

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Patrícia Gomes de Souza

**AVALIAÇÃO DE UM TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO PARA O
DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE BOVINA BASEADO EM UMA PROTEÍNA
RECOMBINANTE BP26.**

Belo Horizonte

2023

Patrícia Gomes de Souza

**AVALIAÇÃO DE UM TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO PARA O
DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE BOVINA BASEADO EM UMA PROTEÍNA
RECOMBINANTE BP26.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Romero Nicolino

Belo Horizonte

2023

S729a Souza, Patrícia Gomes de ,1966 -
Avaliação de um teste imunocromatográfico rápido para o diagnóstico da brucelose bovina baseado em uma proteína recombinante BP26/ Patrícia Gomes de Souza. – 2023.
67f: il

Orientador: Renato de Lima Santos
Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.
Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva
Bibliografias: f. 60 a 67.

1- Bovino - Doenças - Teses - 2 – Brucelose em bovino – Vacina - Teses –
3. Veterinária – Teses – I. Santos, Renato de Lima - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

PATRICIA GOMES DE SOUZA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 25 de maio de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Renato de Lima Santos - Orientador(a)

Dr.(a). Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Dr.(a). Tatiane Alves da Paixão

Dr.(a). Sílvia de Araújo França Baêta

Dr.(a). Paulo Martins Soares Filho



Documento assinado eletronicamente por Renato de Lima Santos, Professor do Magistério Superior, em 25/05/2023, às 19:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Tatiane Alves da Paixao, Professora do Magistério Superior, em 29/05/2023, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Sílvia de Araújo França Baêta, Usuário Externo, em 29/05/2023, às 10:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Membro de comissão, em 29/05/2023, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Paulo Martins Soares Filho, Usuário Externo, em 01/06/2023, às 14:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&iid_organizacao=0, informando o código verificador 2317407 e o código CRC CCA8CFAB.

Dedico esse trabalho aos meus pais Nilo e Maria e minha avó Olívia pela valorização dos conhecimentos adquiridos e por sempre me incentivarem ao estudo e aperfeiçoamento pessoal.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, princípio de todas as coisas;

À minha família, esposo Marcos e filha Julia pela compreensão da minha dedicação a esse trabalho;

À minha irmã Andrea pelo apoio e desabafos dos dias difíceis;

Ao meu orientador Professor Renato de Lima Santos por me aceitar como orientada, pela atenção, comprometimento com o meu trabalho e pelos ensinamentos para meu enriquecimento profissional;

Ao Professor Ricardo Fujiwara pelo acolhimento na hora difícil, pelas palavras de incentivo e pela simpatia sempre presente em sua essência;

À Professora Tatiane Paixão pelas ideias e opiniões sempre enriquecedoras;

Ao Professor Rafael Nicolino pelas opiniões e ajuda neste trabalho;

À empresa Safetest Diagnósticos LTDA pelo fornecimento do kit para a realização dos testes, especialmente a Agostinho Gonçalves Viana pela disponibilidade ao dirimir várias dúvidas;

À colega Pamela Aparecida Lima pela ajuda, disponibilidade, conhecimento e ideias que me auxiliaram na elaboração desse trabalho;

Ao LFDA-MG pelo fornecimento do material necessário a realização desse trabalho e apoio para minha capacitação profissional e aos ex-coordenadores do LFDA/MG Ricardo Pinto do Nascimento e Pedro Mota que acompanharam minha preparação para ingresso no doutorado;

Aos atuais coordenadores do LFDA/MG Andréa Melo Garcia e Mikael Hodon Arraes pelo apoio no desenrolar da tese e nos desdobramentos gerados a partir dela;

Ao diretor da DLAB Eduardo Esteves pelo apoio, disponibilidade e ajuda em questões de interesse ao LFDA-MG;

Ao colega do LFDA-MG Paulo Martins Soares Filho pelo apoio, ajuda indispensável, ideias sempre enriquecedoras, pelas risadas para aliviar as tensões do dia a dia;

À colega do LFDA-MG Luciana Rabello pela ajuda, apoio, afinidade, conversa sempre produtivas e por acreditar que as coisas podem ser construídas com esforço e dedicação;

À colega do LFDA-MG Antônia Cristiane pela enorme ajuda na execução das análises, apoio logístico e computacional e companheira de laboratório;

Às amigas Marina Issa, Fabiana Galtarossa e Kelly Fagundes pelo apoio e descontração nas horas de desânimo, graças a Deus passageiras;

Ao colega Rodrigo Nestor Etges do Divisão de Defesa Sanitária Animal/Secretaria Estadual da Agricultura/RS pela disponibilidade de amostras para esse experimento;

Às colegas do MAPA Cristiane de Moraes Alves e Patricia Santana Ferreira coordenadoras do PNCEBT pela disponibilidade dos dados mais atuais;

Aos servidores da coordenação de pós-graduação da Escola de Veterinária que sempre foram disponíveis em dirimir as minhas dúvidas e questionamentos no decorrer do curso;

Enfim, a todos que me ajudaram nesta jornada e tornaram o processo mais agradável.

“A vida é feita de momentos, momentos pelos quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso aprendizado. Nada é por acaso. Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar o nosso papel no palco da vida, lembrando de que a vida nem sempre segue o nosso querer, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

(Chico Xavier)

RESUMO

A brucelose é uma doença infecciosa considerada como uma importante zoonose de proporções mundiais, causada por bactérias do gênero *Brucella* as quais induzem infecção de caráter crônico e quase sempre assintomática. Acomete várias espécies de animais podendo ser transmitida para a espécie humana por meio de alimentos contaminados, principalmente leite cru e seus derivados. A principal espécie de *Brucella* que acomete os bovinos é a *Brucella abortus*. Nestes animais, a doença causa prejuízos em função das alterações reprodutivas principalmente. A doença é enzootica no Brasil, dessa forma, as medidas de controle nos animais domésticos é a principal forma para o seu controle no ser humano. Em 2001, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) lançou o programa nacional de controle e erradicação da brucelose (PNCEBT) que juntamente com a tuberculose constituiu importante programa sanitário para o controle e erradicação de ambas as doenças. O conhecimento das prevalências e as medidas sanitárias preconizadas foram formados basicamente pela vacinação em massa dos animais e realização de testes sorológicos para a detecção de animais infectados. Os testes sorológicos utilizados no Brasil são baseados no antígeno imunodominante do lipopolissacarídeo liso (S-LPS) da bactéria, mais precisamente a cadeia O. Entretanto, reações falso-negativas ou falso-positivas podem ocorrer. Com o intuito de superar essa limitação, novos antígenos têm sido avaliados. A proteína BP26 foi bastante estudada e considerada promissora para uso como antígeno. Este estudo avaliou uma proteína BP26 recombinante como antígeno em um teste rápido imunocromatográfico (rBP26-TRIFL) que pudesse ser utilizado a campo, com leitura visual rápida, sem necessidade de equipamentos laboratoriais e pessoal com capacitação específica. As características de desempenho analíticas e acurácia foram avaliadas em amostras de soro bovino positivos e negativos caracterizados pelos testes antígeno acidificado tamponado (AAT) e soroprecipitação lenta (SAL/2-ME), sendo observadas sensibilidade e especificidade analíticas de 73,91% (IC 95%: 51,59% - 89,77%) e 97,14% (IC 95%: 90,06% - 99,65%), respectivamente. As características de desempenho diagnósticas foram avaliadas utilizando-se 467 amostras de soro bovino, caracterizadas também pelos testes AAT, SAL/2-ME, provenientes dos vários estados brasileiros em diferentes situações epidemiológicas. A sensibilidade (DSe) e especificidade (DSp) diagnósticas para o rBP26-TRIFL foram 5,73% (IC 95%: 2,65% - 10,60%) e 99,35% (IC 95%: 97,69% - 99,92%), respectivamente. A acurácia diagnóstica foi de 67,88%. O cálculo do índice *kappa* apresentou valor igual a 0, indicando concordância baixa com os testes AAT, SAL/2-ME. Em conclusão, o teste rBP26-TRIFL apresentou um bom desempenho analítico, mas desempenho diagnóstico limitado, restringindo por ora sua recomendação de uso nos diferentes cenários epidemiológicos para o atendimento ao PNCEBT. Este estudo permitiu ainda demonstrar que um teste com bom desempenho analítico pode não apresentar, necessariamente, bom desempenho diagnóstico, indicando a necessidade de uma nova padronização da prova conforme objetivos de uso a campo de tal forma que ambas as avaliações sejam pertinentes para tomada de decisão mais acertada quanto ao seu uso por um programa sanitário.

Palavras-chave: *Brucella abortus*; BP26; sorologia; diagnóstico.

ABSTRACT

Brucellosis is an infectious disease that is an important zoonosis worldwide. It is caused by a gram-negative facultative intracellular bacterium that has the ability to adapt to their preferred host, modulating the immune response to induce a chronic infection. It affects several species of animals and can be transmitted through contaminated food, mainly unpasteurized milk and dairy products. In cattle, the disease causes losses in livestock production due to reproductive changes. The most common species that infects cattle is *Brucella abortus*. The disease is enzootic in Brazil, therefore, control measures in domestic animals are the main form of control in humans. In 2001, the Ministry of Agriculture and Livestock launched the national program for the control and eradication of brucellosis (PNCEBT) which, together with tuberculosis, constitutes an important health program for the control and eradication of both diseases. Recommended measures included mass vaccination of heifers and serological tests for the detection of infected animals. The serological tests used in Brazil are based on the S-LPS antigen of *Brucella* more precisely the O chain. However, false-negative or false-positive reactions may occur. In order to overcome this limitation, novel antigens have been studied. The BP26 protein has been extensively studied and considered a promising antigen, as it induced a detectable response in infected animals. This study evaluated a recombinant BP26 protein used as antigen in a rapid test (rBP26-TRIFL) that could be used in the field, with quick visual reading and without the need for laboratory equipment and personnel with specific training. Analytical performance characteristics and accuracy were evaluated in positive and negative bovine serum samples characterized by the AAT and SAL/2-ME tests, with analyticals sensitivity and specificity of 73,91% (CI 95%: 51,59% - 89,77%) e 97,14% (CI 95%: 90,06% - 99,65%), respectively. Then, the diagnostic performance of the test was evaluated using 467 bovine serum samples characterized by the AAT, SAL/2-ME from several Brazilian states and with different epidemiological situations. The diagnostic sensitivity (DSe) and specificity (DSp) for rBP26-TRIFL were 5.73% (CI 95%: 2.65% - 10.60%) and 99.35% (CI 95%: 97.69% - 99.92%), respectively. The estimated accuracy was 67.88%. The calculation of the *kappa* index presented a value of 0, indicating low agreement with the AAT, SAL/2-ME tests. In conclusion, rBP26-TRIFL showed a low DSe despite a high DSp. In conclusion, rBP26-TRIFL In conclusion, the rBP26-TRIFL test showed good analytical performance, but limited diagnostic performance, restricting for the time being its recommendation for use in different epidemiological scenarios for the care of the PNCEBT. This study also allowed demonstrating that a test with good analytical performance may not necessarily present good diagnostic performance, indicating the need for a new standardization according to field conditions and that both evaluations are necessary for making a more accurate decision regarding its use by a health program.

Keywords: *Brucella abortus*; BP26; serologies; diagnosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista das diferentes espécies de <i>Brucella</i> e seus hospedeiros naturais. (Fonte: Adaptado de El-Sayed e Awad, 2018)	15
Tabela 2. Classificação de risco para brucelose dos estados brasileiros de acordo com a Instrução Normativa SDA nº 10 de 03 de março de 2017	31
Tabela 3. Resumo do emprego da BP26 como antígeno e do teste TRIFL	40
Tabela 4. Caracterização das amostras de soro para avaliação da ASe do rBP26-TRIFL	41
Tabela 5. Caracterização das amostras de soro para avaliação da ASp do rBP26-TRIFL	42
Tabela 6. Caracterização das amostras utilizadas na avaliação do desempenho diagnóstico do rBP26-TRIFL	43
Tabela 7. Estudo comparativo da estabilidade das amostras de soro bovino em função do tempo de armazenamento	48
Tabela 8. Resultados da avaliação da ASe do teste rBP26-TRIFL frente às provas AAT e SAL/2-ME	49
Tabela 9. Resultados da avaliação da ASp do rBP26-TRIFL	50
Tabela 10. Resultados dos testes padrão referência (PR) AAT, SAL/2-ME e do rBP26-TRIFL para a brucelose bovina em amostras de soro provenientes de diferentes regiões brasileiras	51
Tabela 11. Estimativas das sensibilidade (DSe) e especificidade (DSp) diagnósticas relativas do rBP26-TRIFL, índice <i>kappa</i> e acurácia utilizando os testes padrão referência (PR) AAT e SAL/2-ME para a classificação das amostras de soro como positivas e negativas para a brucelose bovina	53
Tabela 12. Estimativas das sensibilidade (DSe) e especificidade (DSp) diagnósticas relativas do rBP26-TRIFL, índice <i>kappa</i> e acurácia no total das amostras (n = 467) utilizando os testes padrão referência AAT e SAL/2-ME (PR) para a classificação das amostras de soros como positivas e negativas para brucelose bovina	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura esquemática do lipopolissacarídeo e membrana externa da <i>Brucella</i> spp. Fonte: Cardoso et al., 2006	16
Figura 2. Caminhos para validação de um teste de diagnóstico (Fonte: WOAHA Cap. 1.1.6 do Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals)	25
Figura 3. Prevalência de focos (%) da brucelose bovina nos estados brasileiros baseada nos dados dos últimos inquéritos soropidemiológicos (Fonte: Adaptado Brasil, 2020). D: Prevalência desconhecida. Estado do Acre: resultado preliminar	32
Figura 4. Apresentação do teste rápido para brucelose (Pan Ig) embalado para uso	45
Figura 5. Apresentação dos cassetes do teste Pan Ig (rBP26-TRIFL) para diagnóstico da brucelose ...	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Interpretação do <i>kappa</i>	47
---	----

