



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE TRÊS
TESTES DIAGNÓSTICOS PARA VIGILÂNCIA DA
BRUCELOSE BOVINA EM AMOSTRAS DE LEITE
DE TANQUE**

MIKAEL ARRAIS HODON

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

ABRIL/2023



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE TRÊS
TESTES DIAGNÓSTICOS PARA VIGILÂNCIA DA
BRUCELOSE BOVINA EM AMOSTRAS DE LEITE
DE TANQUE**

MIKAEL ARRAIS HODON

ORIENTADOR: VÍTOR SALVADOR PICÃO GONÇALVES

CO-ORIENTADOR: PAULO MARTINS SOARES FILHO

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA PREVENTIVA E PATOLOGIA VETERINÁRIA

**LINHA DE PESQUISA: EPIDEMIOLOGIA, PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS
ANIMAIS E GESTÃO DOS RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA**

BRASÍLIA/DF



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE TRÊS TESTES
DIAGNÓSTICOS PARA VIGILÂNCIA DA BRUCELOSE BOVINA
EM AMOSTRAS DE LEITE DE TANQUE**

MIKAEL ARRAIS HODON

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADA POR:

VITOR SALVADOR PICÃO GONÇALVES, Prof. Dr. (UnB)
(ORIENTADOR)

JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES, Prof. Dr. (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)

MARCOS BRYAN HEINEMANN, Prof. Dr. (USP)
(EXAMINADOR EXTERNO)

ELAINE MARIA SELES DORNELES, Prof^a. Dra (UFLA)
(EXAMINADORA EXTERNA)

BRASÍLIA/DF, 28 DE ABRIL DE 2023.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

HODON, M.A. Avaliação de Desempenho de Três Testes Diagnósticos para Vigilância da Brucelose Bovina em Amostras de Leite de Tanque. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2023, 47 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, que foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

À minha querida esposa, Carla, e aos nossos queridos filhos, Caio e Davi. Por eles, tudo vale a pena.

Aos meus pais, por terem me dado todas as condições, sempre com amor e torcida incondicionais, para que eu pudesse percorrer todo o caminho e chegar até aqui.

Às minhas lindas irmãs, Pâmela e Alana, que mesmo distantes fisicamente, sempre se mantiveram presentes, me dando apoio e carinho.

Ao meu chefe, colega de laboratório e coorientador, Dr. Paulo Martins Soares Filho. Sem ele, este trabalho não teria nem sido iniciado. Muito obrigado por todo apoio, conversas e incentivos, além da compreensão em todos os momentos. Não consigo expressar em palavras o respeito e admiração que tenho por você.

Ao meu orientador, prof. Vitor Gonçalves, que me apresentou a epidemiologia na graduação, me acolheu como seu orientado de TCC e me inspirou a seguir profissionalmente na área de saúde pública. Mais tarde, também me recebeu como aluno de mestrado e apostou que eu poderia avançar para o doutorado. Sua amizade e compreensão foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui, apesar de todos os percalços.

À minha amiga Karina e a todos os colegas da CIDASC e demais envolvidos na árdua tarefa de se obter as amostras, além da execução do Teste do Anel em Leite – TAL. Somente quem já teve que executar este tipo de missão sabe o quanto custa. Nem um lote todo de doces de leite demonstraria o quanto sou grato por tudo que fizeram por este trabalho.

Aos colegas da CGAL e do LFDA-MG, desde os superiores que me autorizaram a realizar o trabalho até todos aqueles que me ajudaram nas diversas etapas. Um agradecimento especial aos meus colegas da bacteriologia (DDB), Lú, Pat e Paulo. Me desculpem pela ausência neste período!

Ao “meu patrão” Leandro, com quem sempre pude contar e foi um dos meus maiores incentivadores, sempre.

Às minhas amigas do grupo de carona, Andrea, Patrícia e Ana Cláudia. Nossas conversas diárias ao longo das idas e vindas ao trabalho foram cruciais para me manter motivado e seguir firme até o fim.

Aos colegas do Epiplan, coordenados pela Ana, que me receberam de braços abertos e com quem pude aprender muito, mesmo estando distante. As experiências que tive nos breves períodos

que pude ficar no laboratório, certamente foram enriquecedoras e vou guardar nossas conversas e trocas de experiências para sempre no coração.

A todos os professores que me formaram, da alfabetização até aqui. Muito obrigado cada segundo que se dedicaram a me transmitir seus ensinamentos.

Aos meus fiéis amigos e companheiros, os cavalos, especialmente Kingo, Triviatta e Malikah. Com eles, em diversas oportunidades, pude recarregar as baterias para conseguir seguir em frente.

Ao MAPA por proporcionar aos seus servidores a participação em programas de aperfeiçoamento, permitindo que melhores serviços sejam prestados em benefício da sociedade.

Ao PPGSA da UnB, pela oportunidade e apoio.

À Andréa e à IDEXX pelo apoio e por acreditarem no trabalho.

Aos “Carcarás”, “Zaquarestas”, amigos do enduro, demais familiares e todos aqueles que torceram. Toda a energia positiva foi recebida e muito bem-vinda!

Por fim, agradeço a Deus por guiar meus passos e estar sempre me acompanhando nesta jornada da vida.

EPÍGRAFE

“É junto dos b̃ao que a gente fica mió!”
Guimarães Rosa (Grande Sertão: Veredas)

RESUMO

A brucelose bovina é uma zoonose de grande impacto econômico e na saúde pública. No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi criado em 2001 com os objetivos específicos de reduzir a prevalência e a incidência de novos focos de brucelose e tuberculose e de promover a certificação de propriedades livres de brucelose e tuberculose ou monitoradas para tais doenças e que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário. Após mais de uma década da criação do PNCEBT, novas estratégias foram traçadas e passou a ser necessário implementar sistemas de vigilância epidemiológica ativa para identificar focos normalmente não-detectados por sinais clínicos ou por ações rotineiras de controle. Em rebanhos leiteiros, os testes aplicados em leite de tanque também podem se constituir em ferramentas adequadas a esse propósito, desde que previamente validados para a finalidade a que se destinam. Estes testes apresentam vantagens como baixo custo, facilidade de coleta de amostras e rapidez na obtenção dos resultados. No presente estudo, foram avaliados os desempenhos de três testes diagnósticos para brucelose bovina em amostras de leite de tanque: teste do anel em leite (TAL), o ELISA Brucellosis Antibody Test Kit – Tank Milk IDEXX (i-ELISA) e uma qPCR desenvolvido pelo LFDA-MG (PCR). Foram obtidas 187 amostras de leite de tanque, oriundas de rebanhos classificados como livres (103) e de rebanhos classificados como focos (84), todos localizados no estado de Santa Catarina. Os parâmetros de interesse, sensibilidade e especificidade de cada teste, foram estimados por modelo Bayesiano de classe latente para duas populações e três testes diagnósticos, sendo dois deles correlacionados - ELISA e TAL. As estimativas a posteriori para os parâmetros foram informadas com 95% de credibilidade. O i-ELISA apresentou sensibilidade (Se) igual a 0,90 [ICr 95%0,73 - 0,99] e especificidade (Sp) igual a 0,99 [ICr 95% 0,95 – 1,0]. O TAL apresentou Se igual a 0,82 [ICr 95% 0,68 – 0,93] e Sp igual a 0,84 [ICr 95% 0,77 – 0,90]. Por fim, a qPCR apresentou Se igual a 0,01 [ICr 95%0,0 – 0,05] e Sp igual a 0,97 [ICr 95%0,93 – 0,99]. Os resultados deste estudo indicam que o i-ELISA seria a ferramenta de eleição para vigilância de brucelose bovina usando amostras de leite de tanques, em razão de ter sensibilidade semelhante e especificidade superior à do TAL, sendo este uma alternativa aceitável ao iELISA. A qPCR avaliada neste estudo não seria adequada como ferramenta de detecção de rebanhos infectados devido a sua sensibilidade muito baixa.

Palavras-chave: brucelose bovina; leite de tanque; i-ELISA; teste do anel em leite; qPCR; validação de testes; modelos de classe latente

ABSTRACT

Bovine brucellosis is a zoonosis of great economic and public health impact. In Brazil, the National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT) was created in 2001, with the specific objectives of reducing the prevalence and incidence of new outbreaks of brucellosis and tuberculosis and promoting the certification of properties free of brucellosis and tuberculosis and that would offer the consumer products of low health risk. After more than a decade of the creation of the PNCEBT, new strategies were devised, and it became necessary to implement active epidemiological surveillance systems to identify foci normally undetected by clinical signs or by routine control actions. In dairy herds, the tests applied to tank milk can also be appropriate for this purpose, provided that they are previously validated for the purpose for which they are intended. These tests have advantages such as low cost, ease of sample collection and speed in obtaining results. In the present study, the performance of three diagnostic tests for bovine brucellosis in tank milk samples from Santa Catarina (SC) were evaluated: milk ring test (TAL), the ELISA Brucellosis Antibody Test Kit – Tank Milk IDEXX (i-ELISA) and a qPCR developed by the LFDA-MG (PCR). A total of 187 tank milk samples were obtained from herds classified as Free (103) and from herds classified as Infected/Positive (84), all located in the state of Santa Catarina. The data obtained were tabulated and the parameters of interest, sensitivity and specificity of each test, were estimated by a Bayesian latent class model, for two populations and three diagnostic tests, two of them correlated - ELISA and TAL. The posterior estimates for the parameters were reported with 95% credibility. The i-ELISA yielded a sensitivity (Se) of 0.9 [0.73 - 0.99] and specificity (Sp) of 0.99 [0.95 - 1.0]. The TAL presented Se of 0.82 [0.68 - 0.93] and Sp of 0.84 [0.77 - 0.9]. Finally, the Se of qPCR was equal to 0.01 [0.0 - 0.05] and the Sp was 0.97 [0.93 - 0.99]. The results of this study indicate that i-ELISA would be the test of choice for surveillance of bovine brucellosis using samples from milk tanks, given that its sensitivity is identical and the specificity is higher than the measured performance of TAL. The latter is a good alternative for surveillance purposes. The qPCR evaluated in this study would not be adequate as a tool for detecting infected herds.

Key-words: bovine brucellosis; herd test in milk from tanks; i-ELISA; milk ring test; qPCR; test validation; latent class models

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo 2	
Tabela 1. Relação dos iniciadores e sonda de hibridização usados na PCR em tempo real para detecção de <i>Brucella abortus</i> em leite cru.	39
Tabela 2 - Protocolos de tempo e temperatura utilizados nos ensaios de qPCR para detecção de <i>Brucella abortus</i> em leite cru.	40
Tabela 3. Concentração e volume dos componentes utilizados no master mix para reação de PCR em Tempo Real para detecção de <i>Brucella abortus</i> em leite cru.	40
Tabela 4. Parâmetros para interpretação dos resultados - ELISA Brucellosis Antibody Test Kit – Tank Milk IDEXX	41
Tabela 5. Resultados da PCR, do ELISA e do TAL em amostras de leite de tanque de rebanhos classificados como Livre, no estado de Santa Catarina.	42
Tabela 6. Resultados da PCR, do ELISA e do TAL em amostras de leite de tanque de rebanhos classificados como Foco, no estado de Santa Catarina.	43
Tabela 7 – Estimativa dos parâmetros de desempenho da PCR, do ELISA e do TAL em amostras de leite de tanque de rebanhos classificados como Livre e rebanhos classificados como Foco, no estado de Santa Catarina	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo 1	
Figura 1. Participação das regiões na produção de leite no Brasil em 2020 (IBGE).	22
Figura 2. TAL – negativo e positivo (arquivo pessoal).	25
Figura 3. Representação esquemática de uma prova de i-ELISA (Google images).	26
Figura 4. Colônias de <i>Brucella abortus</i> isoladas (arquivo pessoal).	27
Figura 5. Representação de reações de amplificação de uma qPCR (arquivo pessoal)	29
Capítulo 2	
Figura 1. Localização das propriedades livres de onde as amostras de leite de tanque foram coletadas no estado de Santa Catarina – Brasil (CIDASC).	38
Figura 2. Localização das propriedades focos de onde as amostras de leite de tanque foram coletadas no estado de Santa Catarina – Brasil (CIDASC).	38

