinically infected than non-infected appears, at first glance, difficult to explain. Infection with MAP can be easy to establish with low doses (Sweeney et al., 1992; Whittington and Sergeant, 2001) and most young animals in a contaminated environment develop an intestinal infection. Depending on factors including dose, the young animals either clear this infection or develop persistent intestinal infection with minimal histological reaction. Immune regulation during pregnancy, as a means of not rejecting the embryo, seems to favor proliferation of infection and seroconversion of animals that got infected when still very young. Luppi (2003), who reviewed the immune mechanisms during pregnancy in

humans, reported suppression of T-cell activity during pregnancy to be the basis of the increased susceptibility to viral infections and to specific intracellular pathogens, such as *Listeria*, that survive phagocytosis by monocytes. Conversely, B-cell function and antibody production to vaccinations were normal during pregnancy. These suggest that the maternal immune system, when activated, is more likely to respond with antibody and less likely to respond with activated T-cells. In line with these, [Avelino et al. \(2003\)](#) found that pregnancy was a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion, another important intracellular pathogen in human medicine. [Entrican \(2002\)](#) extensively reviewed the immune regulation mechanisms during pregnancy and the host–pathogen interactions in animals. He concluded that progesterone favors the development of T_H2-lymphocytes. Moreover, [Feola et al. \(1999\)](#) found that prolactin and growth hormone diminish the ability of bovine macrophages to control intracellular MAP growth in vitro, the effect being greater when the hormones were removed after 5 days of culture. Consequently, one may assume that fluctuations in circulating levels of these hormones occurring during parturition and lactation might make phagocytes permissive for the intracellular growth of MAP. In support of this assumption, the last authors observed increased intracellular multiplication of MAP in vitro in monocytes taken from a cow during the periparturient period.

Culling sheep at a younger age might be one way to reduce losses due to OP through lesser contamination of pastures and by truncation of the opportunity for disease expression in older animals ([Sergeant and Whittington, 2000](#)). In an Australian cross-sectional study of factors associated with the incidence of clinical OP, delayed culling of aged animals was associated with higher incidence of death due to OP ([Lugton, 2004](#)). However, culling at an older age is rarely practiced where there is difficulty producing flock replacements or an excess of young sheep are culled. Because the studied flocks were affected with clinical paratuberculosis for many years, the farmers were experienced and well able to recognize affected animals that were prematurely slaughtered and retained in the flock older animals to keep the total flock size fairly stable. This practice might have introduced a selection bias that affected our potential for demonstrating an association between infection and fertility in medium-parity animals.

Animals sub-clinically infected might be at an increased risk of being in negative energy balance due to reduced intestinal absorption of nutrients. The granulomatous enteritis and mucosal thickening that are characteristic of paratuberculosis result in a malabsorption syndrome with a protein losing enteropathy ([Kreeger, 1991](#)). It has not been determined whether the intestinal lesions in the sub-clinically infected animal reduce intestinal function sufficiently to cause a negative energy balance. Nonetheless, cows that have even a mild reduction in the intestinal function due to sub-clinical enteritis are at an increased risk of severe negative energy balance during the early post-partum to peak-lactation period ([Johnson-Ifearulundu et al., 2000](#)). In early post-partum cows, milk production takes priority over reproduction ([Lucy et al., 1992](#)). These factors eventually lead to a prolonged anovulatory period and hence into delayed ovarian resumption ([Beam and Butler, 1997](#); [Stagg et al., 1998](#); [Roche and Diskin, 2001](#)). In sheep and goats the typical period of risk for negative energy balance, the early post-partum period, coincides with the anestrous season and therefore no direct effect on reproductive indices should be expected. However, they lose body condition near the end of lactation—despite

supplements. After drying-off, the animals are moved to natural pastures. The breeding season commences at late June when vegetation is poor due to the hot and dry Greek summer. It can be, therefore, hypothesized that when at pastures, the consumed energy has to be split between physical activity and maintenance. This might expose the animals to a negative energy balance condition (even mild), which is further exacerbated by the MAP-caused malabsorption.

The cross-sectional nature of the study design could not ensure that the animals failing to produce offspring were indeed infected prior to the time for which their fertility was assessed. However, the short period between the breeding season and testing and the known long incubation before serological reaction to or shedding of MAP makes this assumption plausible. The results from this study can be used as a basis for developing more focused research aimed at clarifying the causal relationships. Parity seems to be an important effect modifier of the relation between fertility and sub-clinical paratuberculosis in dairy ewes and goats and has to be taken into account in the interpretation of this association. Parity modifies the relationship between seropositivity to MAP and the shape of lactation curves in dairy cows (Nielsen et al., 2002c; Kudahl et al., 2004).

5. Conclusion

Our results indicate that parity modifies the association between sub-clinical MAP-infection and live lambing/kidding. There are biological grounds to support these findings. The distribution of parity should be accounted for when interpreting associations between sub-clinical MAP-infection and reproduction indices of sheep or goat flocks.