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAT	Antígeno acidificado tamponado
ASe	Sensibilidade analítica
ASp	Especificidade analítica
BCV	Vacúolo contendo <i>Brucella</i>
CP28	Proteína citoplasmática 28
CSLB	Coleção de soros LFDA Brucelose
DSe	Sensibilidade diagnóstica
DSp	Especificidade diagnóstica
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
FC	Fixação de complemento
IgA	Imunoglobulina A
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2	Imunoglobulina G2
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
LFA	Lateral flow assay (ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral)
LFDA/MG	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
OMPs	Proteínas de membrana externa
PNCEBT	Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose
r-BP26	Proteína recombinante BP26
r-BP26-TRIFL	Teste imunocromatográfico de fluxo lateral com proteína BP26 recombinante
R-LPS	Lipopolissacarídeo rugoso
r-OMP28	Proteína recombinante de superfície externa de 28 kDa
r-SOD	Dismutase superóxido Cu-Zn recombinante
SAL/2-ME	Soroaglutinação lenta/2- Mercaptoetanol
SIF	Serviço de inspeção federal
S-LPS	Lipopolissacarídeo liso
T4SS	Sistema de secreção do tipo IV
TRIFL	Teste imunocromatográfico de fluxo lateral
WB	Western blot
WOAH	World Organization for Animal Health (Organização Mundial para Saúde Animal)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos Específicos.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Gênero <i>Brucella</i>	14
3.2 Brucelose.....	17
3.3 Patogênese e resposta imunológica do hospedeiro.....	18
3.4 Diagnóstico	20
3.5 Avaliação de desempenho de testes de diagnóstico	23
3.6 Controle e erradicação.....	29
3.7 Avaliação do potencial da proteína BP26 no diagnóstico da brucelose bovina	33
3.8 Teste rápido imunocromatográfico de fluxo lateral (TRIFL) no diagnóstico da brucelose bovina..	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Amostras para avaliação das sensibilidade e especificidade analíticas do teste rBP26-TRIFL no diagnóstico da brucelose bovina	41
4.2 Amostras para avaliação das sensibilidade e especificidade diagnósticas do teste rBP26-TRIFL no diagnóstico da brucelose bovina	42
4.3 Teste Imunocromatográfico de fluxo lateral com a proteína recombinante rBP26-TRIFL	44
4. 4 Análise estatística dos dados	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1 Avaliação de desempenho analítico	48
5.2 Avaliação de desempenho diagnóstico.....	50
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecciosa crônica causada por bactérias intracelulares facultativas do gênero *Brucella*, que acometem diferentes espécies de animais, inclusive a espécie humana (Cutler et al., 2005; Corbel et al., 2006; Pappas et al., 2006; Pappas, 2010).

A brucelose ainda é uma das zoonoses mundiais amplamente disseminada com características marcantes na manipulação do sistema de defesa dos hospedeiros e sobrevivência intracelular facilitando o caráter crônico de infecção (Plumb et al., 2013). As espécies mais patogênicas para o ser humano são *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis*, nesta ordem (Poester et al., 2009; Poester et al., 2013; El-Sayed e Awad, 2018; WOAHA, 2022).

Os principais sinais clínicos nos animais domésticos incluem alterações reprodutivas, enquanto que na espécie humana a doença pode afetar vários órgãos e tecidos provocando sintomas diversificados. A taxa de mortalidade na brucelose humana é baixa, entretanto, a infecção pode resultar em uma doença debilitante e de difícil tratamento (Cutler, 2005; Corbel et al., 2006; Plumb et al., 2013; Moreno, 2022).

A doença é transmitida ao homem pelo contato direto com animais infectados ou por meio de alimentos de origem animal contaminados, tais como, leite cru e derivados. A brucelose humana também decorre de risco ocupacional podendo ser facilmente contraída por pessoas que lidam diretamente com os animais contaminados e suas carcaças e na rotina laboratorial de diagnóstico (Poester et al., 2013; Plumb et al., 2013; WOAHA, 2022). A maioria dos casos da doença em humanos depende de um hospedeiro animal. Dessa forma, a prevalência da doença nos animais está ligada à ocorrência da doença no ser humano. Portanto, é muito importante para a saúde pública o controle e a erradicação da brucelose nos animais domésticos (Moreno, 2022).

No Brasil, a brucelose bovina, causada por *B. abortus*, é enzootica (Lage et al., 2008; Ferreira Neto et al., 2016), com prevalência de focos da doença variando de 0,91% a 30,6% nos diversos estados brasileiros (Brasil, 2020). Em 2001, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) lançou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT), a fim de padronizar diretrizes e ações a serem adotadas por todas as unidades federativas no combate à doença em bovinos e bubalinos para a prevenção e controle da doença no país, (Brasil, 2001 Brasil, 2004; Brasil, 2006; Brasil, 2017). Dos testes preconizados pelo programa, a prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) é utilizada como teste de triagem

e a do 2-mercaptoetanol (2-ME) como um dos testes confirmatórios (Brasil, 2004; Brasil, 2006; Brasil, 2017).

A maioria dos testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina é baseado na detecção de anticorpos contra o lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria, que é o antígeno imunodominante em relação a outras moléculas antigênicas encontradas nas espécies clássicas de *Brucella* spp. incluindo a *B. abortus* (Geresu e Kassa, 2016). A estrutura mais externa do LPS, denominada cadeia O pode desencadear reações cruzadas com outras bactérias gram-negativas restringindo a especificidade dos testes de diagnóstico sorológico baseados neste antígeno (Rossetti et al., 1996; Letesson et al., 1997; Cloeckart et al., 2002; Cutler et al., 2005; Cardoso et al., 2006). Além disso, os testes que utilizam o LPS como antígeno não conseguem diferenciar animais vacinados de animais naturalmente infectados dependendo do período pós-vacinação (Chaudhuri et al., 2010; Kim et al., 2013; Ducrotoy et al., 2016), levando a tomadas de decisão equivocadas, tais como, quarentena e sacrifício de animais não infectados, além de limitar a faixa etária recomendada para a vacinação de bovinos (Nielsen, 2002).

Em função disso, várias proteínas da *Brucella* spp. têm sido estudadas e descritas como indutoras de resposta imunológica durante a infecção, com o propósito de identificar antígenos diferentes ao do LPS (Chaudhuri et al., 2010; Bulashev et al., 2019). A proteína BP26 foi identificada como uma proteína antigênica em animais infectados por *Brucella* spp. e estudada como promissor antígeno para prevenir resultados falso-positivos já que não apresenta reatividade cruzada com qualquer outra bactéria gram-negativa, além de induzir produção de anticorpos em uma proporção significativa dos animais infectados (Debbbarh et al., 1996; Letesson et al., 1997; Chaudhuri et al., 2010; Kim et al., 2013; Ducrotoy et al., 2016).

A busca por testes de diagnósticos mais simples e acurados que possam ser utilizados fora do ambiente laboratorial, testes *point-of-care*, por exemplo, tem sido uma tendência global em função de resultados rápidos e de custo baixo (Hobbs et al., 2021). Geralmente, tais testes consistem de dispositivos portáteis, fáceis de usar, com tempo de resposta do resultado em menos de uma hora. Existem muitos formatos diferentes, sendo que os testes rápidos imunocromatográficos de fluxo lateral (TRIFL), são exemplos bastante conhecidos desse tipo de teste (Hobbs et al., 2021)

Este estudo objetivou avaliar os desempenhos analítico e diagnóstico de um TRIFL que utiliza como antígeno uma proteína BP26 recombinante (rBP26-TRIFL) para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina em diferentes condições epidemiológicas tendo como referência soros

previamente caracterizados pelos testes AAT e SAL/2-ME, bem como a sua aplicabilidade como teste complementar aos testes oficiais preconizados pelo PNCEBT.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho do teste rBP26-TRIFL tomando como referência testes preconizados pelo PNCEBT aplicados em amostras de soro de bovinos para o diagnóstico da brucelose.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a sensibilidade analítica (ASe) e a especificidade analítica (ASp) do teste rBP26-TRIFL frente a soros de bovinos previamente caracterizados nos testes AAT e SAL/2-ME.
2. Avaliar a sensibilidade diagnóstica (DSe), especificidade diagnóstica (DSp) e a concordância dos resultados do teste rBP26-TRIFL com os testes AAT, SAL/2-ME em amostras de soros provenientes de rebanhos oriundos de diferentes regiões do território brasileiro.
3. Avaliar a aplicabilidade do rBP26-TRIFL como teste complementar aos testes oficiais preconizados pelo PNCEBT.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Gênero *Brucella*

As bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* são cocobacilos gram-negativos, intracelulares facultativos, imóveis, com capacidade de sobreviver e multiplicar dentro de macrófagos favorecendo a natureza crônica da infecção (Gorvel et al., 2002; Cutler et al., 2005; El-Sayed e Awad, 2018; Roop et al., 2021).

Brucella spp. pertencem a subdivisão 2 α da classe das Proteobactérias (Moreno et al., 2002; Christopher, et al., 2010; Von Bargen et al., 2012; El-Sayed e Awad, 2018; Leclercq et al., 2020). Estudos genômicos indicam que a família Brucellaceae apresenta relação evolutiva com patógenos de planta ou simbiontes (El-Sayed e Awad, 2018), com aquisição de genes de virulência que permitiram sua multiplicação e sobrevivência no organismo hospedeiro (Christopher, et al., 2010; Fitch, 2010; Scholz et al., 2013; El-Sayed e Awad, 2018). Em função da alta similaridade genômica entre as espécies (acima de 95%) foi proposta a reclassificação

do gênero como monoespecífico. Entretanto, baseado nas relevantes diferenças epidemiológicas das principais variantes da bactéria e seus hospedeiros preferenciais o gênero *Brucella* foi reconhecido como sendo constituído de seis espécies clássicas com seus respectivos biovars, a saber: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* e *B. canis* (Moreno et al., 2002; WOA, 2022). Atualmente, 12 espécies são conhecidas (Tabela 1). Dentre as espécies clássicas, as mais patogênicas para o homem são *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis*, nessa ordem (Von Bargen et al., 2012; El-Sayed e Awad, 2018). As espécies geralmente são classificadas de acordo com os seus hospedeiros preferenciais aos quais são altamente adaptadas. Entretanto, a transmissão para outros hospedeiros, inclusive o homem, pode ocorrer (Moreno et al., 2002; Scholz et al., 2013; El-Sayed e Awad, 2018). Ao longo dos anos, novas espécies foram sendo acrescentadas ao gênero (Moreno, 2021).

Tabela 1. Lista das diferentes espécies de *Brucella* e seus hospedeiros naturais. (Fonte: Adaptado de El-Sayed e Awad, 2018).

Espécies de <i>Brucella</i>	Tipo de colônia	Hospedeiro natural	Potencial zoonótico
<i>B. melitensis</i> (bv 1, 2 e 3)	Lisa	Caprino e ovino	+++
<i>B. abortus</i> (bv 1 a 6 e 9)	Lisa	Bovino	++
<i>B. suis</i> biovar			
1 e 3	Lisa	Suíno	++
2	Lisa	Javali selvagem, Lebre	+
4	Lisa	Rena, Caribu	++
5	Lisa	Roedor	-
<i>B. ovis</i>	Rugosa	Ovino	-
<i>B. neotomae</i>	Lisa	Rato do deserto	+
<i>B. canis</i>	Rugosa	Cão	+
<i>B. ceti</i>	Lisa	Golfinhos	+
<i>B. pinnipedialis</i>	Lisa	Focas	+
<i>B. microti</i>	Lisa	Ratazana selvagem	?
<i>B. inopinata</i>	Lisa	Humanos	++
<i>B. papionis</i>	?*	Babuínos	?
<i>B. vulpis</i>	?	Raposa vermelha	?
N.N.**	Lisa	Sapo	?

*?: Dado ainda não disponível

**N.N.: característica intermediária entre o ancestral associado ao solo das espécies de *Brucella* e as espécies de *Brucella* adaptadas ao hospedeiro conhecido.

Brucella spp., como todas bactérias gram-negativas, são constituídas de citoplasma circundado por um envelope celular composto por uma membrana interna, periplasma (constituído por uma mistura de peptidoglicanos e componentes solúveis) e uma membrana externa (Moriyón et al., 1998; Ducrottoy et al., 2016).

A membrana externa da bactéria é formada por duas classes principais de antígenos: LPS e proteínas de membrana externa (OMPs) (Cardoso et al., 2006; Ducrotoy et al., 2016). O LPS é composto de três componentes principais: lipídeo A, um núcleo de oligossacarídeo (core) e uma cadeia O de polissacarídeos (Figura 1). A cadeia O é a responsável principal pelo estímulo antigênico para resposta imune humoral (Smith, 2018; Stranahan et al., 2021). De acordo com a presença ou ausência da cadeia O do LPS, as espécies de *Brucella* são classificadas em lisas (S-LPS) e rugosas (R-LPS), respectivamente (Ducrotoy et al., 2016). O tipo de LPS predominante entre as diferentes espécies de *Brucella* é o liso, com duas exceções, *B. canis* e *B. ovis* que apresentam LPS naturalmente rugoso, ou seja, sem cadeia O (Roop et al., 2021). No diagnóstico da brucelose de ruminantes, o LPS e as proteínas de membrana externa (OMPs) são as classes de antígenos mais relevantes, sendo a primeira responsável por desencadear resposta imune humoral e a segunda indutora tanto de resposta humoral, quanto de resposta imune celular (Ducrotoy et al., 2016).