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	15
Capítulo 1- DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE BOVINA A PARTIR DE LEITE DE TANQUE	16
Resumo	16
Introdução	17
Técnicas utilizadas no diagnóstico de brucelose em leite	21
Recomendações e Conclusão	25
Referências	26
Capítulo 2- AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE TRÊS TESTES DIAGNÓSTICOS PARA VIGILÂNCIA DA BRUCELOSE BOVINA EM AMOSTRAS DE LEITE DE TANQUE	29
Resumo	29
Introdução	30
Materiais e Métodos	33
Resultados	38
Discussão	41
Conclusão	42
Referências	42
ANEXO	48

INTRODUÇÃO

Este trabalho avaliou o desempenho de três testes para diagnóstico de brucelose bovina a partir da matriz leite, de modo a oferecer ao PNCEBT alternativas de uso destes para a vigilância de rebanhos a partir de amostras de leite de tanque. Os testes avaliados foram o Teste do Anel em Leite (TAL), o ELISA Brucellosis Antibody Test Kit – Tank Milk IDEXX e uma PCR em tempo real (qPCR). No capítulo 1 foi apresentada uma breve contextualização, mostrando a importância da cadeia produtiva do leite, dos riscos da transmissão da brucelose por este alimento e a importância da vigilância desta enfermidade no sentido de se detectar o maior número de focos da doença utilizando esta matriz. Em seguida foram apresentadas as técnicas utilizadas em diversos estudos para o diagnóstico de brucelose a partir do leite, descrevendo seus princípios, vantagens e desvantagens. Foi apresentada também a importância da avaliação de qualquer teste diagnóstico nas condições de uso a que estes se destinam, conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA), antes de sua utilização. No capítulo 2, após breve introdução, foi descrita toda a metodologia utilizada na avaliação dos três testes, desde a amostragem até a análise dos dados gerados por metodologia Bayesiana, seguida da apresentação dos resultados alcançados e discussão. O trabalho demonstrou que tanto o ELISA como o TAL podem ser utilizados no diagnóstico de brucelose em amostras de leite de tanque, sendo o ELISA aquele que apresentou o melhor desempenho, devido a sua maior especificidade em relação ao TAL. Por fim, a partir dos resultados encontrados, é oferecido ao PNCEBT alternativas validadas para vigilância em rebanhos leiteiros, o que certamente contribuirá no controle e erradicação da brucelose no país.

Capítulo 1

DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE BOVINA A PARTIR DE LEITE DE TANQUE

Resumo

O leite é um dos seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira. Conforme levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção nacional de leite chegou a 35,4 bilhões de litros em 2020, com um aumento de 1,5% em relação ao ano anterior, sendo esse o maior volume já registrado na pesquisa. Entretanto, a composição do leite e produtos lácteos, ricos em nutrientes, propicia também a sobrevivência de diversos microrganismos patogênicos envolvidos em casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em seres humanos. A *Brucella abortus*, causadora da brucelose bovina, é um patógeno frequentemente transmitido por meio do consumo de leite cru e derivados lácteos para seres humanos. Além das consequências para a saúde humana, levando à incapacidade parcial ou total ao trabalho dos acometidos, em bovinos, a brucelose traz grandes prejuízos para a produção animal, devido ao elevado número de abortos, nascimento de bezerros fracos e baixa fertilidade nos rebanhos. No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), necessita implementar sistema de vigilância epidemiológica ativa para identificar e sanear focos normalmente não detectados por sinais clínicos ou por ações rotineiras de controle. Um meio eficiente de realizar essa triagem em rebanhos leiteiros é testar o leite do tanque. Apenas o Teste do Anel em Leite (TAL) está aprovado pelo PNCEBT para triagem na matriz leite, de bovinos. Na literatura, outros testes também têm esta indicação, como ELISA indireto (i-ELISA), polarização fluorescente (FPA), reação em cadeia da polimerase (PCR), além do isolamento e identificação do agente. Os diversos testes utilizados para o diagnóstico da brucelose têm sido avaliados quanto ao propósito a que se destinam no país ou região onde serão utilizados. Deste modo, para que novos testes possam ser adotados pelo PNCEBT, estudos de análise de desempenho devem ser conduzidos nas diversas condições epidemiológicas existentes no Brasil, e assim possam ser incorporados a ações de controle e erradicação da brucelose no Brasil, pelo PNCEBT.

Introdução

O leite é um dos seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, constituindo-se como importante fonte de geração de emprego e renda para a população em todas as regiões do país (DE MORAES, 2020).

Nas últimas três décadas, a produção mundial de leite aumentou mais de 50%, chegando a 769 milhões de toneladas em 2013 (DE MORAES, 2020). Conforme levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção nacional de leite chegou a 35,4 bilhões de litros em 2020, com um aumento de 1,5% em relação ao ano anterior, sendo esse o maior volume já registrado na pesquisa. O efetivo de vacas ordenhadas foi de 16,2 milhões de cabeças, 0,8% menor que o de 2019. A Região Sudeste, com alta de 1,9%, liderou pelo segundo ano consecutivo esse segmento, com 34,3% de participação, ao produzir 12,2 bilhões de litros de leite. A Região Sul permaneceu em segundo lugar, respondendo por 34,0% do total nacional, ao produzir 12,1 bilhões de litros de leite. A Região Nordeste apresentou-se em terceiro lugar na produção nacional leiteira, ao obter um crescimento de 1,9% em sua produção, totalizando 4,9 bilhões de litros de leite. Minas Gerais seguiu como o Estado com o maior volume de leite produzido, 9,7 bilhões de litros de leite, sendo responsável por 27,3% da quantidade total – registrando aumento de 2,6% em relação a 2019 –, sendo naturalmente o principal responsável pelo maior desempenho da Região Sudeste. O estado de Santa Catarina aparece entre os 5 principais produtores de leite, com 3,04 bilhões de litros produzidos, sendo responsável por 8,72% do total produzido no país. (IBGE, 2020).

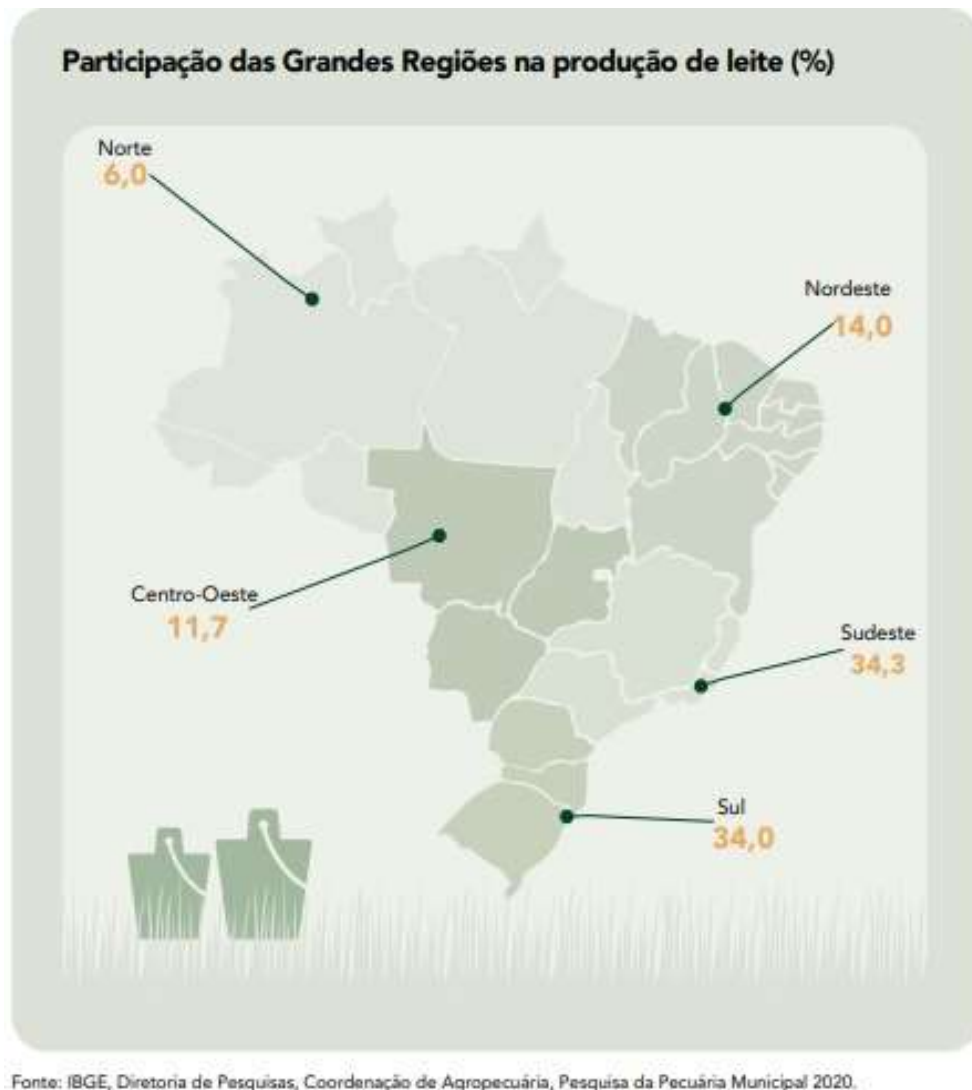


Figura 1. Participação das regiões na produção de leite no Brasil em 2020 (IBGE).

O leite é um alimento altamente nutritivo para seres humanos, sendo fonte de proteínas, gordura, carboidratos, vitaminas e minerais, podendo ser obtido de diferentes espécies de animais como vacas, cabras, ovelhas, búfalas, camelas e éguas (CLAEYS et al., 2014). Entretanto, a composição do leite e produtos lácteos, ricos em nutrientes, propicia também a sobrevivência de diversos microrganismos patogênicos envolvidos em casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em seres humanos, com ocorrência de diversas condições clínicas e mortalidade (TAUXE et al., 2010).

Entre os organismos citados, a *Brucella abortus*. é um patógeno frequentemente transmitido por meio do consumo de leite cru e derivados lácteos para seres humanos (MUSSI, 2018). Nestes, as principais manifestações clínicas da brucelose humana são febre recorrente, fraqueza, dores musculares, distúrbios nervosos e sudorese, o que acaba por levar à

incapacidade parcial ou total ao trabalho (SOLA et. al., 2014; CARVALHO et al, 2016). Em bovinos, a brucelose quase sempre é causada pela *Brucella abortus* (SOLA et. al., 2014), tendo como consequências principalmente aborto e retenção de placenta em fêmeas, além de lesões no trato reprodutivo de machos (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006).

A brucelose é uma importante zoonose com distribuição mundial (OMSA, 2016). A ocorrência de brucelose bovina em um país ou região pode resultar em perdas econômicas significativas, como a imposição de barreiras sanitárias e tarifárias ao comércio internacional de produtos de origem animal, além de prejuízos envolvendo a produção animal, devido ao elevado número de abortos, nascimento de bezeros fracos, baixa fertilidade nas propriedades rurais e, principalmente, ao declínio na produção de leite e carne (SANTOS et al., 2013; SOLA et al., 2014).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), instituído por meio da Instrução Normativa N° 2, de 10 de janeiro de 2001, foi criado com os objetivos específicos de reduzir a prevalência e a incidência de novos focos de brucelose e tuberculose e de criar um número significativo de propriedades certificadas como livres dessas doenças ou monitoradas, e que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (BRASIL, 2017).

Para isso, diversas estratégias e ações foram criadas, entre elas a certificação de propriedades, vacinação contra brucelose de fêmeas entre 3 e 8 meses de idade, controle de trânsito de animais para reprodução, a identificação e saneamento de focos e análise de risco (BRASIL, 2017).

Após mais de uma década da criação do PNCEBT, estudos epidemiológicos demonstram que o objetivo inicial de abaixar as prevalências da brucelose e da tuberculose foi alcançado (FERREIRA NETO et al., 2016). Nesse sentido, o PNCEBT foi revisado em 2017 e novas estratégias foram adotadas, visando baixar ainda mais as prevalências com o intuito de alcançar a erradicação dessas enfermidades. Dentre essas novas estratégias, os estados passaram a ser classificados de acordo com o risco para a doença. A partir daí, necessitarão implementar sistemas de vigilância epidemiológica ativa para identificar e sanear focos normalmente não detectados por sinais clínicos ou por ações rotineiras de controle (BRASIL, 2017).