Acknowledgement

This work was partly supported by a European Union-funded project with Contract Number QLK2-CT-2001-00879.

References

- Abbas, B., Riemann, H.P., Hird, D.W., 1983. Diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in northern California and a note on its economic significance. *Calif. Vet.* 8, 20–24.
- Avelino, M.M., Campos, D.J., do Carmo Barbosa de Parada, J., de Castro, A.M., 2003. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 108, 19–24.
- Beam, S.W., Butler, W.R., 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56, 133–142.
- Buergelt, C.D., Duncan, J.R., 1978. Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173, 478–480.
- Campbell, M.K., Thomson, S., Ramsay, C.R., MacLennan, G.S., Grimshaw, J.M., 2004. Sample size calculator for cluster randomized trials. *Comput. Biol. Med.* 34, 113–125.
- Chiodini, R.J., Davis, W.C., 1993. The cellular immunology of bovine paratuberculosis: immunity may be regulated by cd4+ helper and cd8+ immunoregulatory t lymphocytes which down-regulate gamma/delta+ t-cell cytotoxicity. *Microb. Pathog.* 14, 355–367.

- Chiodini, R.J., 1996. Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 313–343.
- Collins, M.T., Sockett, D.C., Ridge, S., Cox, J.C., 1991. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 29, 272–276.
- Corpa, J.M., Garrido, J., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255–265.
- Cousins, D.V., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J., 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using IS900 RFLP. *Aust. Vet. J.* 78, 184–190.
- DeLisle, G.W., Milestone, B.A., 1989. The economic impact of Johne's disease in New Zealand. In: Milner, A.R., Wood, P.R. (Eds.), *Johne's Disease, Current Trends in Research, Diagnosis and Management*. CSIRO, Victoria, Australia, pp. 41–45.
- Dubash, K., Shulaw, W.P., Bech-Nielsen, S., Stills H.F.Jr., Slemmons, R.D., 1995. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay licensed by the USDA for use in cattle for diagnosis of ovine paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 347–351.
- Entrican, G., 2002. Immune regulation during pregnancy and host–pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Pathol.* 126, 79–94.
- Feola, R.P., Collins, M.T., Czuprynski, C.J., 1999. Hormonal modulation of phagocytosis and intracellular growth of *Mycobacterium avium* ss. paratuberculosis in bovine peripheral blood monocytes. *Microb. Pathog.* 26, 1–11.
- Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev. Vet. Med.* 45, 107–122.
- Green, E.P., Tizard, M.L., Moss, M.T., Thompson, J., Winterbourne, D.J., McFadden, J.J., Hermon-Taylor, J., 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17, 9063–9073.
- Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M.E., McKendrick, I., Sharp, J.M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1746–1751.
- Greiner, M., Gardner, I.A., 2000. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev. Vet. Med.* 45, 43–59.
- Hilbink, F., West, D.M., de Lisle, G.W., Kittelberger, R., Hosie, B.D., Hutton, J., Cooke, M.M., Penrose, M., 1994. Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet. Microbiol.* 41, 107–116.
- Hope, A.F., Kluver, P.F., Jones, S.L., Condron, R.J., 2000. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 78, 850–856.
- Hosmer Jr., D.W., Lemeshow, S., 1989. *Applied Logistic Regression*. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Johnson, W.O., Gastwirth, J.L., Pearson, L.M., 2001. Screening without a gold standard: the Hui-Walter paradigm revisited. *Am. J. Epidemiol.* 153, 921–924.
- Johnson-Ifearulundu, Y.J., Kaneene, J.B., Sprecher, D.J., Gardiner, J.C., Lloyd, J.W., 2000. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 46, 171–181.
- Kreeger, J.M., 1991. Ruminant paratuberculosis—a century of progress and frustration. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 373–383.
- Kudahl, A., Nielsen, S.S., Sorensen, J.T., 2004. Relationship between antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in milk and shape of lactation curves. *Prev. Vet. Med.* 62, 119–134.
- Leontides, S., Tomopoulos, D., Christopoulos, C., Tsangaris, T., Exarhopoulos, G., 1975. Paratuberculosis (Johne's disease) in goats in Greece. In: *Proceedings of the XXth World Veterinary Congress, Thessaloniki, Greece*, pp. 1426–1428.
- Lucy, M.C., Staples, C.R., Thatcher, W.W., Erickson, P.S., Cleale, R.M., Firkins, J.L., Clark, J.H., Murphy, M.R., Brodie, B.O., 1992. Influence of diet composition, dry matter intake, milk production and energy balance on time of postpartum ovulation and fertility in dairy cows. *Anim. Prod.* 54, 323–331.
- Lugton, I.W., 2004. Cross-sectional study of risk factors for the clinical expression of ovine Johne's disease in New South Wales farms. *Aust. Vet. J.* 82, 355–365.
- Lui, K.J., 2001. Notes on interval estimation of the attributable risk in cross sectional sampling. *Stat. Med.* 20, 2051–2056.