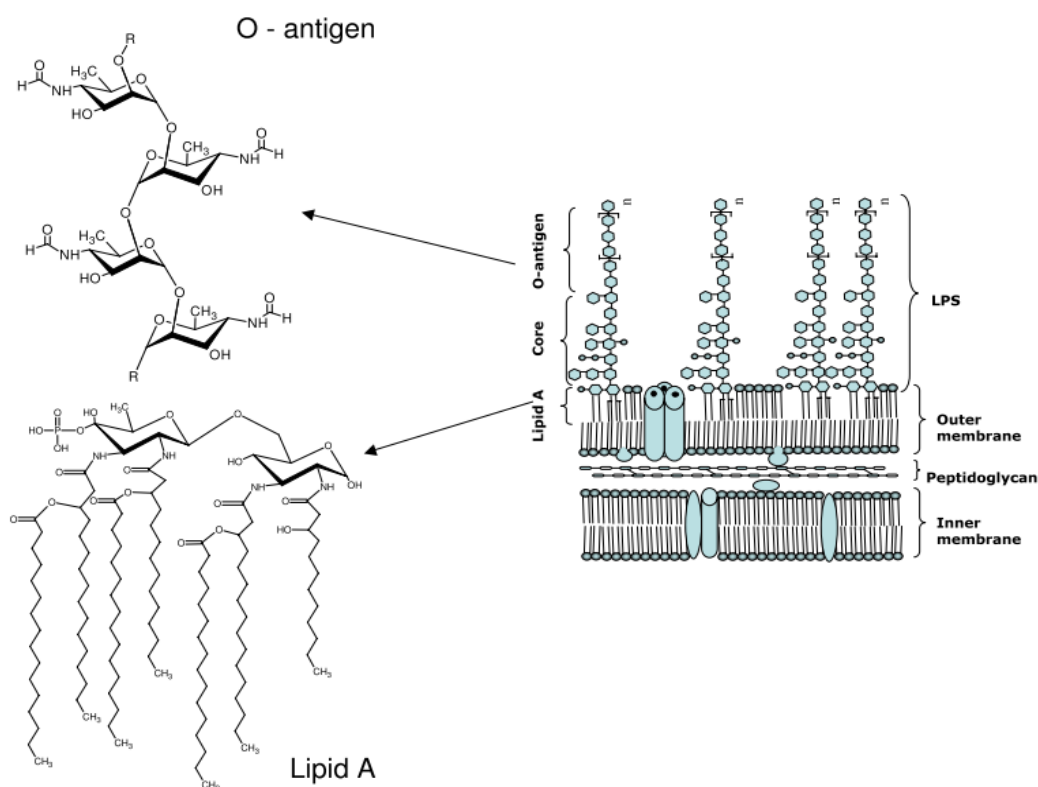


Figura 1. Estrutura esquemática do lipopolissacarídeo e membrana externa da *Brucella* spp. Fonte: Cardoso et al., 2006.

Como um dos principais fatores de virulência, o LPS da *Brucella* spp. pode ser caracterizado como não clássico quando comparado com o de outras bactérias gram-negativas,

principalmente por possuir baixa atividade endotóxica e ser fraco indutor de citocinas pró-inflamatórias no hospedeiro (Lamontagne, et al., 2009; Christopher, et al., 2010; Von Bargen et al., 2012).

A localização estrutural dos antígenos determina o nível de detecção dos anticorpos e a complexidade da interpretação dos resultados. Nas *Brucella* spp. lisas o acesso às OMPs é dificultado pela estrutura peculiar da cadeia O, que é constituída de longas repetições de motivos de açúcares em quase toda a superfície externa da bactéria (Ducrotoy et al., 2016).

A resposta sorológica após a infecção com espécies lisas de *Brucella* spp. é predominantemente direcionada contra o S-LPS (lipopolissacarídeo liso), mais precisamente a cadeia O, que é o principal antígeno quando comparado à outras moléculas antigênicas (Rossetti et al., 1996; Letesson et al., 1997; Cloeckart et al., 2002; Cardoso et al., 2006; Kumar et al., 2008; Chaudhuri et al., 2010; Christopher et al., 2010; Geresu e Kassa, 2016; Bulashev et al., 2019). A similaridade dos epítomos da cadeia O do S-LPS da *Brucella* spp. com outros organismos gram-negativos, como no caso da *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:9, *Escherichia coli* O157:H7 e espécies de *Salmonella*, podem afetar o desempenho dos testes diagnósticos em função de reações falso-positivas (Rossetti et al., 1996; Corbel, 1997; Letesson et al., 1997; Cardoso et al., 2006; Kumar et al., 2008; Chaudhuri et al., 2010; Christopher et al., 2010; Bulashev et al., 2019).

3.2 Brucelose

A brucelose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Brucella*. Considerada uma zoonose de importância global, a brucelose causa consideráveis prejuízos econômicos e sociais, em virtude do impacto que incide na produtividade dos rebanhos e riscos que acarreta à saúde humana levando a uma doença crônica e debilitante de difícil tratamento (Lage et al., 2008; Christopher, et al., 2010; Santos et al., 2013; De Figueiredo, 2015). O contato direto com animais doentes ou indireto, por meio de alimentos de origem animal representam as principais formas de transmissão da infecção ao homem (Seleem et al., 2010; Plumb et al., 2013; Moreno, 2014; El-Sayed e Awad, 2018).

A doença, desde a descoberta do agente causal em 1886, ainda permanece um grande problema em muitas partes do mundo, como regiões do Mediterrâneo, oeste asiático, partes da África e América Latina (Corbel, 2006; Cárdenas et al., 2019; González-Espinoza, 2021). Entretanto, em vários países, a doença foi erradicada ou controlada com base em um conjunto de medidas

veterinárias, de segurança alimentar e implementação de programas sanitários (Cutler et al., 2005; Poester et al., 2009; Moreno, 2014; Ferreira Neto et al., 2016; Moreno et al., 2022). O conhecimento da situação da doença nos animais alcança importância marcante já que representa o ponto focal para o controle da doença no homem (Corbel, 2006; Boschioli et al., 2001; Moreno et al., 2022).

Os bovinos, na maioria das vezes, são infectados com *B. abortus*, que resulta em doença cujo os principais sintomas clínicos são abortamento no terço final de gestação, mortalidade perinatal, infertilidade, redução na produção de leite e orquites/epididimite nos machos (Lage et al., 2008; Poester et al., 2009; Carvalho Neta et al., 2010; Poester et al., 2013; El-Sayed e Awad, 2018; WOAH, 2022). As lesões osteoarticulares também ocorrem com frequência em bovinos (Macedo et al., 2019). Em função do seu caráter zoonótico, a brucelose bovina tem que ser diferenciada de outras doenças que causam aborto. Fatores como idade, estado imunológico, idade reprodutiva, via e dose de infecção e virulência da cepa influenciam a infecção e manifestação clínica no rebanho (Carvalho Neta et al., 2010).

O controle da brucelose requer investimentos significativos, tanto financeiro quanto de infraestrutura e pessoal. A eventual presença ou o desconhecimento da prevalência da doença em reservatórios silvestres e o caráter silencioso da doença em função da falta de sintomas específicos dificulta o diagnóstico clínico, permitindo sua disseminação dentro dos rebanhos quando testes laboratoriais não são aplicados regularmente (Khan, et al., 2018; Cárdenas et al., 2019).

3.3 Patogênese e resposta imunológica do hospedeiro

Ao longo de milhares de anos, a maioria das espécies de *Brucella* evoluiu para um parasitismo intracelular facultativo, no qual o patógeno desenvolveu características para sua adaptação e sobrevivência dentro dos sistemas biológicos do hospedeiro, em contrapartida, o hospedeiro desenvolveu sistemas imunes inato e adquirido permitindo o controle da sobrevivência do patógeno, resultando na diversidade de lesões patológicas descritas (Adams, 2002). As portas de entrada preferenciais para *Brucella* spp. em animais e homem incluem mucosas dos trato respiratório, digestivo e trato genital (Adams, 2002; Gorvel et al., 2002; Von Bargen et al. 2012; Carvalho Neta et al., 2010; De Figueiredo et al., 2015) e, a partir daí, alcançando os linfonodos regionais disseminando para outros órgãos (Carvalho Neta et al., 2010; Von Bargen et al. 2012). As bactérias patogênicas utilizam uma variedade de fatores de virulência que as capacitam evadir da resposta imune do hospedeiro. A estrutura do LPS da *Brucella* spp. permite que não

seja prontamente reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro, conferindo à bactéria um fenótipo altamente resistente à peptídeos bactericidas e ser fraca ativadora do sistema de complemento (Barquero-Calvo et al., 2007). Barquero-Calvo et al. (2007) demonstraram, em experimento realizado no modelo camundongo inoculado intraperitoneal, que a *B. abortus* não induz alterações significativas de leucócitos e nem recrutamento de células polimorfonucleares (PMN) além de atrapalhar a degranulação dessas células. Observaram ainda níveis insignificantes das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 após infecção, entretanto, esse nível de indução de citocinas foi dependente da dose infectante inicial.

Vários estudos *in vitro* vêm sendo realizados para a compreensão dos mecanismos de adesão, internalização, tráfego intracelular, sobrevivência e replicação da *Brucella* spp. nos hospedeiros susceptíveis (De Figueiredo et al., 2015).

De forma geral, a *Brucella* spp. após a adesão e fagocitose pelas células de defesa do hospedeiro inicia uma cascata de eventos induzindo um rearranjo da membrana celular do hospedeiro ao seu redor permitindo a sua migração pelo epitélio com o mínimo de resposta imune inata pelo fraco estímulo de atividade pró-inflamatória. Entretanto, após a fagocitose, a *Brucella* spp., passa por um período de adaptação ao meio intracelular, no qual em torno de 10% ou menos das bactérias internalizadas, sobrevivem (Barquero-Calvo et al., 2007; De Figueiredo et al., 2015). Dentro das células fagocíticas, as *Brucella* spp. sobrevivem em compartimentos especiais denominados vacúolos contendo *Brucella* (BCV) que servem como proteção para que consigam trafegar intracelularmente e se replicarem sem ser destruídas pelo sistema de defesa do hospedeiro (Lamontagne al., 2009; De Figueiredo et al., 2015), estabelecendo uma infecção duradoura (Cardoso et al., 2006; Barquero-Calvo et al., 2007). Esse tráfego celular é realizado por meio da inibição da fusão do BCV com o lisossomo e pela aquisição de marcadores celulares que permitam que cheguem até o seu nicho replicativo no retículo endoplasmático rugoso (De Figueiredo et al., 2015).

Sabe-se que o microambiente dentro desses vacúolos caracteriza-se pela disponibilidade de nutrientes limitada e baixa tensão de oxigênio, onde as *Brucella* spp. têm que se adaptar por meio de estratégias como fatores de virulência e/ou componentes imunorreguladores que permitirão sua sobrevivência e persistência prolongada no organismo do hospedeiro (De Figueiredo et al., 2015). Vários são os fatores de virulência responsáveis por esses eventos de adesão, tráfego intracelular, sobrevivência e estabelecimento de infecção crônica. Entre eles, o sistema de secreção do tipo 4 (T4SS) se destaca como o responsável pelo tráfego intracelular (De Figueiredo et al., 2015). Estudos mostram que a falta do T4SS altera o estilo de vida

“discreto” da *Brucella* spp. propiciando o não estabelecimento do nicho replicativo e, consequentemente da infecção duradoura.

Após o período de adaptação dentro do BCV, a *Brucella* spp. recupera sua atividade normal inclusive a de replicação, estabelecendo a disseminação para outras células e tecidos preferenciais, tais como, trofoblastos, pulmão fetal, testículo, endotélio, sistema reticuloendotelial (Carvalho-Neta et al., 2008; De Figueiredo et al., 2015).

3.4 Diagnóstico

A caracterização adequada da ocorrência e epidemiologia da brucelose bovina, assim como, o seu controle e erradicação são questões importantes de saúde pública e dependente da utilização criteriosa dos testes de diagnóstico (McGiven, 2013; Geresu e Kassa, 2016). Devido ao fato de os sinais clínicos não serem patognômicos, o diagnóstico da brucelose bovina sempre requer confirmação laboratorial, seja por isolamento ou demonstração da presença de anticorpos específicos direcionados contra a bactéria (Manat et al., 2016).

O isolamento da bactéria a partir de amostras coletadas do hospedeiro é considerado padrão ouro para a definição do *status* de infecção verdadeiramente positivo (Alton et al., 1988; Ducrottoy et al., 2018). Entretanto, o isolamento possui baixa sensibilidade, além da necessidade de instalações laboratoriais com nível 3 de biossegurança e pessoal treinado (Alton et al., 1988; Geresu e Kassa, 2016), sendo inviável para uso em larga escala. Atualmente, vários testes sorológicos estão disponíveis e podem ser utilizados como triagem ou como testes confirmatórios (Tyler et al., 1998; Kaltungo et al., 2014; Geresu e Kassa, 2016). Contudo, nenhum teste sorológico é capaz de definir corretamente o *status* de infecção de um animal. O conhecimento da sensibilidade e da especificidade de cada teste sorológico ajuda a definir seu uso nos cenários epidemiológicos variados. Geralmente os testes de triagem apresentam uma maior sensibilidade para conseguir detectar o maior número de animais infectados. Já os testes confirmatórios são mais específicos e conseguem minimizar as reações falso-positivas (Tyler et al., 1998; Adone e Pasquali, 2013).

A maioria das técnicas sorológicas utilizadas atualmente para o diagnóstico da brucelose bovina é baseada na detecção de anticorpos contra a cadeia O do LPS, que é a estrutura antigênica mais exposta da membrana externa e também imunodominante na resposta humoral do hospedeiro infectado (Rossetti et al., 1996; Cloeckert et al., 2002; Cardoso, et al., 2006; Kim et al., 2013). Entretanto, a cadeia O do LPS da *Brucella* spp. é muito semelhante à de outras bactérias gram-negativas, como é o caso da *Y. enterocolitica* O:9, podendo levar a reações sorológicas falso-

positivas (Corbel, 2006; Poester et al., 2010; Bai et al., 2021). Associado a esse problema, os testes que utilizam o LPS como antígeno não conseguem diferenciar animais vacinados com amostra B-19 de animais naturalmente infectados (Chaudhuri et al., 2010; Kim et al., 2013; Ducrotoy et al., 2016).

A cadeia O induz resposta imune em bovinos com produção inicial de imunoglobulina do isotipo M (IgM), que pode mediar também reações sorológicas inespecíficas. Em seguida, são induzidos anticorpos dos isotipos IgG1, IgG2 e IgA. Sendo que a IgG1 é o principal isotipo envolvido na maioria dos testes sorológicos. A IgG2 e a IgA são isotipos que aparecem em proporções menores e mais tardiamente comparada com a IgG1 (Carvalho Neta et al., 2010).

Desde 1897, um número considerável de testes sorológicos vem sendo desenvolvido e modificado com o intuito de melhorar seu desempenho diagnóstico para brucelose (Nielsen, 2002; McGiven, 2013). Nos últimos 10 anos, a identificação e utilização de proteínas antigênicas para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico livres do S-LPS tornou-se um assunto comum no estudo da imunologia da brucelose (Kumar et al., 2008; Chaudhuri et al., 2010; McGiven, 2013; Poetsch et al., 2020).

Várias proteínas das *Brucella* spp. têm sido descritas como alvos da resposta imune durante a infecção, sejam elas, proteínas de membrana externa (OMPs) ou citoplasmáticas (Debarh et al., 1996; Letesson et al., 1997; Warreth et al., 2016). Na maioria dos casos, o objetivo é identificar antígenos diferentes do LPS que possam ser úteis no diagnóstico, contornando as desvantagens da utilização do LPS (Chaudhuri et al., 2010; Bulashev et al., 2019).