Um meio eficiente de realizar essa triagem em rebanhos leiteiros é testar o leite do tanque (OMSA, 2016), atividade que já é realizada em outros países como a Argentina

(VANZINI et al, 2001), Bélgica (KERKHOF, 1990) e Inglaterra (FODDAI, 2020). O teste mais utilizado para esta finalidade é o teste do anel em leite (TAL). Além dele, outros testes também têm esta indicação como ELISA indireto (iELISA), polarização fluorescente (FPA), reação em cadeia da polimerase (PCR), além do isolamento e identificação agente. Por se tratarem de testes de triagem de rebanho, exceto o isolamento e a identificação do agente que são testes confirmatórios, um resultado positivo é considerado indicativo da presença da enfermidade naquele rebanho, portanto deve ser seguido de teste sorológico individual em todos os animais do rebanho para confirmação do achado no leite do tanque (SANTOS et al., 2013).

No Brasil apenas o TAL está aprovado pelo PNCEBT para triagem na matriz leite, de bovinos. De acordo com o Art. 29. da IN nº 10, DE 3 DE MARÇO DE 2017, o Teste do Anel em Leite poderá ser utilizado pelo serviço veterinário oficial ou por médico veterinário habilitado, para monitoramento de estabelecimentos, ou para outros fins, segundo critérios estabelecidos pelo serviço veterinário oficial. Entretanto, na mesma Instrução Normativa é prevista a utilização de outros testes diretos e indiretos de diagnóstico para brucelose para complementar ou substituir os testes especificados nessa norma, após aprovação e nas condições estabelecidas pelo DSA (BRASIL, 2017). Este foi o caso de Santa Catarina, que por meio da Portaria SAR no 44/2020, de 16/12/2020, estabeleceu as técnicas de diagnóstico por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e pelo TAL como testes oficiais para a vigilância da brucelose em amostras de leite nesse estado.

O PNCEBT necessitará de sistema de vigilância ativa que permita identificar e rastrear o maior número de focos possível, a um baixo custo e com confiabilidade de resultados. Em rebanhos leiteiros, os testes aplicados em leite de tanque podem se constituir em ferramentas adequadas a esse propósito, desde que previamente validados.

Ressalta-se que, seguindo as recomendações da Organização Mundial da Saúde Animal (OMSA / WAHO), testes utilizados para o diagnóstico da brucelose têm sido avaliados quanto ao propósito a que se destinam no país ou região onde serão utilizados (OMSA, 2013). Assim, o desenvolvimento de metodologias para avaliação de métodos diagnósticos se mostra ferramenta importante no acompanhamento de qualquer diagnóstico feito por programas que visem controlar ou erradicar qualquer doença. Para isso, devem ser empregadas metodologias adequadas de modo que sejam gerados parâmetros de validação confiáveis (REITSMA et al., 2009; MATOPE et al., 2011). Para que novos testes possam ser adotados pelo PNCEBT, estudos de análise de desempenho devem ser conduzidos nas diversas condições

epidemiológicas existentes no Brasil, dada a diversidade encontrada nos sistemas produtivos do leite e as diferentes prevalências da brucelose no país, para que os objetivos propostos com o uso destes testes sejam devidamente alcançados.

Técnicas utilizadas no diagnóstico de brucelose em leite

O TAL é um teste que pode ser usado como triagem de rebanhos para brucelose. Este teste tem a finalidade de detectar aglutininas anti-brucelas no leite. Em grandes rebanhos (> 100 vacas em lactação), a sensibilidade do teste pode ser comprometida devido ao fator de diluição destas amostras. Deste modo, o TAL pode ser ajustado para compensar o fator de diluição, de acordo com o tamanho do rebanho (OMSA, 2016). Ademais, podem ocorrer reações falso-positivas em bovinos vacinados menos de 4 meses antes do teste, em amostras de colostro, leite de transição ou em casos de mastite. Portanto, não é recomendado usar este teste em fazendas muito pequenas, onde esses problemas têm um impacto maior nos resultados (OMSA, 2016).

A presença de anticorpos anti-brucela no leite é evidenciada pela reação dos mesmos com as células de *B. abortus* do antígeno, formando uma malha de complexo antígeno-anticorpo que será arrastada pelos glóbulos de gordura para a superfície do leite, e formação de um anel azulado na camada de creme do leite (reação positiva) – Fig.2. Não existindo anticorpos no leite, o anel de creme será de coloração branca e o restante do leite presente no tubo de ensaio permanecerá azulado, reação negativa (OLIVEIRA, 2014) – Fig.2.



Figura 2. Resultados negativo e positivo em teste do anel em leite (TAL) (fonte: arquivo pessoal).

O ELISA indireto (i-ELISA) em leite é um teste recomendado para triagem de rebanhos pela WAHO (OMSA, 2016). Vários i-ELISAs comerciais estão disponíveis, os quais foram validados em testes de campo e estão em uso em outros países (KAMWINE et al., 2017; VANZINI et al., 2001). De uma forma geral, no i-ELISA o antígeno, aderido a uma fase sólida (placa de ELISA) recebe as amostras em teste, na busca por anticorpos contra o antígeno específico (quase sempre o LPS ou algum outro componente da membrana externa da bactéria). Se houver anticorpos específicos contra o antígeno aderido na fase sólida, ocorrerá a ligação antígeno-anticorpo, que posteriormente é detectada pela adição de um segundo anticorpo, conjugado à enzima peroxidase. Ao adicionar-se o substrato apropriado para a enzima, a reação positiva é detectada pela mudança de coloração do substrato nos orifícios onde ocorreu a reação antígeno-anticorpo – Fig. 3.

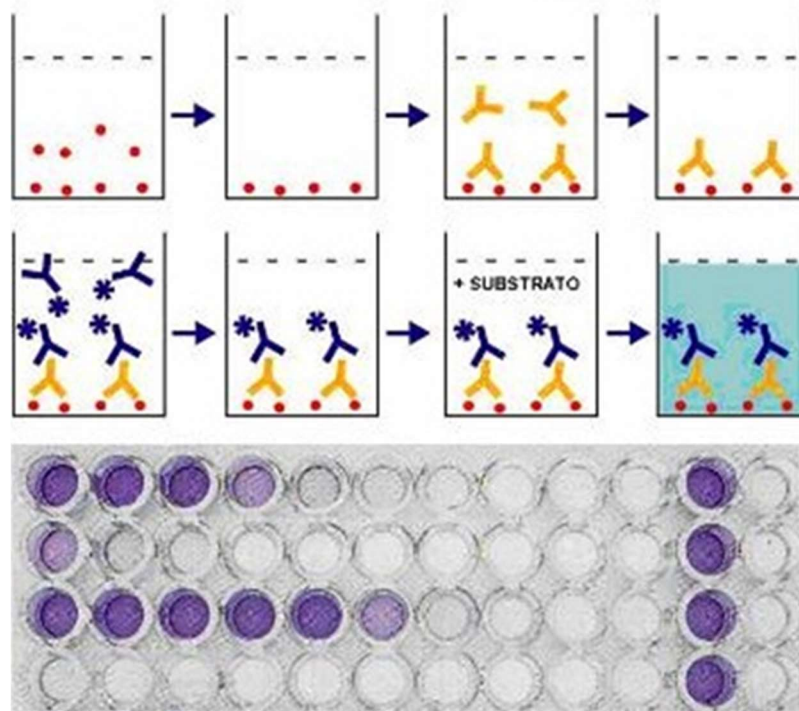


Figura 3. Representação esquemática de uma prova de i-ELISA (fonte: Google images).

A polarização fluorescente (FPA) é outro teste aplicado ao leite, desenvolvido para detecção de anticorpos anti *B. abortus* em amostras de soro e plasma sanguíneos, sangue total e leite de tanque a granel (GALL, 2002). A FPA é baseada no desvio da luz polarizada emitida por uma molécula fluorescente (fluoróforo). A medição do desvio da luz nos planos paralelos

e perpendiculares devido à excitação do fluoróforo permite a avaliação da rotação das moléculas marcadas, que é dependente basicamente da taxa de rotação destas, e é inversamente proporcional ao seu tamanho (NASIR e JOLLEY, 1999). Assim, a rotação de uma molécula fluorescente conjugada à cadeia O de brucella diminuirá se houver reação mediada por anticorpos anti-LPS de brucella, em relação às moléculas de LPS e fluoróforo não ligadas a anticorpos específicos (McGIVEN, 2003). Portanto, uma molécula maior desviará menos a luz do seu plano original de polarização. Este desvio é convertido por um equipamento de leitura de luz polarizada em unidades de milipolarizações (mP). Não se tem notícia da adoção deste teste como rotina de vigilância da brucelose em leite de tanque ainda.

Além dos testes indiretos citados, uma ferramenta importante para todo programa de controle e erradicação da brucelose é o isolamento e identificação do agente, assim como o uso de técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (GERESU, 2016).

O isolamento da bactéria é considerado o método padrão ouro para o diagnóstico da brucelose por ser específico e permitir a biotipagem e genotipagem dos isolados, o que é relevante do ponto de vista epidemiológico por permitir identificar os biótipos e genótipos das bactérias circulantes no país (GERESU, 2016). No entanto, *Brucella* spp. é uma bactéria fastidiosa e requer meios de cultura ricos e seletivos para o seu isolamento. Além disso, seu isolamento requer um grande número de bactérias viáveis em amostras clínicas, armazenamento adequado e entrega rápida ao laboratório de diagnóstico (GERESU, 2016). Outro fator limitante para o cultivo de *Brucella* spp. é o requisito para condições laboratoriais e treinamento de pessoal para que o procedimento possa ser realizado com segurança, visto que esse microrganismo é classificado como nível 3 de biossegurança (GERESU, 2016). Dentre outras situações, seu uso é indicado como diagnóstico definitivo em casos nos quais há suspeita da doença e a prevalência é muito baixa, devido a sua alta especificidade (100% ou muito próximo disso) – Fig.4.



Figura 4. Colônias de *Brucella abortus* isoladas em ágar triptose.

Métodos moleculares têm sido explorados a fim de superar estas dificuldades inerentes ao isolamento e identificação do agente, notadamente custos, requisitos de biossegurança e tempo de execução das provas. A PCR baseia-se na amplificação de sequências genômicas específicas do gênero, espécie ou mesmo biótipo de *Brucella* spp., e pode ser utilizada tanto para o diagnóstico, a partir de espécimes clínicos, quanto para a identificação do agente, a partir de colônias suspeitas – Fig. 5. Além disso, os ensaios baseados em PCR possuem uma maior sensibilidade em relação ao ensaio microbiológico padrão para o diagnóstico de brucelose (GERESU, 2016). Diversas PCRs têm sido padronizadas e testadas para uso no diagnóstico a partir de leite, com diferentes desempenhos clínicos tendo sido alcançados e reportados (BRICKER, 2002; DADAR, 2019; NING, 2012; O'LEARY, 2006; MASCARENHAS, 2017).