- Lui, K.J., 2004. Statistical Estimation of Epidemiological Risk. John Wiley and Sons, New York, pp. 133–136.
- Luppi, P., 2003. How immune mechanisms are affected by pregnancy. *Vaccine* 21, 3352–3357.
- Merkal, R.S., Larsen, A.B., Booth, G.D., 1975. Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 36, 837–838.
- McNab, W.B., Meek, A.H., Martin, S.W., Duncan, J.R., 1991a. Associations between dairy production indices and lipoarabinomannan enzyme-immunoassay results for paratuberculosis. *Can. J. Vet. Res.* 55, 356–361.
- McNab, W.B., Meek, A.H., Duncan, J.R., Brooks, B.W., Van Dreumel, A.A., Martin, S.W., Nielsen, K.H., Sugden, E.A., Turcotte, C., 1991b. An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Can. J. Vet. Res.* 55, 252–259.
- Minas, A., Minas, M., Stournara, A., Tselepidis, S., 2004. The “effects” of Rev-1 vaccination of sheep and goats on human brucellosis in Greece. *Prev. Vet. Med.* 64, 41–47.
- Molina, A., Morera, L., Llanes, D., 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Am. J. Vet. Res.* 52, 863–868.
- Momotani, E., Whipple, D.L., Thiermann, A.B., Cheville, N.F., 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer’s patches in calves. *Vet. Pathol.* 25, 131–137.
- Nielsen, S.S., 2002a. Paratuberculosis in Danish dairy cattle—interpretation of diagnostic information depending on purpose and disease stage. PhD Thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, pp. 138.
- Nielsen, S.S., Grønbaek, C., Agger, J.F., Houe, H., 2002b. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 53, 191–204.
- Nielsen, S.S., Grohn, Y.T., Enevoldsen, C., 2002c. Variation of the milk antibody response to paratuberculosis in naturally infected dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85, 2795–2802.
- Perez, V., Garcia Marin, J.F., Badiola, J.J., 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114, 107–122.
- Rajukumar, K., Tripathi, B.N., Kurade, N.P., Parihar, N.S., 2001. An enzyme-linked immunosorbent assay using immunoaffinity-purified antigen in the diagnosis of caprine paratuberculosis and its comparison with conventional ELISA’s. *Vet. Res. Comm.* 25, 539–553.
- Ridge, S.E., Morgan, I.R., Sockett, D.C., Collins, M.T., Condron, R.J., Skilbeck, N.W., Webber, J.J., 1991. Comparison of the Johne’s absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne’s disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 68, 253–257.
- Roche, J.F., Diskin, M.G., 2001. Resumption of reproductive activity in the early postpartum period of cows. In: Proceedings of the Conference on Fertility in the High Producing Cow. BSAS Occas. Publ. 26, 31–42.
- Rogan, W.J., Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 107, 71–76.
- Schorey, J.S., Carroll, M.C., Brown, E.J., 1997. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 277, 1091–1093.
- Sergeant, E., Whittington, R.J., 2000. A modified Reed-Frost model for the spread of ovine Johne’s disease within a recently infected flock. In: Proceedings of the Ninth Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Breckenridge, pp. 593–595.
- Sergeant, E.S., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C., Whittington, R.J., 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61, 235–248.
- Socket, C.D., Conrad, A.T., Thomas, B.C., Collins, T.M., 1992. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1134–1139.
- Stagg, K., Spicer, L.J., Sreenan, J.M., Roche, J.F., Diskin, M.G., 1998. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. *Biol. Reprod.* 59, 777–783.
- Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Hamir, A.N., Rosenberger, A.E., Herr, S.A., 1992. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1312–1314.
- Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L., Spencer, P.A., 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 488–493.
- Waters, W.R., 2001. Immunology of inflammatory diseases of the bowel. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17, 517–534.

- Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77, 387–398.
- Whittington, R.J., Eamens, G.J., Cousins, D.V., 2003. Specificity of absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion tests for paratuberculosis in goats with observations about use of these tests in infected goats. *Aust. Vet. J.* 81, 71–75.
- Whittington, R.J., Marsh, I., Choy, E., Cousins, D.V., 1998. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. paratuberculosis, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cell. Probes* 12, 349–358.
- Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., Marsh, I., 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3240–3248.
- Whittington, R.J., Sergeant, E.S.G., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in animal populations. *Aust. Vet. J.* 79, 267–278.
- Witte, J.S., Greenland, S., Kim, L.L., Arab, L., 2000. Multilevel modelling in epidemiology with GLIMMIX. *Epidemiology* 11, 684–688.
- Wyatt, C.R., Madruga, C., Cluff, C., Parish, S., Hamilton, M.J., Goff, W., Davis, W.C., 1994. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 40, 187–199.