As OMPs das *Brucella* spp. foram primeiramente identificadas na década de 80 e divididas em três grupos (1, 2 e 3) de acordo com a massa molecular aparente como proteínas do grupo 1 (88 a 94 kDa) que parecem estar relacionadas à biogênese da membrana externa, grupo 2 proteínas porinas (36-38 kDa) e do grupo 3, que compreendem um conjunto de proteínas variando de 31-34 kDa e 25-27 kDa, cuja função ainda é desconhecida (Cloekaert et al., 1992; Moriyón et al., 1998; Cloekaert et al., 2002; Kim et al., 2013; Ducrotoy et al., 2016; Manat et al., 2016).

Vários estudos utilizando *Western Blotting* (WB) têm demonstrado imunorreatividade contra diferentes proteínas da bactéria localizadas tanto na membrana celular, periplasma e citoplasma e com resposta de anticorpos bastante heterogênea bovinos, ovinos e caprinos (Letesson et al., 1997), reforçando a ideia de que a combinação de diferentes proteínas levaria a testes diagnósticos mais satisfatórios (Letesson et al., 1997; Bulashev et al., 2019).

Com o avanço das técnicas na área da biotecnologia foi possível o emprego das OMPs recombinantes (rOMPs) utilizadas como antígenos em testes de diagnósticos em substituição aos antígenos baseados em S-LPS e proteínas purificadas, evitando riscos biológicos associados à manipulação de cepas de *Brucella* spp. e as desvantagens atribuídas ao S-LPS ou à contaminação do antígeno proteico com o S-LPS (Cardoso et al., 2006; Kumar et al., 2008; Bulashev et al., 2019). Uma das vantagens da utilização das proteínas recombinantes em testes diagnósticos seria permitir uma melhor padronização do antígeno quando comparado às técnicas tradicionais (Navarro-Soto et al., 2015). A necessidade de pesquisar tipos diferentes de moléculas imunorreativas para diminuir resultados imperfeitos, que possam comprometer o controle e a erradicação da doença e agregar informação, é estratégica e de extrema importância no desfecho final da interpretação dos resultados (Navarro-Soto et al., 2015).

O grupo das rOMPs mais estudadas incluíram as rOMP25 e rOMP31. Outro grupo de proteínas recombinantes e de grande interesse do ponto de vista de diagnóstico foi composto pelas proteínas periplasmáticas: rBP26 ou rOMP28 e a dismutase superóxido Cu-Zn (rSOD), cujo valor diagnóstico ainda é pouco explorado (Bulashev et al., 2019).

Apesar desses estudos, o que se observa é a dificuldade da identificação de uma proteína exclusivamente imunodominante, associado ao fato de que a intensidade de resposta imune ser menor comparada com a resposta para a cadeia O. Pesquisas indicam que a resposta humoral para as proteínas é mais tardia em relação à da cadeia O, aumentando com a cronicidade da doença (Letesson et al., 1997; Ducrotoy et al., 2016; Bulashev et al., 2019).

A OMP 28, pertencente ao grupo 3, é conservada no gênero *Brucella*. Sua sequência transmembrana é chamada de BP26, também conhecida como CP28, identificada como uma importante proteína imunorreativa nos animais infectados por *Brucella* spp. Potencialmente, a BP26 parece desempenhar função antigênica protetora promovendo respostas tanto humoral quanto celular (Rossetti et al., 1996; Kim et al., 2013). A BP26 tem sido reportada como promissor antígeno para utilização em contexto epidemiológico de animais falso-positivos já que não apresenta reatividade cruzada com qualquer outra bactéria gram-negativa, além de induzir produção de anticorpos em uma proporção significativa dos animais infectados (Debbarh et al., 1996; Letesson et al., 1997; Chaudhuri et al., 2010; Ducrotoy et al., 2016).

Nos últimos anos, testes simples, rápidos e sensíveis para a brucelose bovina vêm sendo desenvolvidos em várias partes do mundo cujo o desafio é aumentar a especificidade a partir de antígenos alternativos ao S-LPS que não reajam cruzadamente com outras bactérias gram-

negativas e nem com animais vacinados com a cepa lisa da *B. abortus* (B19) (McGiven, 2013). A detecção de anticorpos contra *Brucella* spp. baseada em TRIFL, desenvolvidos sem a necessidade de insumos específicos e estrutura laboratorial, podendo ser conduzidos a campo, compreendem um dos métodos acima citado. A técnica consiste de um antígeno impregnado em uma tira de nitrocelulose, que pode ser LPS ou uma proteína específica recombinante. Os anticorpos, se presentes na amostra, são capturados pelo antígeno fixado e, a partir de um sistema revelador, permite a visualização de uma banda específica juntamente com a banda de controle interno esperado para validação da reação. Dessa forma, a interpretação do resultado é direta, sem necessidade de preparação da amostra e a leitura é realizada, na maioria das vezes, em torno de 10 a 20 minutos (Abdoel et al., 2008; Quintero et al., 2018; Barshevskaya et al., 2019).

3.5 Avaliação de desempenho de testes de diagnóstico

A Instrução Normativa SDA nº 10 de 03 de março de 2017 (Brasil, 2017), no seu artigo nº 30, prevê que outros testes de diagnóstico, sejam eles, diretos e indiretos poderão ser utilizados para complementar ou mesmo substituir os testes especificados nesta norma. Entretanto, os critérios para validação desses testes ainda não foram definidos.

Os testes de diagnóstico apresentam importantes aplicações na medicina veterinária, tais como, estudos soropidemiológicos, atividades de vigilância, certificação de propriedades e estimativas de prevalência (Greiner et al., 2000a). A demonstração da infecção, direta ou indiretamente, é crucial dentro de qualquer programa de controle e erradicação de doenças para que medidas de controle e estratégias sanitárias possam ser adotadas, em nível nacional ou internacional (Banoo et al., 2010). Além disso, informações derivadas de testes diagnósticos, muitas vezes, desempenham papel importante na avaliação quantitativa de risco, na modelagem de doenças infecciosas (Greiner et al., 2000a) e na vigilância baseada em risco (Santos et al., 2014).

Atualmente, em vários países, existe crescente interesse dos órgãos oficiais de saúde animal, na validação de testes diagnósticos para determinação apropriada de seus desempenhos em diferentes cenários epidemiológicos, em função de questões comerciais, regionalização e restrições orçamentárias geralmente associadas às ações de vigilância e monitoramento (Greiner et al., 2000b).

A validação é um processo que determina a adequação de um teste de diagnóstico para um uso pretendido, uma vez que o mesmo tenha sido adequadamente desenvolvido, otimizado e padronizado. Um teste sorológico, por exemplo, é considerado validado quando produz resultados com confiança estatística, já que, a partir dos resultados obtidos, inferências quanto ao *status* de infecção dos animais podem ser realizadas (Jacobson, 1998; Greiner et al., 2000b; Banoo et al., 2010; Gardner et al., 2019).

Importante ressaltar que estimativas de desempenho diagnóstico como acurácia, sensibilidade e especificidade não são características unicamente intrínsecas dos testes de diagnóstico (Berkevins et al., 2006). Muitas vezes são valores estimados a partir de amostras extraídas de populações heterogêneas (ou subpopulações) e, portanto, podem não refletir a variabilidade de espectro da doença dentro da população (Gardner et al., 2019). Essas medidas de desempenho variam em função de fatores externos, ou seja, ao usar um teste diagnóstico na população de interesse, as características daquela população devem ser levadas em consideração (Berkevins et al., 2006), como estágio da infecção (fase pré-clínica ou clínica), vacinação, carga do patógeno no hospedeiro, reação cruzada com outros microrganismos, características do hospedeiro (idade, sexo, espécie), qualidade e pureza dos reagentes (anticorpos monoclonais e antígenos expressos em vetor, recombinantes), protocolos do teste (desenho de iniciadores para detecção de sequências de ácido nucleico do patógeno, ponto de corte em testes quantitativos). Todos, são exemplos de fatores externos que podem levar a erros sistemáticos que comprometem a validade das estimativas (Greiner et al., 2000a; Gardner et al., 2019).

Doenças de evolução crônica, e assintomáticas, como é o caso da brucelose apresentam desafios importantes em estudos de acurácia diagnóstica, resultando em grande variação nas estimativas de sensibilidade e especificidade entre testes semelhantes (Nielsen et al., 2011; McGiven, 2013).

A demanda por desenvolvimento de plataformas de diagnóstico mais modernas baseadas em biotecnologia, capazes de diagnosticar precocemente doenças infecciosas, vêm ganhando espaço na medicina veterinária, em função da necessidade de resultados mais confiáveis, garantindo a saúde dos animais e dos seres humanos (WOAH Cap. 3.1.4, 2022). O recente desenvolvimento tecnológico levou à proliferação de novos testes de diagnósticos mais rápidos e promissores, para uma melhor gestão e controle das doenças infecciosas. Se esses testes são apropriados para serem aplicados em diferentes cenários epidemiológicos, são questões que somente poderão ser respondidas após uma adequada avaliação clínica nas populações-alvo (Banoo et al., 2010).

A validação de um teste diagnóstico proposto no *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* WOA (World Organization for Animal Health), capítulo 1.1.6 (2022), descreve caminhos compreendidos pelas etapas de elaboração e desenvolvimento do projeto de acurácia diagnóstica, validação propriamente dita e a sua manutenção. A etapa de validação é composta por quatro estágios (Figura 2). Os três primeiros compreendem a avaliação das características analíticas do teste, ASe e ASp, características diagnósticas, compostas pelas DSe e DSpe, e reprodutibilidade dos resultados em diferentes laboratórios.

A WOAH considera um método validado, após o cumprimento desses três estágios, demonstrando que o ensaio está apropriado para seu uso conforme foi originalmente delineado (Jacobson, 1998; Gardner et al., 2019; WOAH Cap. 1.1.6., 2022).

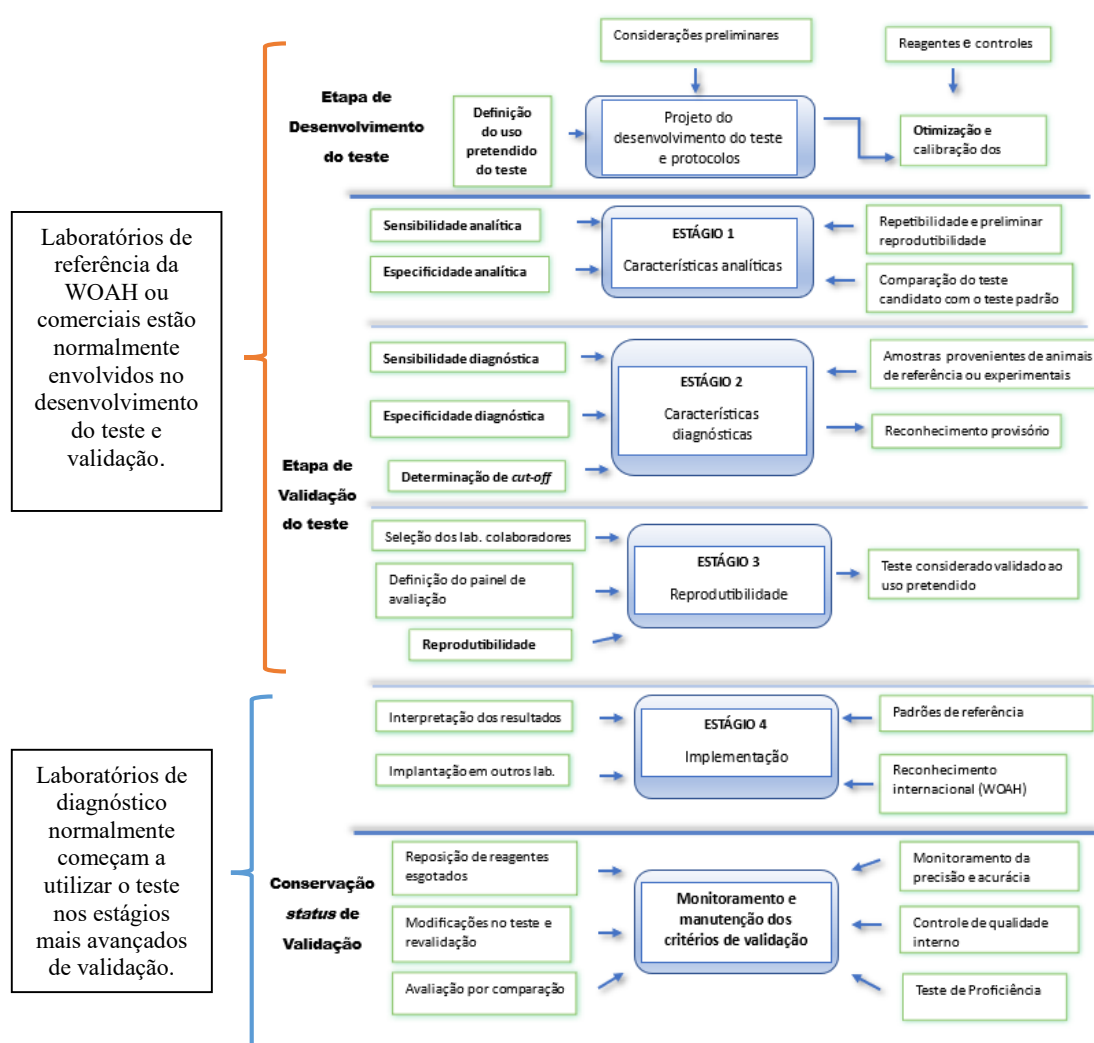


Figura 2. Caminhos para validação de um teste de diagnóstico (Fonte: WOA (World Organization for Animal Health) Cap. 1.1.6 do Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals).