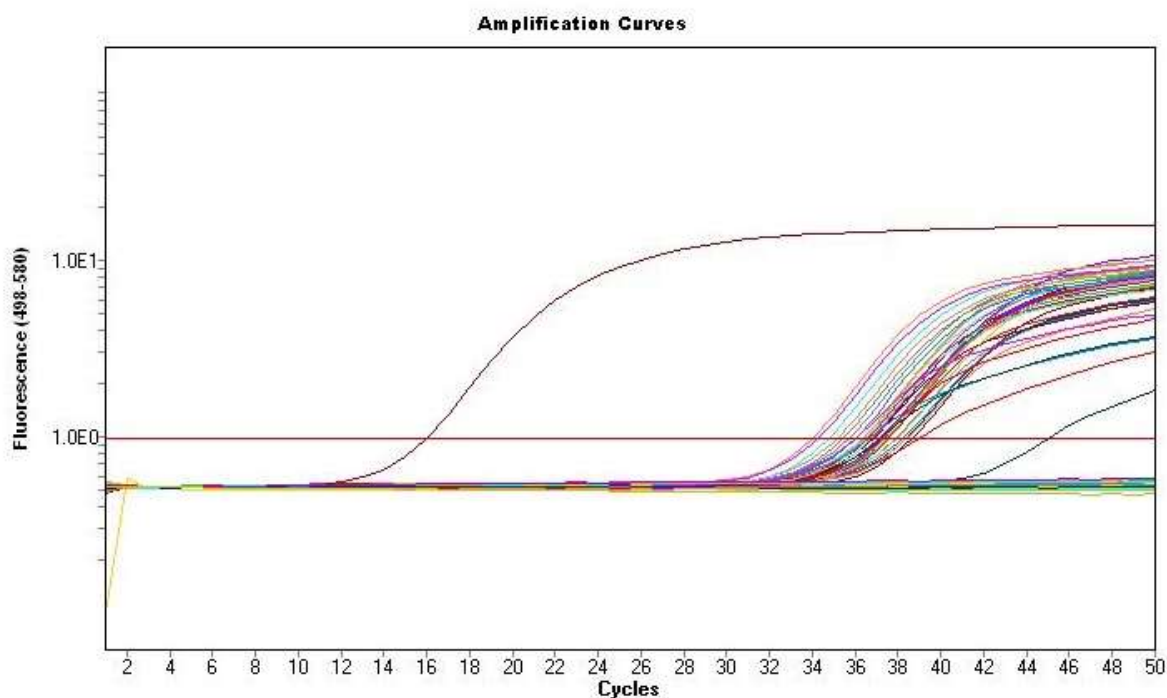


Figura 5. Curvas de amplificação de PCR em tempo real representando reações de amplificação do material genético do agente específico (fonte: arquivo pessoal)

Recomendações e Conclusão

O PNCEBT necessitará de sistema de vigilância ativa que permita identificar e rastrear o maior número de focos possível, a um baixo custo e com confiabilidade de resultados. Em rebanhos leiteiros, os testes aplicados em leite de tanque podem se constituir em ferramentas adequadas a esse propósito, desde que previamente validados.

Ressalta-se que, seguindo as recomendações da Organização Mundial da Saúde Animal (OMSA / WAHO), testes utilizados para o diagnóstico da brucelose têm sido avaliados quanto ao propósito a que se destinam no país ou região onde serão utilizados (OMSA, 2013). Assim, o desenvolvimento de metodologias para avaliação de métodos diagnósticos se mostra ferramenta importante no acompanhamento de qualquer diagnóstico feito por programas que visem controlar ou erradicar qualquer doença. Para isso, devem ser empregadas metodologias adequadas de modo que sejam gerados parâmetros de validação confiáveis (REITSMA et al., 2009; MATOPE et al., 2011). Para que novos testes possam ser adotados pelo PNCEBT, estudos de análise de desempenho devem ser conduzidos nas diversas condições epidemiológicas existentes no Brasil, dada a diversidade encontrada no sistema produtivo do

leite e as diferentes prevalências da brucelose no país, para que os objetivos propostos com o uso destes testes sejam devidamente alcançados.

Referências

BRASIL. Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. 2006. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSA/PECEBT/MANUAL_PNCEBT.pdf>.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 90, p. 435-446, 2002.

CLAEYS, W. L.; VERRAES, C.; CARDOEN, S.; DE BLOCK, J.; HUYGHEBAERT, A.; RAES, K.; DEWETTINCK, K.; HERMAN, L. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, v. 42, p. 188–201, 2014.

CORBEL, M. J.; ELBERG, S. S.; COSIVI, O. *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: World Health Organization, p. 89 p., 2006.

DADAR, M.; SHAHALI, Y.; WHATMORE, A. M. Human brucellosis caused by raw dairy products: A review on the occurrence, major risk factors and prevention. *International Journal of Food Microbiology*, 292, p. 39-47, 2019.

DE MORAES, M.R.L.; NÓBREGA, R.de Q.; De SOUZA, C.F.; CARVALHO, I.P.P.de S.; LIMA, A.C.F.; De FIGUEIREDO, J.S.B.; SILVA, J.A.; NÓBREGA, E.da S. Atual conjuntura do setor industrial de leite: Estudo da industrialização do leite no Brasil e no Nordeste. *Brazilian Journal of Development*, v.6, n.8, p.57085-57095, 2020.

FERREIRA NETO, J. S.; SILVEIRA, G. B.; ROSA, BARBARA MEDEIROS GONÇALVES, V. S. P.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; LAGE, A. P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, p. 3385, 2016.

FODDAI, A.; KELLY, L.; MCGIVEN, J.; GRACE, K.; EVANS, S.; Quantitative assessment of the probability of introducing bovine brucellosis into English cattle herds by imported live cattle, *Microbial Risk Analysis*, Volume 16, 2020.

GALL, D.; NIELSEN, K.; BERMUDEZ, M.R.; MORENO, F.; SMITH, P. Fluorescence polarization assay for detection of brucella abortus antibodies in bulk tank bovine milk samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.9, n.6, p. 1356-1360, 2002.

GERESU, M.A.; KASSA, G.M. A review on diagnostic methods of brucellosis of brucellosis. *Veterinary Science and Technology*, v.7:323, 2016.

IBGE. Produção da pecuária municipal 2020. Rio de Janeiro, v.48, p.1-12, 2020.

JOHNSON, O. W.; JONES, G.; GARDNER, A. I.; Gold standards are out and Bayes is in: Implementing the cure for imperfect reference tests in diagnostic accuracy studies, *Preventive Veterinary Medicine*, Volume 167, Pages 113-127, 2019.

KAMWINE, M.; ORIKIRIZA, P.; TASEERA, K.; IRAMIOT, J.S.; OJUKA, P.; IKIRIZA, S.; ATWEBEMBEIRE, J.; OTIENO, D.; TWESHENGYEREZE, S.; MWANGA-AMUMPAIRE, J; BAZIRA, J.; BOUM II, Y. Prevalence of antibodies to Brucella species in commercial raw bovine milk in Southwestern Uganda, *BMC Research Notes.*, 10:215, 2017.

KERKHOF, P; BOTTON, Y; THIANGE, P; DEKEYSER, P; LIMET, J. N.; Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk, *Veterinary Microbiology*, Volume 24, Issue 1, Pages 73-80, ISSN 0378-1135, 1990.

LEITE, B.M. Aspectos epidemiológicos e econômicos da certificação de propriedades leiteiras como livres de brucelose e tuberculose bovina. Dissertação de Mestrado, Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 81 p..

MASCARENHAS, D. R.; 2017. Validação da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para detecção de *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus* em amostras de leite cru. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, MG, 94 p.

MATOPE, G.; MUMA, J.B.; TOFT, N.; GORI, E.; LUND, A.; NIELSEN, K.; SKJERVE, E.; Evaluation of sensitivity and specificity of RBT, c-ELISA and fluorescence polarization assay

for diagnosis of brucellosis in cattle using latent class analysis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 141, p. 58-63, 2011.

MCGIVEN, J.A.; TUCKER, J.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; BREW, S.D.; MACMILLAN, A.P. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *Journal of Immunological Methods*, 278, p. 171-178, 2003.

MUSSI, S.M.J. Efeito do antagonismo in vitro de bactérias ácido-láticas e da maturação na sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos tipo minas artesanal. Belo Horizonte, 2018. 149p. Tese (doutorado) Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais.

NING, P., GUO K.; XU, C.; ZHANG, C.; CHENG, Y.; CUI, H.; LIU, W.; LV, Q.; CAO, W.; ZHANG, Y. Short communication: Evaluation of *Brucella* infection of cows by PCR detection of *Brucella* DNA in raw milk. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n° 9, 2012.

O'LEARY, S.; SHEAHAN, M.; SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Research in Veterinary Science*, 81, p. 170-176, 2006.

OLIVEIRA, M.A. de. Diagnóstico de brucelose em amostras coletivas de leite bovino. Uberlândia, 2014. 90p. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia.

OMSA, 2013. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013*, Paris: World Organization for Animal Health. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf.

OMSA, 2016. Brucellosis (Chapter 2.1.4). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016*, Paris: World Organization for Animal Health. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf.

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

SANTOS, R.L.; MARTINS, T.M.; BORGES, A.M.; PAIXÃO, T.A.; Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil, *Pesq. Vet. Bras.*, v. 33, p. 759-764, 2013.

SOLA, M.C.; de FREITAS, F.A.; SENA, E.L.de S.; de MESQUITA, A.J.; Brucelose Bovina: revisão, *Enciclopédia Biosfera*, v.10, n°18, p. 686-714, 2014.

TAUXE, R. V.; DOYLE, M. P.; KUCHENMÜLLER, T.; SCHLUNDT, J.; STEIN, C. E. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, v. 139, n. SUPPL. 1, p. S16–S28, 2010.

VANZINI, V.R.; AGUIRRE, N.P.; VALENTINE, B.S.; TORIONI de ECHAIDE, S.; LUGARESI, C.I.; MARCHESINO, M.D.; Comparison of an indirect ELISA with the Brucella milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples, *Veterinary Microbiology*, v.82, p. 55-60, 2001.

Capítulo 2

AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE TRÊS TESTES DIAGNÓSTICOS PARA VIGILÂNCIA DA BRUCELOSE BOVINA EM AMOSTRAS DE LEITE DE TANQUE

Resumo

A brucelose bovina é uma zoonose de grande impacto econômico e na saúde pública. No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi criado em 2001 com os objetivos específicos de reduzir a prevalência e a incidência de novos focos de brucelose e tuberculose e de promover a certificação de propriedades livres de brucelose e tuberculose ou monitoradas para tais doenças e que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário. Após mais de uma década da criação do PNCEBT, novas estratégias foram traçadas e passou a ser necessário implementar sistemas de vigilância epidemiológica ativa para identificar focos normalmente não-detectados por sinais clínicos ou por ações rotineiras de controle. Em rebanhos leiteiros, os testes aplicados em leite de tanque também podem se constituir em ferramentas adequadas a esse propósito, desde que previamente validados para a finalidade a que se destinam. Estes testes apresentam vantagens como baixo custo, facilidade de coleta de amostras e rapidez na obtenção dos resultados. No presente estudo, foram avaliados os desempenhos de três testes diagnósticos para brucelose bovina em amostras de leite de tanque do estado de Santa Catarina (SC) - Brasil: teste do anel em leite (TAL), ELISA Brucellosis Antibody Test Kit – Tank Milk IDEXX (i-ELISA) e qPCR, desenvolvida pelo LFDA-MG (PCR). Foram obtidas 187 amostras de leite de tanque, oriundas de rebanhos classificados como livres (103) e de rebanhos classificados como foco (84). Os parâmetros de interesse, sensibilidade e especificidade de cada teste, foram estimados por modelo Bayesiano de classe latente para duas populações e três testes diagnósticos, sendo dois deles correlacionados - ELISA e TAL. As estimativas *a posteriori* para os parâmetros foram informadas com 95% de intervalo de credibilidade. O i-ELISA apresentou sensibilidade (Se) igual a 0,90 [0,73 - 0,99] e especificidade (Sp) igual a 0,99 [0,95 – 1,0]. O TAL apresentou Se igual a 0,82 [0,68 – 0,93] e Sp igual a 0,84 [0,77 – 0,9]. Por fim, a qPCR apresentou Se igual a 0,01 [0,0 – 0,05] e Sp igual a 0,97 [0,93 – 0,99]. Os resultados deste estudo indicam que o i-ELISA seria a ferramenta de eleição para vigilância de brucelose bovina usando amostras de leite de tanques devido a sua maior especificidade em relação ao TAL, sendo o TAL uma boa alternativa àquela prova devido aos valores de sensibilidade destas duas provas. A qPCR

avaliada neste estudo não seria adequada como ferramenta de detecção de rebanhos infectados por brucelose.

Introdução

A brucelose é uma zoonose de grande impacto econômico e na saúde pública (DUCROTOY, 2018), erradicada de alguns países do mundo, mas prevalente no Oriente Médio, regiões do Mediterrâneo, África subsaariana, China, Índia e América Latina. Vários países da Europa, assim como Canadá, Japão, Austrália e Nova Zelândia, são considerados livres do agente causador da doença. (WOAH, 2023; MOTA, 2016).