O principal motivo de padronização dos estudos de acurácia diagnóstica é minimizar o risco de erros sistemáticos nas estimativas de DSe e DSp a depender da finalidade específica, por exemplo, se triagem, confirmatório ou vigilância (Gardner et al., 2019). Por exemplo, se amostras provenientes de animais com problemas reprodutivos e aborto causados por *B. abortus* (casos agudos) forem utilizadas como população fonte, quando o teste for usado para fins de vigilância, as estimativas de DSe e DSp deste estudo, provavelmente, estarão superestimadas já que o objetivo primário de um teste de vigilância seria a triagem de animais saudáveis. Desta maneira, estimativas de desempenho a partir de uma população de animais com a doença ativa não seriam adequadas para uso em vigilância na população geral. Nessa situação, testes validados em populações de animais com situação similar seriam mais apropriados (Gardner et al., 2019). Dessa forma, a compreensão de um erro sistemático dentro de um estudo de acurácia permite inferências úteis sobre as DSe e DSp (Gardner et al., 2019).

Idealmente, estudos de acurácia diagnóstica deveriam ser baseados em amostras coletadas a partir de população fonte de animais em seu cenário natural a qual irá refletir a complexidade do agente, do hospedeiro e das interações com o ambiente (Gardner et al., 2019). A seleção de animais referência requer que importantes variáveis da população alvo sejam representadas nos animais amostrados, sejam elas, infecção ou exposição ou que nunca tenham sido infectados ou expostos (WOAH, cap. 1.1.6, 2022).

Assim, algumas condições devem ser consideradas no processo de amostragem. A obtenção de um número suficiente de amostras verdadeiramente positivas pode ser problemática quando determinada pelo isolamento do agente (WOAH, cap. 1.1.6, 2022). Soros oriundos de animais dos quais a *B. abortus* foi isolada representam uma boa fonte de amostras bem caracterizadas que podem ser utilizadas como referência para a determinação da sensibilidade de um teste (Gall et al., 2004). Na ausência de isolamento bacteriano, outros métodos, tais como, outro teste sorológico ou combinação de testes com estimativas de sensibilidade e especificidade conhecidas, podem ser utilizados para a definição do *status* sanitário dos animais, servindo como referência para avaliação das sensibilidades e especificidades de novos testes (Gall et al., 2004; WOA, cap. 1.1.6, 2022).

Entretanto, o isolamento bacteriano não deve ser utilizado para determinação da especificidade de um teste diagnóstico devido ao fato da ausência de isolamento em alguns animais mesmo estando infectados (Gall et al., 2004). Várias razões podem estar envolvidas, a saber, armazenamento inadequado das amostras, seleção de tecidos inadequados enviados para o

isolamento, quantidade insuficiente de tecido ou seleção de tecido não infectado (Gall et al., 2004).

Amostras verdadeiramente negativas podem ser obtidas a partir de regiões ou zonas onde a doença foi erradicada ou de populações onde a condição nunca foi relatada. Critérios epidemiológicos como, *status* sanitário oficialmente livre de brucelose de um país, são amplamente utilizados para selecionar populações de animais verdadeiramente negativas (Ducrotoy et al., 2018). No entanto, a DSe e a DSp são população-específicas, em função da existência de diferentes fatores que variam entre as populações, tais como: diferenças no manejo, proporção macho/fêmea, distribuição etária, raça, períodos reprodutivos, frequência de exposição ao patógeno, outras infecções, vacinação, dentre outros e, por essa razão, devem ser interpretadas levando em consideração esse tipo de viés metodológico (Ducrotoy et al., 2018).

Amostras originadas a partir de uma população animal fonte podem não estar disponíveis em número suficiente para avaliação rigorosa e caracterização das DSe e DSp, por exemplo, para doenças que apresentam baixa prevalência ou que não são representativas da população alvo, produzindo erros sistemáticos nas estimativas de desempenho (Gardner et al., 2019; Gifford et al., 2021).

A utilização de amostras provenientes de animais que já foram previamente caracterizadas como positivas ou negativas por um ou mais testes utilizados como referência é comum. No entanto, testes sorológicos não são considerados padrão ouro e, essa situação deve que ser levada em consideração quando da avaliação de sensibilidade e especificidade diagnósticas de um novo teste (Nielsen et al., 2011; Gifford et al., 2021).

A utilização de amostras representativas de determinada doença levando em conta efeitos do hospedeiro, do agente infeccioso e do ambiente seria a melhor amostragem a ser obtida para análise de desempenho de novos testes (Gardner et al., 2019). Entretanto, a utilização de fontes de amostras provenientes de bancos de soros ou a partir de amostras experimentais é uma realidade devido à facilidade de obtenção, ao *status* sanitário de infecção conhecido, por ser a única fonte de obtenção de amostras positivas em um país livre de determinada doença e pelo alto grau de certeza em relação ao *status* de infecção verdadeiro dos indivíduos infectados experimentalmente. A qualidade e a representatividade de amostras de referência estocadas em bancos, podem gerar alguns inconvenientes como: falta de rastreabilidade ou informação incompleta das amostras depositadas. Os resultados oriundos desse tipo de amostra podem ainda não refletir a realidade de campo das diversas situações existentes, produzindo

estimativas enviesadas de DSe e DSp (Gardner et al., 2019). As amostras obtidas experimentalmente também podem levar a estimativas enviesadas por não refletir a infecção natural em função da aplicação de múltiplas doses ou da via de aplicação do agente infeccioso. A dose e a via de aplicação poderiam estimular, por exemplo, respostas diferentes daquelas causadas pela infecção natural, além da desvantagem geralmente de se obter número reduzido de amostras (Gardner et al., 2019; Gifford et al., 2021).

A presença de animais vacinados pode interferir na avaliação do desempenho dos testes de diagnóstico em função da reação cruzada entre a amostra vacinal e as amostras de campo, sendo uma variável que deve estar bem caracterizada quando da avaliação de desempenho de testes diagnósticos (Gall et al., 2004).

O tamanho amostral é outra variável que teria efeito sobre os valores de DSe e DSp obtidos. Dependendo da quantidade de amostras disponíveis para a avaliação de desempenho de um teste diagnóstico, características da doença como, presença de animais nas diferentes fases da doença, pré-clínica, clínica, animais assintomáticos, anérgicos podem não ser representativas da população alvo, levando a viés de espectro, isto é, falta de representatividade do espectro de gravidade da doença para determinada condição alvo (Gall et al., 2004; Roever, 2016).

A sensibilidade e a especificidade de um teste geralmente são determinadas por meio da comparação direta com um teste referência, frequentemente referido como padrão ouro, que determina o estado de doença dos animais sem margem de erro (Enoe et al., 2000). O problema é que a disponibilidade de um teste padrão ouro com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade praticamente não existe para a maioria das doenças infecciosas crônicas (Enoe et al., 2000; Toft et al., 2005). Diante disso, a utilização de uma combinação de testes de referência imperfeitos (padrão de referência composto) oferece uma alternativa para classificação de indivíduos como infectados/doentes e não infectados/saudáveis (Gardner et al., 2019). Quando uma combinação de pelo menos dois testes é usada, os resultados para um dado indivíduo podem ser interpretados em série (somente animais que deram positivos em ambos testes serão considerados positivos) ou em paralelo (animais que testarem positivos para um dos testes ou ambos serão positivos) (Sanogo et al., 2014). No entanto, quanto maior o número de testes utilizados para classificar amostras, maior a probabilidade de, pelo menos, um deles dar resultado positivo podendo levar viés das estimativas de DSe ou DSp (Gardner et al., 2019).

Os resultados de uma avaliação de desempenho de um novo teste, na ausência de um teste padrão ouro, devem estar claramente definidos e podem ser comparados com os testes

existentes usando uma tabela de contingência (2 x 2), que demonstra como as amostras estarão classificadas para cada teste. Os valores de concordância de positivos e negativos assim como os valores discordantes entre os testes podem ser derivados dessa tabela (Banoo et al., 2010).

Em função da dificuldade de obtenção de um teste padrão-ouro para a definição direta dos parâmetros de desempenho de um teste diagnóstico, o emprego de modelos bayesianos de classe latente é uma alternativa que poderia contornar essa situação (Enoe et al., 2000). Esse tipo de abordagem permite a geração de um grande número de dados com a vantagem de permitir a comparação direta entre resultados de diferentes trabalhos, já que as informações de trabalhos anteriores podem ser utilizadas como informações *a priori* para trabalhos posteriores, permitindo constante atualização das estimativas. Como desvantagens, requer a construção de modelos probabilísticos, necessidade de atender algumas condições para a identificação de modelos, dificuldade de obtenção de informação a priori e cálculo da amostragem (Berkevans et al., 2006; Johnson et al., 2019).

Apesar dos inúmeros desafios econômicos, de logística, de pessoal e de tempo, a validação adequada de um teste diagnóstico, minimiza a chance de falhas e aumenta a possibilidade do sucesso da transferência de tecnologia e implementação em qualquer laboratório de diagnóstico. Dentro desse contexto, a validação de novos métodos é fundamental para fornecer ao usuário, o conhecimento e as garantias das características de desempenho, permitindo melhor a utilização de seus resultados como suporte a programas de controle e erradicação de doenças, levando a importantes implicações no manejo das enfermidades e criando alternativas para seu uso nos diferentes contextos epidemiológicos existentes.

3.6 Controle e erradicação da brucelose bovina no Brasil

A brucelose bovina é uma enfermidade enzootica no Brasil, ocorrendo em todos os estados da Federação, porém com marcadas diferenças de prevalência, indo desde a falta total de conhecimento sobre a prevalência da doença até a baixíssima prevalência no estado de SC de 0,9% (Figura 3) (Lage et al., 2008; Ferreira Neto et al., 2016). Em 2001, foi instituído o PNCEBT pelo Ministério da Agricultura e Pecuária que reconheceu a doença como problema de saúde animal e saúde pública no Brasil (Brasil, 2006).

Dessa forma, foram estruturadas ações para o controle da doença a fim de diminuir o impacto negativo dessa zoonose na saúde humana e animal e de promover a competitividade da pecuária nacional (Brasil, 2006; Ferreira Neto et al., 2016). Inicialmente, as estratégias adotadas pelo

PNCEBT para o controle da brucelose foram a vacinação de bezerras entre 3 a 8 meses de idade com amostra B-19 e o controle de trânsito animal, teste e sacrifício de animais infectados, além da certificação voluntária de propriedades como livres e controladas (Brasil, 2004). A aplicação de testes sorológicos para o conhecimento das prevalências da brucelose bovina dentro do território nacional, para fins de garantia na introdução de novos animais nas propriedades e para fins de trânsito e exposições também constituía uma das medidas propostas (Poester et al, 2002).

Em 2001, iniciaram-se os primeiros inquéritos soropidemiológicos nos diferentes estados brasileiros. Após 10 anos de instituição do programa, novos inquéritos foram realizados para verificar a efetividade das ações realizadas desde a implantação do programa, permitindo a avaliação crítica das condutas até então executadas (Ferreira Neto et al., 2016). Até a data atual, apenas seis estados brasileiros ainda não fizeram o inquérito soropidemiológico, resultando em prevalências desconhecidas (Figura 3) (Brasil, 2020).

Em 2017, o regulamento técnico do PNCEBT foi revisado e a estratégia de atuação do programa passou a ser baseada no grau de risco para brucelose determinados pela sua prevalência e pelo plano de ação de defesa sanitária animal a ser estabelecido por cada unidade federativa. Os estados passaram a ser classificados em classes de A a E conforme as prevalências de focos e em níveis, de 0 a 3, de acordo com a capacidade de execução das ações de defesa sanitária animal, propostas em seus planos de ação, medida ainda não implementada até a data atual (Tabela 2). Dessa forma, para que ocorra evolução do PNCEBT, naqueles estados classificados como E0 a E3 (risco desconhecido), a vacinação contra a brucelose com cobertura vacinal acima de 80% e estudo soropidemiológico da brucelose deverão ser, no mínimo, adotadas. Nos estados classificados como D e C, a vacinação contra brucelose com cobertura vacinal acima de 80% deverá ser adotada. Os estados com classificação B, a vacinação contra brucelose com cobertura vacinal acima de 80%, saneamento obrigatório dos focos detectados e vigilância epidemiológica para detecção dos focos deverão ser adotadas. E, por fim, os estados classificados como A3, a vigilância epidemiológica para detecção dos focos e as medidas de saneamento obrigatório dos focos detectados deverão ser adotadas (Brasil, 2017). A Tabela 1 resume a nova estratégia para a evolução do PNCEBT nos estados.

Tabela 2. Classificação de risco para brucelose dos estados brasileiros de acordo com a Instrução Normativa SDA nº 10 de 03 de março de 2017.

Prevalência de Focos (%)	Classe de acordo com a prevalência de focos	Nível de acordo com a capacidade de ação dos serviços oficiais de defesa sanitária animal			
		Inicial (0)	Qualidade da execução das ações		
			Baixa (1)	Média (2)	Alta (3)
< 2	A	A0	A1	A2	A3
> 2 < 5	B	B0	B1	B2	B3
> 5 < 10	C	C0	C1	C2	C3
> 10	D	D0	D1	D2	D3
Desconhecida	E	E0	E0	E0	E0

E0: Risco desconhecido

D0, D1, D2 e D3: Risco alto

C0, C1, C2 e C3: Risco médio

B0, B1 e B2: Risco baixo

B3, A0, A1 e A2: Risco Baixo

A3: Risco desprezível

Após 20 anos da implantação do PNCEBT no país, o que pode ser verificado é a efetividade das ações que resultaram na diminuição da prevalência da doença em vários estados, gerando informação técnica necessária para tomada de decisões sanitárias, minimizando prejuízos econômicos, desperdício de tempo e problemas de saúde pública (Brasil, 2020).

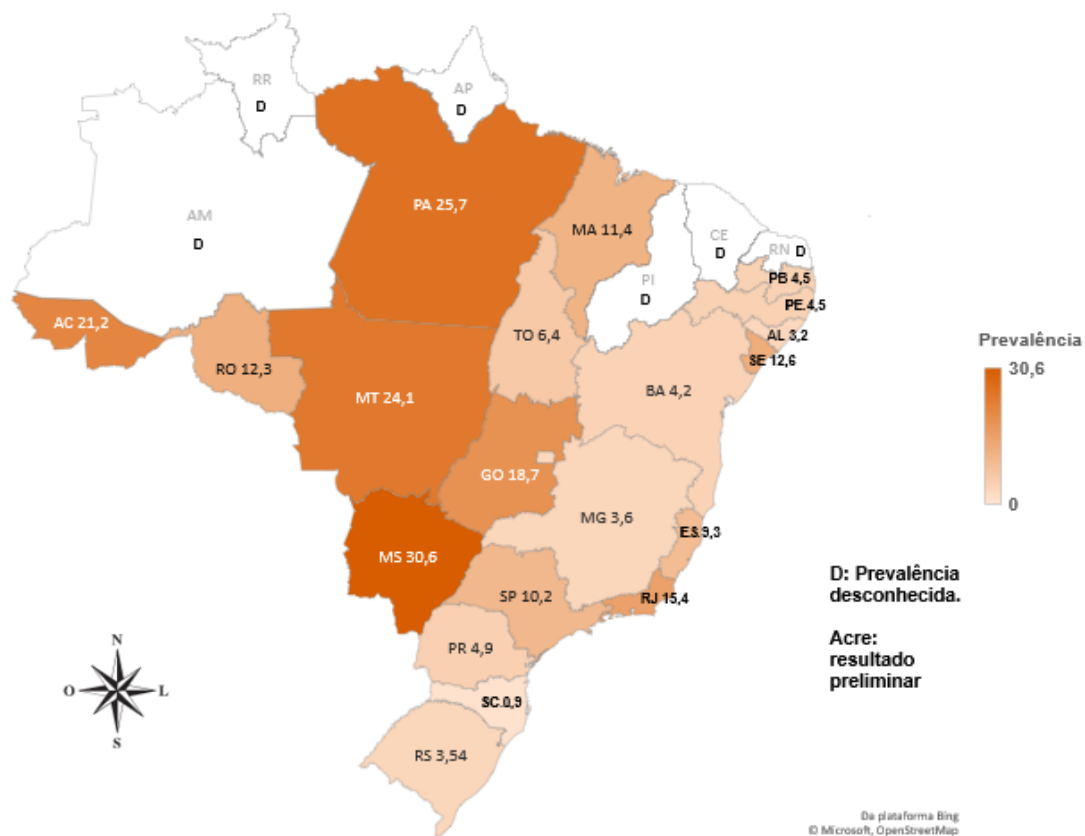


Figura 3. Prevalência de focos (%) da brucelose bovina nos estados brasileiros baseada nos dados dos últimos inquéritos soroepidemiológicos (Fonte: Adaptado Brasil, 2020). D: Prevalência desconhecida. Estado do Acre: resultado preliminar.

Dos testes preconizados pelo programa, o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), também conhecido como Rosa Bengala, é utilizado como teste de triagem. O AAT utiliza células totais de *B. abortus* como antígeno em pH 3,65. Trata-se de um teste de aglutinação cujo pH ácido tem como objetivo coibir a aglutinação da IgM e estimular a aglutinação da IgG1, reduzindo, assim as reações inespecíficas. O teste é simples de realizar e barato (Nielsen, 2002; Poester et al., 2010). O teste do anel em leite (TAL) também constitui um teste de triagem para brucelose bovina, entretanto, é utilizado para o monitoramento de estabelecimentos. É uma adaptação do teste de aglutinação utilizando o antígeno de células totais de *B. abortus* coradas com hematoxilina. O antígeno é adicionado no leite, se imunoglobulinas estiverem presentes haverá a formação de uma banda azulada no tubo (Nielsen, 2002; Poester et al., 2010).

Os testes sorológicos do 2-Mercaptoetanol (2-ME), Fixação de Complemento (FC) e Polarização Fluorescente (FPA) são utilizados pelo programa como testes confirmatórios (Nielsen, 2002; Poester et al., 2010). O 2-ME e a FC utilizam o antígeno baseado em células totais de *B. abortus*, entretanto, a função biológica de cada teste é diferente, enquanto o primeiro

mede aglutinação, o segundo mede a fixação do complemento, determinando em ambos, os títulos dos anticorpos presentes no soro dos animais. O teste de FPA utiliza como antígeno um fragmento da cadeia-O do LPS da *B. abortus* marcado com fluoresceína. Este teste utiliza uma leitora e kit próprios e o resultado é baseado em valores de milipolarização capturados pelo equipamento. A interpretação é quantitativa e dependente dos valores da média do controle negativo do kit (Nielsen, 2002).

3.7 Avaliação do potencial da proteína BP26 no diagnóstico da brucelose bovina

Cloeckaert e colaboradores (1992) avaliaram as respostas sorológicas por ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática), utilizando dois tipos de antígenos (S-LPS e OMPs), em amostras de soro de 20 bovinos oriundos de rebanhos naturalmente infectados nos quais a infecção foi confirmada pelo isolamento de *B. abortus*. Dos 20 animais 14 foram positivos nos testes sorológicos clássicos (SAL/AAT/FC). No ELISA S-LPS e OMPs, 17/20 (85%) e 14/20 (70%) dos animais foram positivos para brucelose, respectivamente. As OMPs utilizadas como antígenos foram as de massa molecular de 10; 16,5; 19; 25-27; 36-38 e 89 kDa. Os autores não observaram correlação entre as respostas contra S-LPS e proteínas. Dos 17 animais que apresentam reação no ELISA S-LPS, 13 também apresentaram reação contra uma ou mais proteínas avaliadas. Não houve reação cruzada com outras bactérias gram-negativas testadas por estes autores, dentre elas *Y. enterocolitica* O:9 e *E. coli*. Três dos 20 animais positivos com isolamento apresentaram anticorpos somente contra a OMP 25-27 kDa e nenhum anticorpo contra o S-LPS. Os resultados sugeriram que a resposta de anticorpos contra as proteínas varia de animal para animal e que uma combinação de várias OMPs seria necessária para a detecção de todos os animais que apresentaram anticorpos contra o S-LPS, sem o viés das reações inespecíficas.

Kumar e colaboradores (2008) com o objetivo de desenvolver um antígeno alternativo ao LPS em função da reatividade cruzada com outros microrganismos e questões relacionadas à biossegurança, desenvolveram um ELISA utilizando antígeno recombinante baseado na proteína periplasmática BP26 da *B. abortus*. Foram utilizadas 75 amostras de soro bovino (25 positivas e 50 negativas) caracterizadas previamente pelos testes convencionais (AAT, SAL e FC - fixação de complemento). O ELISA-rBP26 detectou todos os 25 soros positivos. Dos 50 soros negativos, 47 foram negativos no ELISA-rBP26. Na avaliação comparativa com o padrão referência a concordância foi de 96% (72/75) e as sensibilidade e a especificidade foram de

100% (25/25) e 94% (47/50), respectivamente. No entanto, os autores não informaram maiores detalhes sobre a origem das amostras ou isolamento de *Brucella* spp. nestas amostras.

Tiwari e colaboradores (2011) desenvolveram um ELISA utilizando um fragmento recombinante de 10kDa (r10-kDa-ELISA) da proteína B26 para o diagnóstico da brucelose bovina. Foram utilizados 408 soros de bovinos testados para AAT e SAL. As amostras de soro foram distribuídas em três grupos. O Grupo 1 foi composto por 70 soros provenientes de rebanhos saudáveis e sem histórico da doença e negativos no AAT e SAL. O Grupo 2 foi composto por 308 soros de rebanhos aleatórios, sem controle sanitário e com histórico de brucelose. O Grupo 3 composto por 30 soros de bezerros vacinados com B19. Como controle positivo e negativo foram utilizados mistura de 30 amostras de soro de cada grupo, respectivamente. As amostras positivas do pool foram provenientes de rebanhos com histórico de brucelose e confirmadas pelos testes: AAT e SAL e, as negativas, foram retiradas do Grupo 1.

Das 70 amostras do Grupo 1, 58 (especificidade = 82,86%) foram negativas nos três testes e 9 (12,85%), 7 (10%), 3 (4,28%) foram positivas para AAT, SAL e r10-kDa-ELISA, respectivamente. As três amostras positivas no r10-kDa-ELISA também foram positivas no AAT, SAL. Segundo os autores, a combinação AAT/SAL deram mais resultados falso-positivos (15/70) do que o r10-kDa-ELISA (3/70). As especificidades encontradas do r10-kDaELISA x AAT, r10-kDaELISA x SAL e AAT x SAL foram de 100%, 98,1% e 95,08 %, respectivamente. Das 308 amostras do Grupo 2, 105 foram positivas no r10-kDa-ELISA, 111 no SAL e 123 no AAT. Entretanto, 15 amostras foram positivas somente no ELISA indicando uma possível maior sensibilidade em relação aos testes de referência, embora não haja dados de isolamento para estes 15 animais. Para as amostras do Grupo 3 (bezerros vacinados com B19), o ELISA foi negativo para as 30 amostras sendo que os testes AAT e SAL detectaram presença de anticorpos em 9/30 (30%) e 29/30 (96,6%), respectivamente. O r10-kDaELISA não apresentou reação cruzada com B19.

Manat e colaboradores (2016), avaliaram o potencial diagnóstico da Omp28 recombinante no diagnóstico da brucelose, em soro de bovinos, por meio de ELISA indireto. Os autores avaliaram 90 amostras de soro caracterizadas por SAL, das quais, 62 eram positivas e 28 negativas, utilizando como teste referência o SAL. Dos 62 soros positivos, 59 (95,1%) e 3 (4,9%) foram positivos e negativos para o iELISA-OMP 28 recombinante (rOMP28-iELISA), respectivamente. Dos 28 soros negativos, 1 (3,6%) foi positivo rOMP28-ELISA. As DSe e DS_p

do rOMP28-iELISA comparado ao SAL foram de 95,1% (59/62) e 96,4% (27/28), respectivamente.

Bulashev e colaboradores (2019) avaliaram um ELISA utilizando como antígeno diferentes proteínas recombinantes (rOMP25, rOMP31, rBP26 e r-SOD) da *Brucella* spp. comparando o potencial diagnóstico entre elas. Foi utilizado também, para fins comparativos, um extrato de proteínas solúveis da *B. abortus* B19 (CSP) que provavelmente tem o LPS como contaminante. Amostras de soros de bovinos oriundas de diferentes cenários epidemiológicos foram utilizadas. A saber, 43 soros de vacas provenientes de fazenda localizada em área endêmica com casos de brucelose e 77 soros de vacas não vacinadas provenientes de fazenda livre com foco registrado. Animais de ambos os grupos reagiram positivamente aos testes AAT e FC. Foram avaliadas ainda amostras de 48 soros oriundos de vacas de fazenda livre, vacinadas entre 5-6 meses de idade com cepa B19 (subcutânea) e revacinadas aos 11-12 meses (via conjuntival). O rBP26-ELISA detectou anticorpos em 21/43 (49%), 23/77 (30%) e 1/48 (2%) soros para área endêmica, foco e área livre, respectivamente. Para todos os cenários, o ELISA que utilizou o CSP como antígeno foi mais sensível em relação às outras proteínas pois, detectou número maior de animais positivos nos cenários de área endêmica: 37/43 (86%) e foco: 73/77 (95%); muito provavelmente em função da contaminação com LPS. O uso das proteínas recombinantes reduziu o número de animais soropositivos quando comparados com os resultados dos testes AAT e FC, sugerindo baixa especificidade dos testes utilizados na rotina do diagnóstico sorológico da brucelose. A BP26, entre todas as proteínas utilizadas, mostrou melhor antigenicidade para anticorpos de vacas oriundas de áreas endêmicas, em função de uma maior quantidade de animais soropositivos detectados. No grupo dos animais vacinados, a BP26 reagiu com somente um animal (1/48), aproximadamente 2%, demonstrando que anticorpos contra a proteína BP26 poderiam ser desenvolvidos, contradizendo a literatura que fala que anticorpos contra a BP26 aparecem somente em animais com brucelose ativa (Letesson et al, 1997).

De acordo com Bulashev e colaboradores (2019), a produção de kits de ELISA com várias proteínas recombinantes seria um procedimento apropriado para melhorar o diagnóstico da brucelose bovina, permitindo seu uso nos animais independente do seu cenário epidemiológico. Além disso, a eficiência desses testes deveria ser avaliada não somente em comparação com métodos sorológicos, mas também com o isolamento bacteriano, que é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da brucelose.

Tian e colaboradores (2020) avaliaram a BP26 como antígeno em um ELISA no diagnóstico da brucelose bovina. Foram utilizados 41 e 34 soros de bovinos positivos e negativos, respectivamente, caracterizados pelos testes AAT e ELISA-LPS. O ELISA baseado na BP26 apresentou sensibilidade de 92,68% e especificidade de 52,94% quando comparado ao ELISA baseado no LPS. Baseado em análises de bioinformática, os autores encontraram que a BP26 tem aproximadamente 30% de identidade e 50% de reações positivas com proteínas das bactérias *Y. enterocolitica* e *E. coli*, respectivamente, podendo levar a reações inespecíficas no diagnóstico clínico.

Bai e colaboradores (2021) utilizaram seis importantes proteínas antigênicas e recombinantes, a saber, Omp10, Omp16, Omp19, Omp25, Omp31 e BP26, no diagnóstico sorológico da brucelose bovina utilizando um ELISA. Foram avaliados 94 soros de bovinos positivos para brucelose e 50 negativos. Foram utilizados os ELISA-LPS e o ELISA com o antígeno do AAT (células inteiras de *Brucella*), para fins comparativos. Os autores observaram uma acurácia para os soros positivos nos ELISA BP26, ELISA-Ag-AAT e ELISA-LPS de 70/94, 72/94, 88/94, respectivamente. E para os soros negativos de 49/50, 45/50, 46/50, respectivamente.

3.8 Teste rápido imunocromatográfico de fluxo lateral (TRIFL) no diagnóstico da brucelose bovina

Nas últimas décadas, os testes TRIFL vêm sendo desenvolvidos e avaliados para a detecção de anticorpos contra *B. abortus* (Abdoel et al. 2008; Elshemey e Abd-Elrahman, 2014; Herrera et al., 2015; Quintero et al., 2018).

O TRIFL é uma versão simplificada do ELISA (Geresu e Kassa, 2016), utiliza pequenos volumes de amostras, não requer instalações laboratoriais, refrigeração, pessoal especializado, podendo ser aplicado *in loco*, ou seja, próximo aos animais, oferecendo resultados rápidos em relação aos testes convencionais (Abdoel et al. 2008; Elshemey e Abd-Elrahman, 2014; Geresu e Kassa, 2016; Quintero et al., 2018; Gusi et al., 2019).

O diagnóstico da brucelose realizado por meio de testes rápidos pode ser alternativa para uso em locais com pouca infraestrutura, recursos orçamentários e em populações de animais localizadas em regiões de difícil acesso para conhecimento da prevalência de infecção. A utilização destes testes nestas regiões permite que medidas de controle possam ser executadas mais rapidamente evitando, dessa forma, a disseminação da doença dentro dos rebanhos

(Abdoel et al. 2008; Elshemey e Abd-Elrahman, 2014; Herrera et al., 2015; Quintero et al., 2018).