Em bovinos, a brucelose quase sempre é causada pela *Brucella abortus* (SOLA et. al., 2014), tendo como manifestações principalmente aborto, nascimento de crias fracas e baixa fertilidade (POESTER et al., 2006). Essas complicações levam à queda estimada de 25% na produção de leite e de carne e de 15% na produção de bezerros. Além disso, as estimativas mostram que a cada cinco vacas infectadas uma se torna permanentemente estéril (LEITE, 2012).

A ocorrência de brucelose bovina pode levar a perdas econômicas significativas, como a imposição de barreiras sanitárias e tarifárias ao comércio internacional de produtos de origem animal, além de prejuízos envolvendo a produção animal, devido ao elevado número de abortos, nascimento de bezerros fracos, baixa fertilidade nas propriedades rurais e, principalmente, ao declínio na produção de leite e carne (LEITE, 2012).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi criado em 2001 com os objetivos específicos de reduzir a prevalência e a incidência de novos focos de brucelose e tuberculose e de promover a certificação de propriedades livres de brucelose e tuberculose ou monitoradas para tais doenças e que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (MAPA, 2017). Para isso, diversas estratégias e ações foram criadas, entre elas a certificação de propriedades como livres, vacinação contra brucelose de fêmeas entre 3 e 8 meses de idade, controle de trânsito de animais para reprodução, assim como identificação e saneamento de focos e análise de risco (MAPA, 2017).

Após mais de uma década da criação do PNCEBT, estudos epidemiológicos demonstram que o objetivo inicial de reduzir as prevalências da brucelose e da tuberculose foi alcançado (MAPA, 2017). Assim, novas estratégias foram traçadas e, entre elas, os estados

passaram a ser classificados de acordo com o risco para a doença. A partir daí, passa a ser necessário implementar sistema de vigilância epidemiológica ativa para identificar e sanear focos normalmente não-detectados por sinais clínicos ou por ações rotineiras de controle (BRASIL, 2017).

A vigilância epidemiológica inclui coleta sistemática, análise e interpretação dos dados para fornecer informações e tomada de decisão. Quando se trata de vigilância em larga escala com o objetivo de erradicação, o uso de métodos sorológicos baseados na detecção de anticorpos específicos contra *Brucella* se mostra a estratégia mais amplamente utilizada (ADONE, 2013). Em rebanhos leiteiros, os testes aplicados em leite de tanque também podem se constituir em ferramentas adequadas a esse propósito (OMSA, 2016), desde que previamente validados para a finalidade a que se destinam (OMSA, 2013). Apesar da vigilância no leite já ser realizada em outros países, como na Argentina (VANZINI et al, 2001), Japão (YAMAMOTO, 2008) e Inglaterra (FODDAI, 2020), no Brasil, apenas o estado de Santa Catarina já utiliza essa estratégia. Além do teste do anel em leite (TAL), aprovado pelo PNCEBT para triagem na matriz leite de bovinos, em SC também está aprovado o uso do teste ELISA (MAPA, 2017; SANTA CATARINA, 2012; SANTA CATARINA, 2020).

O leite de tanque pode ser considerado uma boa matriz para ser usada na vigilância de brucelose em rebanhos leiteiros, visto que a coleta da amostra é simples, rápida, de baixo custo e não estressa os animais. Este modelo de vigilância é utilizado por apresentar alta sensibilidade (YAMAMOTO, 2008; FODDAI, 2022). Além disso, no Brasil existe a Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), que já faz diversas análises em todo o leite produzido formalmente, atendendo os padrões de garantia e confiabilidade de resultados definidos pelo MAPA. Deste modo, o PNCEBT poderia utilizar esse sistema, já implantado em grande parte do território nacional, para vigilância da brucelose bovina na cadeia produtiva do leite devido a boa capilaridade e cobertura de rebanhos desta rede.

O TAL é um teste que pode ser usado como triagem de rebanhos para brucelose. Em grandes rebanhos (> 100 vacas em lactação), a sensibilidade do teste pode ser comprometida devido ao fator de diluição destas amostras. Deste modo, o TAL pode ser ajustado para compensar o fator de diluição, de acordo com o tamanho do rebanho (DUCROTOY, 2018; OMSA, 2016). Ademais, podem ocorrer reações falso-positivas em amostras de colostro, leite de transição ou em casos de mastite. Portanto, não é recomendado usar este teste em fazendas muito pequenas, onde esses problemas têm um impacto maior nos resultados (OIE, 2016).

Vários I-ELISAs comerciais estão disponíveis, os quais foram validados em testes de campo e estão em uso em outras partes do mundo, como por exemplo, estudos realizados por KAMWINE et al., 2017, WANG et al., 2020 e VANZINI et al., 2001, em Uganda, China e Argentina, respectivamente.

Além dos testes indiretos citados, métodos moleculares têm sido explorados a fim de superar estas dificuldades inerentes ao isolamento e identificação do agente, notadamente custos, requisitos de biossegurança e tempo de execução das provas. A PCR baseia-se na amplificação de sequências genômicas específicas do gênero, espécie ou mesmo biótipo de *Brucella spp.*, e pode ser utilizada tanto para o diagnóstico, a partir de espécimes clínicos, quanto para a identificação do agente, a partir de colônias suspeitas. Além disso, os ensaios baseados em PCR possuem uma maior sensibilidade em relação ao ensaio microbiológico padrão para o diagnóstico de brucelose (GERESU, 2016). Diversas PCRs têm sido padronizadas e testadas para uso no diagnóstico a partir de leite, com diferentes desempenhos (BRICKER, 2002; DADAR, 2019; NING, 2012; O'LEARY, 2006).

O conhecimento do desempenho dos testes diagnósticos é a espinha dorsal de qualquer sistema de vigilância sanitária. Assim, o desenvolvimento de metodologias para avaliação de métodos diagnósticos se mostra ferramenta importante no acompanhamento de qualquer diagnóstico feito por programas que visem controlar ou erradicar qualquer doença. Para isso, devem ser empregadas metodologias adequadas de modo que sejam gerados parâmetros confiáveis, entre eles, sensibilidade e especificidade dos métodos (REITSMA et al., 2009; MATOPE et al., 2011).

A inexistência de padrão-ouro dificulta a validação clínica de métodos diagnósticos para a brucelose bovina, já que nenhum teste é 100% sensível ou específico (MUMA et al., 2007; MATOPE et al., 2011; KOSTOULAS et al., 2017). Segundo REITSMA et al. (2009), a melhor alternativa nestes casos é utilizar metodologia baseada em modelos Bayesianos de classe latente, partindo-se de informações prévias sobre os testes, conjugadas com informações geradas pelos dados coletados, que permitem estimar os valores *a posteriori* de sensibilidade e especificidade (ENØE et al. 2000).

No presente estudo, foram avaliados os desempenhos de três testes diagnósticos para brucelose bovina em amostras de leite de tanque de produtores do estado de Santa Catarina - Brasil, a fim de propor o melhor uso de cada metodologia para subsidiar a implementação de um sistema de vigilância de brucelose na cadeia produtiva do leite.

Materiais e Métodos

Foram coletadas, pela CIDASC (Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina), amostras de leite de tanque de rebanhos certificados como livres e de focos de brucelose, confirmados pela mesma agência, todos localizados no estado de Santa Catarina durante o ano de 2019.

Para que a propriedade fosse considerada como livre deveria atender aos critérios propostos pelos PNCEBT há pelo menos um ano, realização de dois testes sorológicos de rebanho negativos com resultados negativos em todos animais do rebanho elegíveis para o diagnóstico com intervalo de 6 a 12 meses, exceto a vacinação de bezerras de 3 a 8 meses de idade porque este procedimento é proibido no estado. No caso das propriedades que contribuíram para o grupo foco, o critério foi a confirmação pela CIDASC de que a propriedade estava com pelo menos um caso confirmado de brucelose, baseado nas provas sorológicas definidas pelo PNCEBT, e ser declarada oficialmente como foco pelo órgão de defesa estadual. Seja para a propriedade ser classificada como livre ou como foco, os testes realizados foram a triagem por meio do Teste do Antígeno Acidificado Tamponado e confirmação das reações positivas por soroaglutinação lenta em tubos com 2-Mercaptoetanol.

Seguindo estes critérios, foram obtidas 187 amostras de leite de tanque, oriundas de rebanhos classificados como livres (103) e de rebanhos classificados como foco (84) – Fig. 1 e 2. Devido a dificuldades de logística, mão-de-obra e identificação de rebanhos livres e infectados, a coleta foi feita de acordo com a disponibilidade dos servidores da CIDASC, assim como de alguns veterinários habilitados que se dispuseram a colaborar na coleta de material dos rebanhos inicialmente elencados para fazer parte deste trabalho, tratando-se, portanto, de amostras de conveniência.

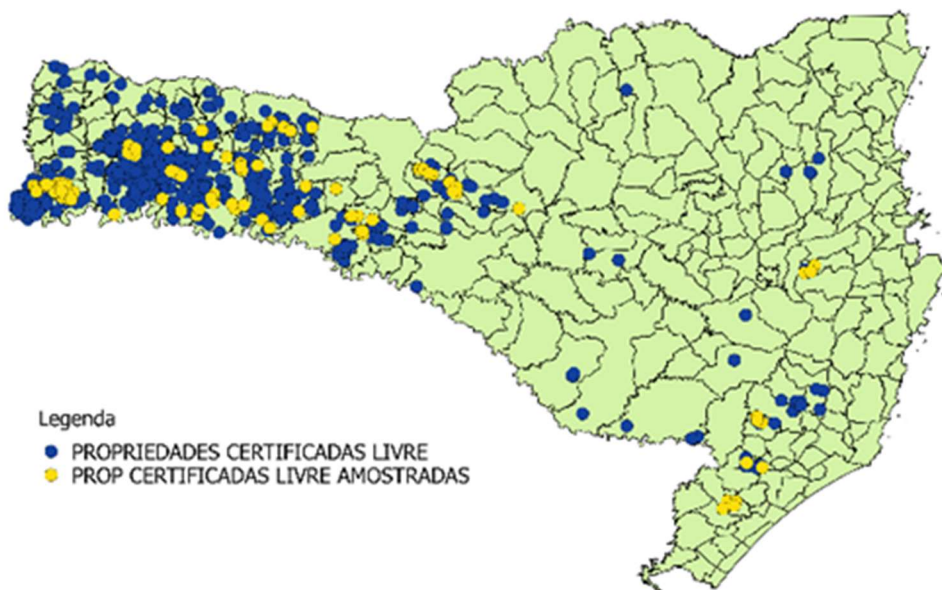


Figura 1. Localização das propriedades livres de onde as amostras de leite de tanque foram coletadas no estado de Santa Catarina – Brasil (CIDASC).

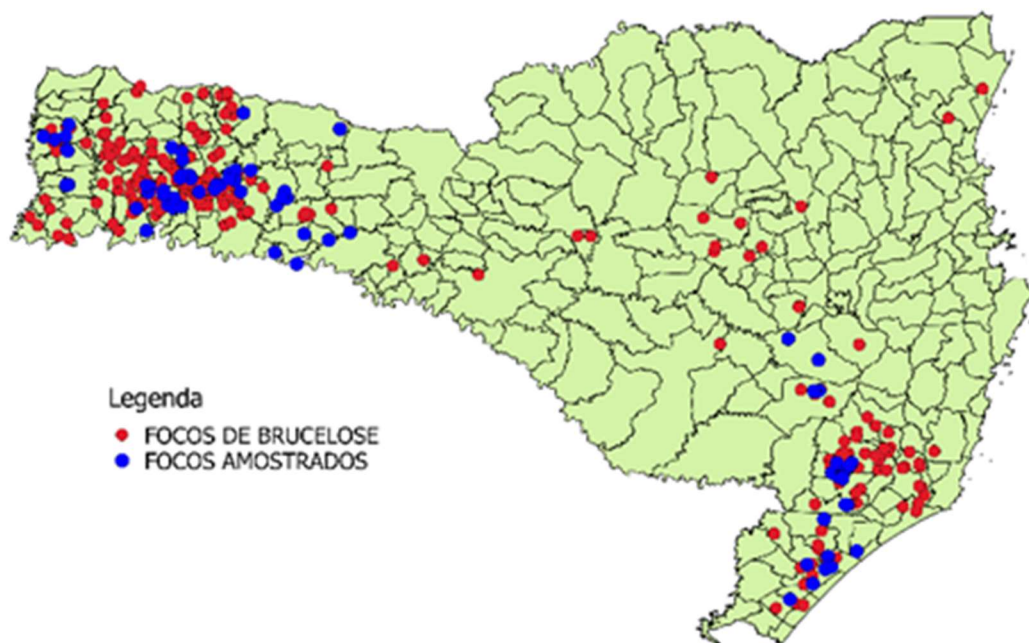


Figura 2. Localização das propriedades focos de onde as amostras de leite de tanque foram coletadas no estado de Santa Catarina – Brasil (CIDASC).