Até o momento, todos os testes TRIFL utilizados no diagnóstico da brucelose bovina, foram desenvolvidos utilizando o S-LPS da *B. abortus* como antígeno apresentando DSe e DS_p similares aos testes clássicos para a brucelose bovina (Abdoel et al., 2008; Elshemey e Abd-Elrahman, 2014; Herrera et al., 2015; Quintero et al., 2018; Gusi et al., 2019), o que era esperado já que o antígeno utilizado é o mesmo.

Abdoel e colaboradores (2008) adaptaram um teste rápido de fluxo lateral utilizado em humanos para uso em rebanhos de bovinos no diagnóstico da brucelose. Os autores utilizaram preparações de LPS da *B. abortus* cepa 1119-3 como antígeno. Trinta e sete amostras de soro de bovinos provenientes de frigoríficos foram obtidas a partir de banco de soro em Portugal. As amostras consistiram-se de 18 soros de bovinos provenientes de rebanhos infectados com brucelose e 19 soros de rebanhos livres. Estes soros foram submetidos às provas sorológicas AAT e FC. Foram ainda incluídos mais 25 soros de bovinos provenientes de país livre, mas que estavam reagentes para AAT, SAL e IgG-ELISA. Dos 18 soros oriundos de rebanho positivo, 11 tiveram isolamento de *Brucella* spp. Dos 18 soros positivos, 16/18, 15/18 e 16/18 foram reagentes aos testes AAT, FC e TRIFL, respectivamente. Nenhum dos 19 soros provenientes de rebanhos negativos foram reagentes nos três testes. Quando os autores levaram em consideração as amostras classificadas como positivas pelo teste do AAT e com cultura confirmada, a sensibilidade do TRIFL foi de 90%. A especificidade foi de 100%, já que nenhum soro negativo reagiu no teste rápido. Interessante ressaltar que segundo Gusi et al. (2019), os animais foram diagnosticados com brucelose causada por *B. melitensis*.

Elshemey e Abd-Elrahman (2014) avaliaram o desempenho de um teste rápido imunocromatográfico para o diagnóstico da brucelose bovina cujo antígeno utilizado também foi o S-LPS. Os testes AAT e ELISA indireto (iELISA) foram utilizados como padrão de referência para as estimativas de sensibilidade e especificidade do teste rápido, com 83 amostras de soro de vacas provenientes de rebanhos com histórico de aborto e problemas reprodutivos. Desses, 78/83, 75/83 e 70/83 foram positivos nos testes AAT, iELISA e no teste imunocromatográfico, respectivamente. Quando comparado aos resultados dos testes AAT/iELISA utilizando 72 amostras verdadeiramente positivas e duas verdadeiramente negativas, o teste imunocromatográfico apresentou sensibilidade de 94,44% (68/72) e especificidade de 100% (2/2). A concordância (*kappa*) calculada entre os testes foi de 0,76. Com os resultados

obtidos, os autores observam que o teste TRIFL é uma prova rápida e simples com resultados acurados para a detecção de anticorpos contra a brucelose, economia de tempo, eliminando a necessidade de treinamento especial para a sua aplicação podendo ser utilizado em pesquisas epidemiológicas, entretanto, a avaliação com um número maior de amostras negativas seria ainda necessária. Os autores comentam que a combinação de pelo menos dois testes sorológicos para a triagem da brucelose em rebanhos levaria a um aumento da sensibilidade. Entretanto, ainda correndo o risco da não identificação de possíveis portadores assintomáticos, já que nenhum teste sorológico é perfeito.

Herrera et al. (2015) desenvolveram e avaliaram o desempenho de um teste rápido imunocromatográfico de fluxo lateral utilizando como antígeno o S-LPS da *B. abortus* para o diagnóstico sorológico da brucelose em soros de diversas espécies, inclusive na espécie bovina. Para a avaliação da prova, os autores utilizaram 206 soros de bovinos (50 positivos e 156 negativos) pertencentes a um painel de referência de um laboratório de controle de qualidade do Centro de Investigações Científicas da Defesa Civil de Cuba. As sensibilidade e especificidade do teste TRIFL foram determinadas relativas ao teste de referência AAT. Dos 50 soros de bovinos positivos do painel de referência, 50/50 e 49/50 foram positivos no AAT e teste imunocromatográfico, respectivamente. Dos 156 soros negativos do painel, 155/156 e 156/156 foram negativos no AAT e teste imunocromatográfico, respectivamente. O teste imunocromatográfico foi menos sensível que o AAT, porém, mais específico. As sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico foram de 98,3% e 100% apresentando boa concordância com o AAT ($kappa = 0,98$).

Gusi et al. (2019) avaliaram os desempenhos diagnósticos de três testes, um teste rápido imunocromatográfico de fluxo lateral (LFA) utilizando como antígeno o S-LPS da *B. abortus*, AAT e S-LPS-iELISA em amostras de várias espécies de animais inclusive a espécie bovina. Para os bovinos, os grupos de soros utilizados foram compostos de: 88 soros com isolamento (59 com *B. abortus* e 29 com *B. melitensis*), 84 soros de vacas oriundas de área livre sem histórico de doença há 20 anos, 11 vacas livres da doença vacinadas com B19 via subcutânea, 22 vacas livres da doença vacinadas com B19 via conjuntival, 22 vacas livres da doença vacinadas com RB51 via subcutânea e 178 vacas não vacinadas provenientes de rebanho de área endêmica com isolamento de *B. abortus*. Para os soros de bovinos positivos com isolamento de *Brucella* spp., as DSe para os testes AAT, iELISA e LFA foram de 98,9%, 96,6% e 96,6%, respectivamente. Para os bovinos não vacinados provenientes de área livre, as DS_p

para os testes AAT, iELISA e LFA foram de 100%, 100% e 98,8%, respectivamente. O LFA detectou como positivo um animal proveniente de área livre que foi negativo nos outros dois testes. Para as vacas vacinadas com B19, nenhum dos três testes foram totalmente específicos, mas o AAT foi o menos específico. Das vacas vacinadas com RB51, somente o teste do AAT que não reagiu na prova. Para os 178 soros de animais provenientes de rebanhos de infectados de área endêmica, o AAT e o LFA detectaram 48/178 e 46/178, respectivamente. O AAT foi ligeiramente mais sensível do que o teste LFA. Entretanto, neste tipo de cenário epidemiológico, o conhecimento da prevalência da doença é importante para o direcionamento da validade dos resultados obtidos, ou seja, pode estar ocorrendo animais que são realmente negativos e que o uso de um teste imperfeito de maior sensibilidade não conseguirá definir o verdadeiro *status* sanitário do animal resultando em reação falso-positiva. Dependendo da característica do rebanho e da propriedade o prejuízo de descarte de um animal negativo poderá ser impactante. Dessa forma, a disponibilidade de um teste que utiliza um outro tipo de antígeno mais específico poderia ser uma opção interessante na superação desse tipo de problema.

Na Tabela 3 é apresentado um resumo dos empregos da proteína BP26 e do teste TRIFL no diagnóstico sorológico da brucelose bovina.

Tabela 3. Resumo do emprego da BP26 como antígeno e do teste TRIFL.

iELISA				
Antígeno	Sensibilidade (Se)	Especificidade (Sp)	Teste usado para comparação	Referência
S-LPS OMPs (10, 16,5, 19, 25-27, 36-38 e 89 kDa)	S-LPS (70%) OMPs (85%)	NC	AAT/SAL/FC (Se = 70%)	CloECKaert et al., 1992
rBP26 da <i>B. abortus</i>	100%	94%	AAT/SAL/FC	Kumar et al., 2008
r10kDa da proteína BP26	34%	95,7%	AAT/SAL (AAT: Se=39,9% e Sp=87% e SAL: Se=3,57% e Sp=90%)	Tiwari et al., 2011
OMP 28 recombinante	95,1%	96,4%	SAL	Manat et al., 2016
rOMP25, rOMP31, rOMPBP26, rSOD e CSP ¹	rBP26-iELISA: (área endêmica=49% e área foco: 30%) e CSP-iELISA: (área endêmica=86% e área foco: 95%)	rBP26-iELISA: (área livre=97,9% CSP-iELISA: (área livre=77%)	AAT/FC	Bulashev et al., 2019
BP26	92,7%	52,9%	AAT/LPS-ELISA	Tian et al., 2020
OMP10, OMP16, OMP19, OMP25, OMP31 e BP26	74,5%	98%	ELISA-LPS (Se= 93,6% e Sp=92%) e o ELISA-Ag-AAT (Se=76,6 % e Sp=90%)	Bai et al., 2021
TRIFL				
Antígeno	Sensibilidade (Se)	Especificidade (Sp)	Teste usado para comparação	Referência
LPS da <i>B. abortus</i> cepa 1119-3	88,9%	100%	AAT/FC (AAT: Se=88,9% e Sp=100% e FC: Se=83% e Sp=100%)	Abdoel et al., 2008
S-LPS	94,0%	NC	AAT/iELISA (AAT: Se=93,9% e iELISA: Se=90,36%)	Elshemey e Abd-Elrahman, 2014
S-LPS da <i>B. abortus</i>	98,0%	100%	AAT (AAT: Se= 100% e Sp=99,35%)	Herrera et al., 2015
S-LPS da <i>B. abortus</i>	96,6%	98,8%	AAT/iELISA (AAT: Se=98,9% e Sp=100% e iELISA: Se=96,6% e Sp=100%)	Gusi et al., 2019

NC: não calculado

¹CSP: extrato de proteínas solúveis da *B. abortus* B19

OMP: proteína de membrana externa

TRIFL: teste rápido imunocromatográfico de fluxo lateral

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras para avaliação das sensibilidade e especificidade analíticas do teste rBP26-TRIFL no diagnóstico da brucelose bovina

Para avaliação da sensibilidade analítica (ASe) foram utilizadas as seguintes amostras de soro bovino provenientes da soroteca do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LFDA/MG): soro padrão referência positivo (CSLB000442) reagente aos testes AAT/SAL/2-ME/FPA/FC e com isolamento de *B. abortus*, 23 amostras de soro bovino positivas para brucelose reagentes aos testes AAT/SAL/2-ME sendo que destas amostras, os soros CSLB000002 e CSLB000093 foram caracterizados como fraco positivo e forte positivo no AAT, respectivamente. Além disso, o soro padrão referência (CSLB000442) foi utilizado sem diluir e em diferentes diluições seriadas em um pool de soros negativos, não reagentes aos testes AAT/SAL/2-ME (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização das amostras de soro para avaliação da ASe do rBP26-TRIFL.

ID soro	AAT	SAL	2-ME	Isolamento	Total de soros
Soros positivos LFDA/MG	Positivo	Positivo	Positivo		20
CSLB000002 (fraco positivo)	Positivo	Positivo	Positivo		1
CSLB000093 (forte positivo)	Positivo	Positivo	Positivo		1
CSLB000442	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Brucella abortus</i>	1
CSLB000442 Diluído base 2	Positivo	Positivo	Positivo		
CSLB000442 Diluído base 5	Positivo	Positivo	Positivo		
CSLB000442 Diluído base 25	Positivo	Positivo	Positivo		
Total					23

ASe: sensibilidade analítica.

CSLB: Coleção de soro LFDA/MG para brucelose.

CSLB 000442: soro padrão referência com isolamento de *B. abortus*

LFDA/MG: Laboratório Federal de Defesa Agropecuária.

AAT: antígeno acidificado tamponado; SAL: soroaglutinação lenta; 2-ME: 2-mercaptoetanol.

Para avaliação da especificidade analítica (ASp) foram utilizadas, uma amostra de soro bovino (CSLB000073) proveniente do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LFDA/MG) negativa nos testes AAT/SAL/2-ME, 10 amostras de soro bovino não reagentes ao AAT provenientes de fazenda certificada do estado de SC e da fazenda experimental da UFMG em Igarapé. E ainda, 11, 13 e 15 amostras de soro bovino reagentes para *Neospora*, *Trypanossoma vivax* e *Leptospira*, respectivamente, e não reagentes ao AAT. *Neospora* e

Leptospira são microrganismos que estão envolvidos em problemas reprodutivos em bovinos e são considerados no diagnóstico diferencial da brucelose. As amostras de *T. vivax* foram utilizadas para avaliação da ASp por serem amostras bem caracterizadas para esse tipo de parasita que é muito prevalente no Brasil (Tabela 5).

Dez amostras de soro de bezerras com idade inferior a 8 meses, não reagentes ao AAT e imunizadas com RB51 e PBS, respectivamente, também foram incluídas na avaliação analítica de especificidade. Amostras de soro das bezerras foram coletadas e avaliadas no dia 0 e com 45 e 90 dias após imunização (Tabelas 5 e 9). A RB51 é uma vacina comercial também utilizada no PNCEBT em determinadas situações e cuja cepa é caracterizada por um LPS rugoso.

Tabela 5. Caracterização das amostras de soro para avaliação da ASp do rBP26-TRIFL.

ID soro	AAT	SAL/2-ME	Total de soros
CSLB000073	Negativo	Negativo	1
Soros brucelose (campo)	Negativo	Não realizado	10
Soros reagentes <i>Neospora</i>	Negativo	Não realizado	11
Soros reagentes <i>Trypanossoma vivax</i>	Negativo	Não realizado	13
Soros reagentes <i>Leptospira</i>	Negativo	Não realizado	15
Bezerras* imunizadas com RB51	Negativo	Não realizado	10
Bezerras imunizadas com PBS	Negativo	Não realizado	10
Total			70

ASp: especificidade analítica; CSLB: Coleção de soro LFDA/MG para brucelose

* Bezerras idade inferior a 8 meses;

RB51: vacina para brucelose bovina com cepa rugosa

PBS: salina fosfatada tamponada pH: ~ 7,2

AAT: antígeno acidificado tamponado; SAL: soroaglutinação lenta; 2-ME: 2-mercaptoetanol.