As amostras de leite foram conservadas em bronopol™ (2-bromo-2nitro-1,3-propanodiol; 8mg/40mL de leite) e mantidas sob refrigeração (2-8°C), no máximo até 5 dias após a coleta. As amostras foram homogeneizadas e distribuídas em 3 alíquotas de 2 mL cada uma, univocamente identificadas, para cada teste ser realizado de forma independente.

O TAL foi realizado na alíquota de leite refrigerado, no laboratório regional da CIDASC, localizado em Chapecó-SC, de acordo com metodologia definida por ALTON et al., (1988) e BRASIL (2017). Utilizou-se como ponto-de-corte da prova intensidade da cor do anel de gordura igual ou maior que a intensidade da cor da coluna de leite (BRASIL, 2017). As demais alíquotas de leite foram congeladas e estocadas em freezer a -20°C até que pudessem ser enviadas ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA-MG) para a realização dos demais testes.

A Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real (qPCR) foi executada conforme Mascarenhas (2017). Resumidamente, a extração de DNA foi feita com kit DNeasy Mericon Food Kit (Qiagen, Germany). O DNA extraído foi congelado a -20°C para posterior realização da PCR.

As regiões selecionadas para o diagnóstico específico de *B. abortus* foram escolhidas de acordo com as disponíveis no GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A especificidade dos primers foi previamente testada *in silico* no programa PrimerBlast (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=Blasthome) (ALTSCHUL et al., 1990), como descrito por SALES et al. (2014). Os iniciadores e as sondas para a detecção de *B. abortus* no leite cru estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Relação dos iniciadores e sonda de hibridização usados na PCR em tempo real para detecção de *Brucella abortus* em leite cru.

Iniciadores	Região alvo	Sequência de nucleotídeos	Autores
Bru.IS6501.128F	Elemento de inserção IS5601	TGGTGCTGTCAATGAGGACA	MASCARENHAS, 2017
Bru.IS6501.128R		GACCTTCGGCAAATGGACAG	

Bru.IS6501.128S		5'.FAM- CGGCGTATCAGCCAGGGGCAT -BHQ1.3'	
-----------------	--	--	--

Os protocolos de temperatura da reação foram realizados segundo as recomendações do fabricante do RealQ 2x Master Mix – Ampliqon de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 - Protocolos de tempo e temperatura utilizados nos ensaios de qPCR para detecção de *Brucella abortus* em leite cru.

Pré-ciclo	Ciclo(45x)
50°C – 2 minutos 95°C – 15 minutos	95°C – 15 segundos 60°C – 60 segundos (Fluoróforo FAM)

As quantidades e concentrações adequadas dos componentes do master mix estão listadas na tabela 3. A amostra padrão *B. abortus* 2308 (ORZIL et al., 2016) inativada foi utilizada durante todo o processo como controle positivo da reação. Todas as reações foram feitas em um termociclador LigthCycler® 480 II (Roche), com Software Release 1.5.0 SP4, os mesmos utilizados na padronização da técnica.

Tabela 3. Concentração e volume dos componentes utilizados no master mix para reação de PCR em Tempo Real para detecção de *Brucella abortus* em leite cru.

Primers	Componentes do Mix	Volume (µL)
Bru. is6501.128	Água tratada com DEPC	4,4
	Mix Ampliqon	12,5
	Iniciador F (5 pmol/ µL)	2,0
	Iniciador R (5 pmol/ µL)	2,0
	Sonda (5 pmol/ µL)	1,0
	MgCl ₂ (25 mM)	0,6
	DNA de B. abortus	2,5
	Total	25,0

Para avaliação do controle de extração do DNA e consequente validação dos resultados negativos, todas as amostras foram submetidas a uma qPCR para Beta-actina (BIELANSKY et al., 2009). Foram avaliados dois pontos de corte na reação para *Brucella abortus*: o proposto na validação analítica (30,82) e um valor médio de duas amostras de leite positivas das quais foi isolada *Brucella abortus* (34,24).

O ELISA Brucellosis Antibody Test Kit – Tank Milk IDEXX foi realizado seguindo o descrito pelo fabricante. A interpretação dos resultados se deu conforme tabela 4, tal como indicado no manual de instruções do fabricante.

Tabela 4. Parâmetros para interpretação dos resultados - ELISA Brucellosis Antibody Test Kit – Tank Milk IDEXX

negativo	suspeito	positivo
$S/P\% \leq 45\%$	$45\% \leq S/P\% < 55\%$	$S/P\% \geq 55\%$

Os testes foram realizados de forma independente, sem que os analistas soubessem a origem das amostras nem os resultados obtidos por estas nos outros testes.

Os dados obtidos foram tabulados e os parâmetros de interesse, sensibilidade e especificidade de cada teste, foram estimados por modelo Bayesiano de classe latente (BRANSCUM, 2005; MWEU et. al., 2012) para duas populações e três testes diagnósticos, sendo dois deles correlacionados -ELISA e TAL. Como o modelo utilizado atende as condições de identificabilidade, foram utilizadas prioris minimamente informativas [modelo $(\beta(1,1))$].

Além disso, foi realizada análise de sensibilidade dos modelos variando-se os hiperparâmetros das distribuições a priori para prevalência. Para isso foram testadas prioris informativas para prevalência, levando-se em conta a rígida caracterização das duas populações amostradas. As estimativas *a posteriori* para os parâmetros foram informadas com 95% de credibilidade (NITZOUFRAS, 2009).

Os modelos foram comparados pelos critérios de adequação dos modelos aos dados (Deviance Information Criterion – DIC e número de parâmetros efetivamente estimados pelo modelo – pD (BERKVENS et al., 2006). As análises foram realizadas no programa OpenBUGS (LUNN et al., 2009), sendo as primeiras 5.000 iterações descartadas na fase burn-in e as 95.000 iterações seguintes utilizadas para inferências posteriores. As iterações foram tomadas a cada 10 valores gerados pelo modelo para minimizar a ocorrência de autocorrelação. A convergência das cadeias foi avaliada por inspeção visual de gráficos e executando cadeias múltiplas a partir de valores iniciais dispersos (BERKVENS et al., 2006).

Resultados

As frequências de resultados obtidos em cada um dos testes avaliados nas amostras de rebanhos livres e focos são apresentadas nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5. Resultados da PCR, do ELISA e do TAL em amostras de leite de tanque de rebanhos classificados como livres, no estado de Santa Catarina.

Rebanhos livres				
	TAL	ELISA	PCR (CT 30,82)	Número de observações
Resultado	POS	POS	POS	0
	POS	POS	NEG	0
	POS	NEG	POS	0
	NEG	POS	POS	0
	POS	NEG	NEG	15
	NEG	NEG	POS	3
	NEG	POS	NEG	1
	NEG	NEG	NEG	84
Total				103

PCR – Reação em cadeia da polimerase, CT – treshold cycle = ponto de corte, ELISA - Ensaio imunoenzimático. TAL – Teste do anel em leite, POS – positivo, NEG – negativo

Nas amostras provenientes de rebanhos classificados como Livre, 81,55% foram negativas em todos os testes (84/103), 19 amostras foram positivas em pelo menos um teste, sendo 15 delas positivas somente no TAL, 3 somente na PCR e 1 no ELISA.

Tabela 6. Resultados da PCR, do ELISA e do TAL em amostras de leite de tanque de rebanhos classificados como Foco, no estado de Santa Catarina.

Focos				
	TAL	ELISA	PCR	Número de observações
Resultado	POS	POS	POS	0
	POS	POS	NEG	57
	POS	NEG	POS	0
	NEG	POS	POS	0
	POS	NEG	NEG	4
	NEG	NEG	POS	0
	NEG	POS	NEG	7
	NEG	NEG	NEG	16
Total				84

PCR – Reação em cadeia da polimerase, ELISA - Ensaio imunoenzimático, TAL – Teste do anel em leite, POS – positivo, NEG – negativo

Conforme apresentado na tabela 6, das 84 amostras provenientes de rebanhos declarados foco, 68 delas (80,95%) foram positivas em pelo menos um dos testes. Nenhuma amostra foi positiva em todos os três testes e 16 (19,04%) foram negativas em todos os testes.

Não houve alterações nas estimativas dos parâmetros de desempenho dos testes quando foram utilizados modelos com *prioris* informativas e não-informativas, assim como quando foi utilizado o ponto de corte 34,24 na PCR. Também não houve alteração nos parâmetros quando os resultados suspeitos de ELISA foram considerados negativos ou positivos (dados não apresentados).

A Tabela 7 apresenta as estimativas dos parâmetros de desempenho dos testes e parâmetros de avaliação do modelo 3T2P com correlação entre os testes ELISA e TAL, ponto de corte da PCR igual a 30,82 e resultados suspeitos do ELISA considerados como positivos (Anexo). Este se mostrou mais adequado ao estudo, visto que na avaliação de sensibilidade dos modelos não houve variação maior que 3 no DIC (DIC do modelo com covariância e DIC do modelo sem covariância) entre os diferentes modelos avaliados e o escolhido apresentou menor valor de Pd, o que indica melhor ajuste do modelo aos dados. Além disso, a inspeção visual das cadeias dos modelos demonstrou que houve convergência após a fase de burn-in assim como observou-se não haver autocorrelação dos dados.

Tabela 7 – Estimativa dos parâmetros de desempenho da PCR, do ELISA e do TAL em amostras de leite de tanque de rebanhos classificados como Livre e rebanhos classificados como Foco, no estado de Santa Catarina

Parâmetro	Mediana	ICr 95%
Se ELISA	0,90	0,73 – 0,99
Se PCR	0,01	0,0 – 0,05
SeTAL	0,82	0,68 – 0,93
SpELISA	0,99	0,95 – 1,0
SpPCR	0,97	0,93 – 0,99
SpTAL	0,84	0,77 – 0,90
corrDn	0,05	-0,06 – 0,29
corrDp	0,40	-0,03 – 0,74
pi1	0,01	0,0 – 0,05
pi2	0,83	0,70 – 0,99
DIC	37,88	
ρ D	4,72	

Se – sensibilidade, Sp – especificidade, corrDn – correlação dos resultados negativos, corrDp – correlação dos resultados positivos, pi – frequência de positivos, DIC – critério de informação da deviance, ρ D – medida da complexidade do modelo, pi1 – população classificada como livre, pi2 – população classificada como foco.

De acordo com os resultados apresentados, o ELISA foi o teste que apresentou o maior valor de sensibilidade, seguido do TAL e da PCR, sendo este significativamente inferior aos demais. Dentre os testes analisados, o ELISA foi o que apresentou melhor especificidade, seguido pela PCR e depois pelo TAL.

O valor médio da correlação dos resultados positivos foi 0,4 (-0,03 – 0,74) e dos resultados negativos foi 0,05 (-0,06 – 0,30) entre os testes iELISA e TAL. A frequência de positivos nas amostras do grupo 2 (0,83; ICr = 0,70 – 0,99) foi maior que nas amostras do grupo 1 (0,01; ICr = 0 – 0,05), o que era esperado dadas as características da seleção das mesmas para inclusão no estudo .

Discussão

Os resultados apresentados nas tabelas 5 e 6 estão de acordo com o esperado, considerando a divisão da amostragem em extratos bem definidos, livres e focos. Entretanto, 18,45% das amostras oriundas de rebanhos livres e 19,05% das amostras de rebanhos foco terem apresentado resultados diferentes do esperado se justifica pelo fato de os testes sorológicos utilizados para classificação dos rebanhos serem imperfeitos. Além disso, os próprios testes em estudo são imperfeitos e a classificação dos rebanhos pode ser afetada também por este erro. Estas limitações corroboram o uso do modelo Bayesiano de classe latente para esta situação.

Considerando a imperfeição dos testes sorológicos utilizados no diagnóstico da brucelose bovina para a definição de caso, a opção por utilizar modelo Bayesiano de classe latente foi a mais adequada para o presente estudo. Neste caso, o modelo de duas populações e três testes diagnósticos, sendo dois deles correlacionados justifica-se pelo fato de os testes TAL e ELISA detectarem a atividade biológica de imunoglobulinas contra *Brucella abortus* presentes no leite de vacas infectadas e o teste de qPCR detectar sequências específicas do DNA desta bactéria. Levando-se em conta o parâmetro DIC, critério de informação da deviance, não houve diferença entre os modelos utilizados. Desta forma, o modelo 3T2P com correlação foi selecionado porque apresentou menor número efetivo de parâmetros a serem estimados (ρD). Este critério alternativo é utilizado para avaliação da qualidade do ajuste dos modelos aos dados quando não se encontra diferença entre os DICs dos modelos utilizados no experimento (NASCIMENTO, 2018). Apesar desta abordagem já ter sido utilizada para avaliação de testes diagnósticos em leite para outras enfermidades (MAHMMOD, 2013; NIELSEN et al, 2013), não foram encontrados até o momento estudos para testes diagnósticos de brucelose em leite que a tenham utilizado.

Entre os testes avaliados, o que apresentou melhor desempenho, de acordo com o modelo escolhido, foi o iELISA. A mediana da sensibilidade do ELISA foi maior que a do TAL, no entanto, houve sobreposição dos ICr das sensibilidades dos testes. Por outro lado, a estimativa da especificidade do iELISA foi maior que a do TAL, sem haver sobreposição de ICr. O maior valor de especificidade em relação ao TAL se justifica pelo fato de esta técnica detectar apenas IgG, um anticorpo mais específico para o diagnóstico da brucelose bovina. Já o TAL detecta tanto IgG, quanto IgA e IgM, o que predispõe esta prova a maior frequência de reações inespecíficas, diminuindo assim seu valor de especificidade. No geral, o ELISA

apresenta menor valor de limite de detecção que o TAL e este é mais influenciado pelo fator diluição do que aquele.

A PCR apresentou valor de especificidade semelhante ao do ELISA, mas um valor de sensibilidade extremamente baixo, apesar de a sensibilidade analítica apresentada na padronização da PCR por MASCARENHAS et. al. (2017). A presença de *Brucella* no leite não ocorre em todos os animais doentes, e mesmo quando há eliminação, esta é intermitente. Soma-se a isto, o fato de a PCR ser, provavelmente, mais influenciada pelo fator diluição do leite de animais doentes no total de leite do tanque que o iELISA.

Em estudo avaliando a sensibilidade analítica de um ELISA e do TAL por meio de diluição seriada de leite positivo em leite negativo, o ELISA demonstrou ser 22 vezes mais sensível que o TAL (KERKHOF, 1989). Da mesma forma, em outro estudo utilizando amostras colhidas de rebanhos infectados e livres, utilizando a abordagem frequentista, em que a classificação dos rebanhos foi realizada baseada nos resultados de testes sorológicos, o ELISA avaliado demonstrou ser mais sensível que o TAL e não foi encontrada diferença significativa entre as especificidades (VANZINI, 2001).

Apesar das metodologias de amostragem terem sido muito semelhantes entre os diferentes estudos, que utilizaram testes sorológicos imperfeitos para discriminar rebanhos positivos e negativos, os resultados citados acima diferem daqueles encontrados neste estudo. Neste não foi encontrada diferença significativa entre as sensibilidades do TAL e do ELISA, mas a especificidade desse foi significativamente superior à daquele. Por outro lado, as diferenças entre os estudos podem se justificar devido ao fato dos ELISAs avaliados serem diferentes entre si. Apesar de todos serem ELISAs indiretos, diferenças na padronização, nos pontos-de-corte e nos antígenos utilizados podem levar a diferenças de desempenho dos testes. Além disso, os estudos citados utilizaram a abordagem frequentista para comparação dos dados, não levando em conta os erros intrínsecos dos testes sorológicos utilizados na discriminação dos rebanhos.

Em outro estudo foi realizada a comparação entre um ELISA indireto e uma qPCR, em amostras de leite de indivíduos, tendo os dois testes apresentado especificidade de 100% quando realizados em amostras de animais oriundos de rebanhos livres (ROMERO, 1995). Em amostras de animais infectados, com isolamento de *B. abortus*, o ELISA apresentou valor de sensibilidade de 98,2%, enquanto a qPCR apresentou 87,5%. No presente estudo, não houve diferença significativa entre os valores de especificidade encontrados para o ELISA e a qPCR

e a sensibilidade da PCR foi extremamente baixa. Estes achados podem ser resultantes da diferença entre os métodos de amostragem, visto que no estudo conduzido por Romero et al., 1995 as amostras eram de indivíduos e neste estudo as amostras eram de tanques. Além disso, as PCRs e os ELISAs utilizados nos estudos não foram os mesmos, o que também pode levar a diferentes resultados de desempenho.

A comparação das estimativas de desempenho dos testes entre os modelos com dependência condicional entre os testes e sem dependência condicional, corroboram o achado da mediana do valor de correlação entre os resultados positivos dos testes TAL e iELISA, onde as estimativas destes parâmetros foram superiores no modelo sem dependência condicional entre os testes (GARDNER et al., 2000). A variação de aproximadamente 5% nos valores de sensibilidade dos testes está de acordo com a mediana da correlação positiva entre os testes (JOHSON et al., 2019). Na prática, a correlação positiva encontrada entre os resultados positivos dos testes iELISA e TAL é pouco relevante porque se trata de testes de triagem e que dificilmente serão utilizados em associação

Por outro lado, é sabido que correlações até 0,2 não interferem nas estimativas dos parâmetros dos testes, isto é, os valores dos parâmetros de desempenho dos testes estimados por modelos com e sem correlação são equivalentes (JOHSON et al., 2019), como se pode constatar em relação à correlação dos resultados negativos dos testes, que não apresentaram diferenças entre os modelos com covariância e sem covariância.

Conclusões

Considerando os resultados alcançados, o iELISA foi considerado o melhor teste para triagem de brucelose em amostras de leite de tanque. O TAL também pode ser usado como alternativa, apesar do menor valor de especificidade apresentada. Neste caso, recomenda-se seu uso em situações de maior prevalência, onde o valor preditivo positivo do teste é maior.

A qPCR não se mostrou eficiente para este fim, mas pode vir a ser alternativa para uso em leite individual ou casos específicos.

A partir dos resultados apresentados, o PNCEBT pode adotar a vigilância em rebanhos leiteiros de forma a diversificar as estratégias visando controle e erradicação da brucelose no país.

Referências

- ADONE, R.; PASQUALI, P. Epidemiological surveillance of brucellosis. *Rev Sci Tech*, v. 32, 199-205, 2013.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. *Techniques for the brucellosis laboratory*, 1988. 109p. Paris:INRA
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- BERVENS, D.; SPEYBROECK, N.; PRAET, N.; ADEL, A.; LESAFFRET, E. Estimating disease prevalence in a Bayesian framework using probabilistic constraints. *Epidemiology*, v. 17, n. 2, 2006.
- BIELANSKI, A., Algire, J., Lalonde, A., Nadin-Davis, S., 2009. Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology* 71, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.015>.
- BRANSCUM A. J., GARDNER I. A., JOHNSON W. O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 68, p. 145-163, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 19, de 10 de outubro de 2016 – Estabelece o Regulamento Técnico do PNCEBT.
- BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 90, p. 435-446, 2002.
- CLAEYS, W. L.; VERRAES, C.; CARDOEN, S.; DE BLOCK, J.; HUYGHEBAERT, A.; RAES, K.; DEWETTINCK, K.; HERMAN, L. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, v. 42, p. 188–201, 2014.
- CORBEL, M. J.; ELBERG, S. S.; COSIVI, O. *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: World Health Organization, p. 89 p., 2006.

DADAR, M.; SHAHALI, Y.; WHATMORE, A. M. Human brucellosis caused by raw dairy products: A review on the occurrence, major risk factors and prevention. *International Journal of Food Microbiology*, 292, p. 39-47, 2019.

DE ALENCAR MOTA, A. L. A.; Ferreira, F.; Ferreira Neto, J. S.; Dias, R. A.; Amaku, M.; Hildebrand Grisi-Filho, J. H.; Telles, E. O.; Picão Gonçalves, V. S. Large-scale study of herd-level risk factors for bovine brucellosis in Brazil. *Acta Tropica*, 164, pg 226-232, 2016

DE MORAES, M.R.L.; NÓBREGA, R.de Q.; De SOUZA, C.F.; CARVALHO, I.P.P.de S.; LIMA, A.C.F.; De FIGUEIREDO, J.S.B.; SILVA, J.A.; NÓBREGA, E.da S. Atual conjuntura do setor industrial de leite: Estudo da industrialização do leite no Brasil e no Nordeste. *Brazilian Journal of Development*, v.6, n.8, p.57085-57095, 2020.

DUCROTOY, M. J.; Muñoz, P. M.; Conde-Álvarez, R.; Blasco, J. M.; Moriyón, I.; A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis, *Preventive Veterinary Medicine*, volume 151, pg 57-72, 2018.

FERREIRA NETO, J. S.; SILVEIRA, G. B.; ROSA, BARBARA MEDEIROS GONÇALVES, V. S. P.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; LAGE, A. P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 5, p. 3385, 2016.

FODDAI, A.; KELLY, L.; MCGIVEN, J.; GRACE, K.; EVANS, S.; Quantitative assessment of the probability of introducing bovine brucellosis into English cattle herds by imported live cattle, *Microbial Risk Analysis*, Volume 16, 2020.

GALL, D.; NIELSEN, K.; BERMUDEZ, M.R.; MORENO, F.; SMITH, P. Fluorescence polarization assay for detection of brucella abortus antibodies in bulk tank bovine milk samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.9, n.6, p. 1356-1360, 2002.

GERESU, M.A.; KASSA, G.M. A review on diagnostic methods of brucellosis of brucellosis. *Veterinary Science and Technology*, v.7:323, 2016.

IBGE. Produção da pecuária municipal 2020. Rio de Janeiro, v.48, p.1-12, 2020.

KAMWINE, M.; ORIKIRIZA, P.; TASEERA, K.; IRAMIOT, J.S.; OJUKA, P.; IKIRIZA, S.; ATWEBEMBEIRE, J.; OTIENO, D.; TWESHENGYEREZE, S.; MWANGA-AMUMPAIRE, J.; BAZIRA, J.; BOUM II, Y. Prevalence of antibodies to Brucella species in commercial raw bovine milk in Southwestern Uganda, BMC Research Notes., 10:215, 2017.

JOHNSON, O. W.; JONES, G.; GARDNER, A. I.; Gold standards are out and Bayes is in: Implementing the cure for imperfect reference tests in diagnostic accuracy studies, Preventive Veterinary Medicine, Volume 167, Pages 113-127, 2019.

KERKHOF, P.; BOTTON, Y.; THIANGE, P.; DEKEYSER, P.; LIMET, J. N.; Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk, Veterinary Microbiology, Volume 24, Issue 1, Pages 73-80, ISSN 0378-1135, 1990.

KOSTOULAS P.; Nielsen S. S.; Branscum A. J.; Johnson W. O.; Dendukuri N.; Dhand N. K.; Toft N.; Gardner I. A. STARD-BLCM: Standards for the Reporting of Diagnostic accuracy studies that use Bayesian Latent Class Models, Preventive Veterinary Medicine, Mar 1;138:37-47, 2017.

LEITE, B.M. Aspectos epidemiológicos e econômicos da certificação de propriedades leiteiras como livres de brucelose e tuberculose bovina. Dissertação de Mestrado, Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 81 p..

LUNN, D., Spiegelhalter, D., Thomas, A., Best, N., 2009. The BUGS project: evolution, critique and future directions. Statist. Med. 28, 3049–3067.

MASCARENHAS, D. R.; 2017. Validação da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para detecção de Mycobacterium bovis e Brucella abortus em amostras de leite cru. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, MG, 94 p.

MATOPE, G.; MUMA, J.B.; TOFT, N.; GORI, E.; LUND, A.; NIELSEN, K.; SKJERVE, E.; Evaluation of sensitivity and specificity of RBT, c-ELISA and fluorescence polarization assay for diagnosis of brucellosis in cattle using latent class analysis. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 141, p. 58-63, 2011.

MCGIVEN, J.A.; TUCKER, J.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; BREW, S.D.; MACMILLAN, A.P. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to Brucella

abortus in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *Journal of Immunological Methods*, 278, p. 171-178, 2003.

MUMA, J.B., TOFT, N., OLOYA, J., LUND, A., NIELSEN, K., SAMUI, K., SKJERVE, E., Evaluation of three serological tests for brucellosis in naturally infected cattle using latent class analysis, *Veterinary Microbiology*, v. 125, p. 187–192, 2007.

MUSSI, S.M.J. Efeito do antagonismo in vitro de bactérias ácido-láticas e da maturação na sobrevivência de *Brucella abortus* em queijos tipo minas artesanal. Belo Horizonte, 2018. 149p. Tese (doutorado) Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais.

MWEU, M.M.; TOFT, N.; KATHOLM, J.; NIELSEN, S.S.; Evaluation of two herd-level diagnostic tests for *Streptococcus agalactiae* using a latent class approach, *Veterinary Microbiology*, v. 159, p. 181-186, 2012.

NING, P., GUO, K.; XU, C.; ZHANG, C.; CHENG, Y.; CUI, H.; LIU, W.; LV, Q.; CAO, W.; ZHANG, Y. Short communication: Evaluation of *Brucella* infection of cows by PCR detection of *Brucella* DNA in raw milk. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n° 9, 2012.

NTZOUFRAS, I. 2009. *Bayesian Modeling Using WinBUGS*. 1 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. *Acta Tropica*, v. 164, p. 226-232, 2016.

O'LEARY, S.; SHEAHAN, M.; SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Research in Veterinary Science*, 81, p. 170-176, 2006.

OLIVEIRA, M.A. de. Diagnóstico de brucelose em amostras coletivas de leite bovino. Uberlândia, 2014. 90p. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia.

OMSA, 2013. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013*, Paris: World Organization for Animal Health. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf.

OMSA, 2016. Brucellosis (Chapter 2.1.4). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016, Paris: World Organization for Animal Health. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf.

ORZIL, L. L.; PREIS, I. S.; ALMEIDA, I. G.; SOUZA, P. G.; SOARES FILHO, P.M.; JACINTO, F. B.; FONSECA JÚNIOR, A. A. Validation of the multiplex PCR for identification of *Brucella* spp.. *Ciência Rural*, 46(5), 847-852. 2016.

NIELSEN a, P. K.; PETERSENb, M., B.; NIELSENb, L., R.; HALASAA, T.; TOFT, N. Latent class analysis of bulk tank milk PCR and ELISA testing for herdlevel diagnosis of *Mycoplasma bovis*. *Preventive Veterinary Medicine* 121 (2015) 338–342

POESTER, F. Eficácia da vacina RB51 em novilhas. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 2006. 51.Tese (Doutorado em Ciência Animal).

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

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Agricultura, da Pesca e do Desenvolvimento Rural. Portaria SAR nº 17, de 20 de julho de 2012 – <http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2019/07/PORTARIA-SAR-17-2012-de-20-07-2012.pdf>.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Agricultura, da Pesca e do Desenvolvimento Rural. Portaria SAR nº 44, de 16 de dezembro de 2020 – <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2021/01/Portaria-SAR-n%C2%BA-44-2020-revoga-a-Portaria-16.pdf>

SANTOS, R.L.; MARTINS, T.M.; BORGES, A.M.; PAIXÃO, T.A.; Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil, *Pesq. Vet. Bras.*, v. 33, p. 759-764, 2013.

SOLA, M.C.; de FREITAS, F.A.; SENA, E.L.de S.; de MESQUITA, A.J.; Brucelose Bovina: revisão, *Enciclopédia Biosfera*, v.10, nº18, p. 686-714, 2014.

TAUXE, R. V.; DOYLE, M. P.; KUCHENMÜLLER, T.; SCHLUNDT, J.; STEIN, C. E. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, v. 139, n. SUPPL. 1, p. S16–S28, 2010.

VANZINI, V.R.; AGUIRRE, N.P.; VALENTINE, B.S.; TORIONI de ECHAIDE, S.; LUGARESI, C.I.; MARCHESINO, M.D.; Comparison of an indirect ELISA with the Brucella milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples, *Veterinary Microbiology*, v.82, p. 55-60, 2001.

WANG, Y., ROBERTSON, I. D., CHENG, S., WANG, Y., HOU, L., WANG, G., ... GUO, A. Evaluation of a milk ELISA as an alternative to a serum ELISA in the determination of the prevalence and incidence of brucellosis in dairy herds in Hubei Province, China. *Preventive Veterinary Medicine*, 182, 105086, 2020.

YAMAMOTO, T.; TSUTSUI, T.; NISHIGUCHI, A.; KOBAYASHI, S.; Evaluation of surveillance strategies for bovine brucellosis in Japan using a simulation model, *Preventive Veterinary Medicine*, Volume 86, Pages 57-74, Issues 1–2, 2008.

ANEXO

MODELO 3T2P UTILIZADO NO ESTUDO

```
model{
y1[1:8] ~ dmulti(p1[1:8], n1)
p1[1] <- pi1*(SeTAL*SeELISA+covDp)*SePCR + (1-pi1)*((1-SpTAL)*(1-
SpELISA)+covDn)*(1-SpPCR) # 0
p1[2] <- pi1*(SeTAL*SeELISA+covDp)*(1-SePCR) + (1-pi1)*((1-SpTAL)*(1-
SpELISA)+covDn)*SpPCR # 0
p1[3] <- pi1*(SeTAL*(1-SeELISA)-covDp)*SePCR + (1-pi1)*((1-SpTAL)*SpELISA-
covDn)*(1-SpPCR) # 0
p1[4] <- pi1*((1-SeTAL)*SeELISA-covDp)*(SePCR) + (1-pi1)*((SpTAL)*(1-SpELISA)-
covDn)*(1-SpPCR) # 0
p1[5] <- pi1*(SeTAL*(1-SeELISA)-covDp)*(1-SePCR) + (1-pi1)*((1-SpTAL)*SpELISA-
covDn)*(SpPCR) # 15
p1[6] <- pi1*((1-SeTAL)*(1-SeELISA)+covDp)*(SePCR) + (1-
pi1)*(SpTAL*SpELISA+covDn)*(1-SpPCR) # 3
p1[7] <- pi1*((1-SeTAL)*SeELISA-covDp)*(1-SePCR) + (1-pi1)*(SpTAL*(1-SpELISA)-
covDn)*(SpPCR) # 1
p1[8] <- pi1*((1-SeTAL)*(1-SeELISA)+covDp)*(1-SePCR) + (1-
pi1)*(SpTAL*SpELISA+covDn)*SpPCR # 84
y2[1:8] ~ dmulti(p2[1:8], n2)
p2[1] <- pi2*(SeTAL*SeELISA+covDp)*SePCR + (1-pi2)*((1-SpTAL)*(1-
SpELISA)+covDn)*(1-SpPCR) # 0
p2[2] <- pi2*(SeTAL*SeELISA+covDp)*(1-SePCR) + (1-pi2)*((1-SpTAL)*(1-
SpELISA)+covDn)*SpPCR # 0
p2[3] <- pi2*(SeTAL*(1-SeELISA)-covDp)*SePCR + (1-pi2)*((1-SpTAL)*SpELISA-
covDn)*(1-SpPCR) # 0
p2[4] <- pi2*((1-SeTAL)*(SeELISA)-covDp)*(SePCR) + (1-pi2)*(SpTAL*(1-SpELISA)-
covDn)*(1-SpPCR) # 0
p2[5] <- pi2*(SeTAL*(1-SeELISA)-covDp)*(1-SePCR) + (1-pi2)*((1-SpTAL)*SpELISA-
covDn)*(SpPCR) # 15
p2[6] <- pi2*((1-SeTAL)*(1-SeELISA)+covDp)*(SePCR) + (1-
pi2)*(SpTAL*SpELISA+covDn)*(1-SpPCR) # 3
p2[7] <- pi2*((1-SeTAL)*(SeELISA)-covDp)*(1-SePCR) + (1-pi2)*(SpTAL*(1-SpELISA)-
covDn)*(SpPCR) # 1
p2[8] <- pi2*((1-SeTAL)*(1-SeELISA)+covDp)*(1-SePCR) + (1-
pi2)*(SpTAL*SpELISA+covDn)*SpPCR # 84
ls <- (SeTAL-1)*(1-SeELISA)
us <- min(SeTAL,SeELISA)-SeTAL*SeELISA
lc <- (SpTAL-1)*(1-SpELISA)
uc <- min(SpTAL, SpELISA)-SpTAL*SpELISA
covDn ~ dunif(lc, uc)
covDp ~ dunif(ls, us)
corrDp <- covDp / sqrt(SeTAL*(1-SeTAL)*SeELISA*(1-SeELISA))
corrDn <- covDn / sqrt(SpTAL*(1-SpTAL)*SpELISA*(1-SpELISA))
ppv1TAL <- pi1*SeTAL/(pi1*SeTAL+(1-pi1)*(1-SpTAL))
```

```

ppv1ELISA < - pi1*SeELISA/(pi1*SeELISA+(1-pi1)*(1-SpELISA))
ppv1PCR < - pi1*SePCR/(pi1*SePCR+(1-pi1)*(1-SpPCR))
npv1TAL < - SpTAL*(1-pi1)/(SpTAL*(1-pi1)+pi1*(1-SeTAL))
npv1ELISA < - SpELISA*(1-pi1)/(SpELISA*(1-pi1)+pi1*(1-SeELISA))
npv1PCR < - SpPCR*(1-pi1)/(SpPCR*(1-pi1)+pi1*(1-SePCR))
ppv2TAL < - pi2*SeTAL/(pi2*SeTAL+(1-pi2)*(1-SpTAL))
ppv2ELISA < - pi2*SeELISA/(pi2*SeELISA+(1-pi2)*(1-SpELISA))
ppv2PCR < - pi2*SePCR/(pi2*SePCR+(1-pi2)*(1-SpPCR))
npv2TAL < - SpTAL*(1-pi2)/(SpTAL*(1-pi2)+pi2*(1-SeTAL))
npv2ELISA < - SpELISA*(1-pi2)/(SpELISA*(1-pi2)+pi2*(1-SeELISA))
npv2PCR < - SpPCR*(1-pi2)/(SpPCR*(1-pi2)+pi2*(1-SePCR))
pi1 ~ dbeta(1.0, 1.0) ## livre
pi2 ~ dbeta(1.0, 1.0) ##
SeTAL ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpTAL ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.9995, L1=0.999, L2=1.00
SeELISA ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpELISA ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SePCR ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
SpPCR ~ dbeta(1.0, 1.0) ## Mode=0.5, L1=0, L2=1
}

data
list(n1=103, y1=c(0,0,0,0,15,9,1,78), n2=84, y2=c(0,57,0,0,4,0,7,16))

inits
list(pi1=0.01, pi2=0.5, SeTAL=0.5, SpTAL=0.5, SeELISA=0.5, SpELISA=0.5, SePCR=0.3,
SpPCR=0.5, covDp=0.002, covDn=0.001)

list(pi1=0.05, pi2=0.8, SeTAL=0.75, SpTAL=0.7, SeELISA=0.9, SpELISA=0.9, SePCR=0.3,
SpPCR=0.9, covDp=0.03, covDn=0.003)

```