4.2 Amostras para avaliação das sensibilidade e especificidade diagnósticas e do teste rBP26-TRIFL no diagnóstico da brucelose bovina

Um total de 467 amostras de soro bovino, oriundas dos estados do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Pará, Tocantins, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Rondônia e Pernambuco, foram utilizadas neste trabalho para avaliação do teste rBP26-TRIFL. Tratam-se de amostras provenientes de diferentes rebanhos, coletadas pelo serviço veterinário oficial dos estados no período entre 2011 e 2022 enviadas ao LFDA/MG, localizado em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, para diagnóstico confirmatório da brucelose ou para certificação de rebanho. Alguns soros foram encaminhados juntamente das respectivas peças anatômicas para realização

do isolamento bacteriano. Todas as amostras permanecem estocadas a uma temperatura de -30°C, na soroteca do LFDA/MG.

Os soros selecionados para esse estudo foram previamente caracterizados pelos testes AAT e SAL/2-ME, executados conforme descrito no Manual Técnico do PNCEBT (Brasil, 2006) e interpretado de acordo com a Instrução Normativa nº10, 03 de março de 2017. Dessa forma, o padrão de referência utilizado para a comparação com o teste rBP26-TRIFL foi o resultado do teste AAT, no caso de amostras não reagentes, como nos grupos 1 e 2 ou uma combinação dos resultados dos testes AAT, SAL/2-ME (Tabela 6).

A amostragem foi realizada de acordo com a disponibilidade e rastreabilidade das informações retrospectivas, e em função da disponibilidade do número de testes do kit para o trabalho, limitando a 500 testes. Dessa forma, as amostras de soro foram separadas em 8 grupos de acordo com o *status* sanitário do rebanho (livre, positivo, desconhecido ou animais provenientes de frigorífico sob inspeção federal) conforme descrito na Tabela 6.

Os resultados dos testes AAT, SAL/2-ME e isolamento bacteriano (quando possível) foram utilizados como “padrão de referência” para classificação das amostras como positivas e negativas e para as estimativas da sensibilidade diagnóstica (DSe) e especificidade diagnóstica DSp do teste rBP26-TRIFL.

Tabela 6. Caracterização das amostras utilizadas na avaliação do desempenho diagnóstico do rBP26-TRIFL.

Grupos	AAT	SAL	2-Me	Isolamento de <i>B. abortus</i>	Total de animais	Rebanho
1	Negativo	Não realizado	Não realizado	Não realizado	148	Certificado livre
2	Negativo	Não realizado	Não realizado	Não realizado	61	Positivo
3	Negativo/ Positivo	Negativo	Negativo	Não realizado	55	ND
4	Positivo	Negativo	Negativo	Não realizado	31	Certificado livre
5	Positivo	Positivo	Negativo	Não realizado	4	Certificado livre
6	Positivo	Positivo	Positivo	Com Isolamento	65	Positivo
7	Positivo	Positivo	Positivo	Não realizado	8	Positivo
8	Positivo	Positivo	Positivo	Com Isolamento	95	SIF
Total					467	

ND: não determinado; SIF: animais oriundos do serviço de inspeção federal.

AAT: antígeno acidificado tamponado; SAL: soroaglutinação lenta; 2-ME: 2-mercaptoetanol.

Nos grupos 1 e 2, não foi realizado o teste confirmatório (SAL/2-ME) pois, os soros destes grupos não reagiram no teste de triagem (AAT), entretanto, foram distribuídos em grupos

distintos em função da situação de rebanho. O Grupo 1 correspondeu a animais oriundos de rebanhos certificados livres ou de segunda coleta para certificação com resultados negativos no AAT e os do Grupo 2, animais oriundos de rebanho foco, entretanto, negativos no AAT. O Grupo 3 incluiu animais provenientes de rebanho não certificado com alguns indivíduos reagindo no AAT, mas não reagindo no teste confirmatório. Os animais dos grupos 4 e 5 eram provenientes de rebanhos certificados livres, com reação no AAT e não reagindo no teste confirmatório. O isolamento bacteriano foi realizado somente nos grupos 6 e 8 em função do envio de peças anatômicas e solicitação para a sua realização pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). Os grupos 6, 7 e 8 são todos animais positivos nos testes oficiais e provenientes de rebanhos positivos, sendo que o Grupo 6 é composto por animais oriundos de rebanho com histórico de abortos e problemas reprodutivos e os animais do Grupo 8 são provenientes de SIF, ambos com isolamento de *B. abortus* (Alton et al., 1988) e identificação por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) segundo Orzil et al., (2016).

Como garantia da estabilidade das amostras armazenadas até o momento da realização do teste imunocromatográfico, os testes de AAT, SAL/2-ME foram repetidos em 30 amostras, escolhidas, dentre aquelas com tempo maior de armazenamento compreendidas entre os anos de 2011 e 2013.

4.3 Teste Imunocromatográfico de fluxo lateral com uma proteína recombinante rBP26-TRIFL

A proteína BP26 recombinante (rBP26) utilizada no teste rápido deste projeto foi desenvolvida por França et al. (2014). Em resumo, na clonagem para a produção da rBP26 utilizou o plasmídeo pXT7 (contendo um cassete de canamicina) e as sequências específicas do gene *BMEI0536* localizado cromossomo 1 da *B. melitensis* (número de acesso no GenBank AE008917.1). Foi realizada uma recombinação homóloga do inserto obtido com bactérias *Escherichia coli* BL21 quimicamente imunocompetentes. A rBP26 gerada foi composta de 250 aminoácidos com cauda de seis histidinas e massa molecular de 26,56 kDa.

A realização do teste rápido para brucelose foi baseada em cromatografia em fita desenvolvida em parceria com a empresa Safetest Diagnósticos. Trata-se de um teste sorológico para detecção de imunoglobulinas bovinas dos isotipos A, G e M, denominado Pan-Ig. Brevemente, primeiro foi realizada uma conjugação passiva do ouro coloidal com a proteína recombinante BP26 (rBP26). Paralelamente, o ouro coloidal foi conjugado com o anticorpo IgG de camundongo permitindo a visualização da banda controle do teste. Após a conjugação do ouro coloidal com

a rBP26 e a IgG de camundongo, ambos foram impregnados em uma fibra de vidro por meio de uma impregnadora (ClaremontBio) para a obtenção da membrana do conjugado (*conjugate pad*). A rBP26 e o anticorpo anti-IgG de camundongo foram impregnados, também, em uma membrana de nitrocelulose nas linhas teste e controle, respectivamente. Posteriormente, a folha do teste (*uncutsheet*) com as seguintes partes: membrana do conjugado (*conjugate pad*), membrana de nitrocelulose, membrana absorvente (*absorbent pad*) e membrana para aplicação das amostras (*sample pad*) foram montadas. A *uncutsheet* foi levada à guilhotina automática (A point) para fazer o corte das fitas no tamanho de 0,31 cm. Após o corte, as fitas foram encaixadas na base de um cassete plástico e depois a tampa do cassete foi encaixada. Para o correto fechamento dos cassetes foi utilizada uma esteira contendo um rolo compressor. Na próxima etapa, os cassetes foram colocados individualmente em um saco laminado juntamente com sílica e selados por meio de uma seladora automática (Cetro). Em seguida, os sacos contendo os cassetes foram alocados em uma caixa secundária juntamente com um frasco de solução tampão. Todos os reagentes foram armazenados em temperatura de 24° C (+ ou - 3°C) até o momento do uso (Figuras 4 e 5).



Figura 4. Apresentação do teste rápido para brucelose (Pan Ig) embalado para uso.

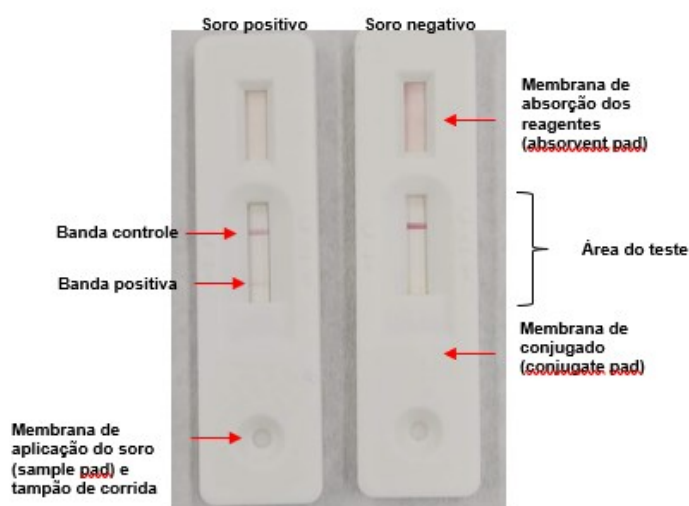


Figura 5. Apresentação dos cassetes do teste Pan Ig (rBP26-TRIFL) para diagnóstico da brucelose.

Para a realização do teste os soros foram descongelados à temperatura ambiente e as análises executadas conforme as instruções do fabricante. Brevemente, os cassetes foram dispostos em uma superfície plana seguida da adição, de 10 μL do soro teste com auxílio de micropipeta. Em seguida, foi adicionado 150 μL do tampão de corrida (tampão fosfato salina com soroalbumina bovina). Após 20 minutos da aplicação das amostras, a interpretação dos resultados foi realizada por meio da observação visual do aparecimento das bandas esperadas. Bandas visualizadas após esse tempo não foram consideradas. O teste foi considerado negativo se somente a banda do controle interno do kit apareceu na área do teste. Se uma segunda banda aparecesse na área do teste, indicava presença de anticorpo e o resultado foi interpretado como positivo. Se a linha do controle interno não apareceu, o teste foi considerado inválido (Figura 5). Todos os procedimentos foram realizados à temperatura ambiente.

Os metadados, tais como, idade, sexo, histórico de vacinação, origem dos animais, motivo da solicitação das análises, histórico de isolamento, período da coleta foram dispostos em planilha de Excel, obtidos a partir dos documentos de encaminhamento das amostras enviados ao LFDA-MG quando da solicitação das análises.

4. 4 Análise estatística dos dados

Os dados foram organizados em tabelas de contingência para as estimativas da ASe, da ASp, da DSe, da DSp, da acurácia e da concordância relativas aos testes oficiais AAT e 2-ME.

A concordância foi estimada pelo índice *kappa* (k) (Sim e Wright, 2005). Importante enfatizar que a estatística *kappa* não é uma estimativa de acurácia e sim da precisão estimada, pela

magnitude de concordância acima do acaso entre duas situações (Vieira et al., 2005). Os valores de *kappa* variam de -1 a +1, sendo que +1 representa concordância perfeita entre os testes, zero indica que a concordância ocorre simplesmente ao acaso e valores negativos indicam concordância menor que ao acaso, ou seja, potencial discordância entre os resultados (Sim e Wright, 2005; Vieira et al., 2005). A força de concordância foi estratificada para a interpretação do índice *kappa* conforme Landis e Koch (1977) – Quadro 1.

Os parâmetros de desempenho (índice *kappa*, ASe, ASp, DSe e DSp) foram estimados utilizando o programa MedCalc Statistical Software version 20.215, com intervalo de confiança de 95%. A acurácia diagnóstica foi calculada considerando a soma dos valores positivos e negativos em ambos os testes dividido pelo número total de amostras multiplicado por 100.

Quadro 1. Interpretação do *kappa*.

Estatística <i>Kappa</i>	Força de concordância
< 0,00	Sem concordância
0,00 - 0,20	Desprezível
0,21 - 0,40	Leve
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Grande
0,81 - 1,00	Quase perfeita

Fonte: Adaptado de Landis & Koch, 1977; McGinn et al., 2004.

5. RESULTADOS

5.1 Estudo comparativo da estabilidade das amostras de soro de bovino

O estudo comparativo para avaliação da estabilidade das amostras de soro bovino em função do tempo de armazenamento demonstrou baixa variação nos resultados dos testes sorológicos (AAT e SAL/2-ME). Em 2019, as amostras que constituíram o grupo 4 foram submetidas aos testes AAT e SAL/2-ME em função da solicitação das análises respectivas. Quando da realização do teste rBP26-TRIFL, no ano 2023, as mesmas amostras foram novamente testadas para AAT e SAL/2-ME. Os resultados estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7. Estudo comparativo da estabilidade das amostras de soro bovino em função do tempo de armazenamento.

ID amostra	Ano da realização dos testes sorológicos						rBP26-TRIFL
	Amostras do Grupo 4						
	2019			2023			
AAT	SAL	2-ME	AAT	SAL	2-ME		
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
11	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
24	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
26	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
27	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
28	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
31	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

AAT – Teste do Antígeno Acidificado Tamponado, SAL/2-ME – Soroaglutinação Lenta com 2-mercaptoetanol.

Grupo 4: Amostras provenientes de dois rebanhos certificados.

5.1 Avaliação de desempenho analítico

Na avaliação da ASE, o soro padrão de referência CSLB000442, usado sem diluir, reagiu no teste rBP26-TRIFL. Nas diferentes diluições seriadas, foram visualizadas reações somente nas diluições 1:2 e 1:4 no teste imunocromatográfico (Tabela 8), ao passo que na prova AAT o soro CSLB000442 reagiu até a diluição 1:128, assim como na prova SAL/2-ME. O soro CSLB000002, caracterizado como soro fraco positivo na prova do AAT (força da reação +1), foi classificado como negativo pelo teste rBP26-TRIFL. O soro CSLB000093 foi classificado

corretamente pelo teste rBP26-TRIFL como positivo (Tabela 8). Dos vinte soros positivos para AAT, SAL/2-ME, 15 soros reagiram como positivo no teste rBP26-TRIFL (Tabela 8). O controle de prova do teste imunocromatográfico estava reagente em todos os testes realizados.

Tabela 8. Resultados da avaliação da ASe do teste rBP26-TRIFL frente às provas AAT e SAL/2-ME.

ID soro	rBP26-TRIFL	AAT/SAL/2-ME
CSLB000442	Positivo	Positivo
CSLB000442 1:2	Positivo	Positivo
CSLB000442 1:4	Positivo	Positivo
CSLB000442 1:8	Negativo	Positivo
CSLB000442 1:16	Negativo	Positivo
CSLB000442 1:32	Negativo	Positivo
CSLB000442 1:64	Negativo	Positivo
CSLB000442 1:128	Negativo	Positivo
CSLB000442 1:5	Negativo	Positivo
CSLB000442 1:10	Negativo	Positivo
CSLB000442 1:20	Negativo	Positivo
CSLB000442 1:40	Negativo	Positivo
CSLB000442 1:80	Negativo	Positivo
CSLB000442 1:25	Negativo	Positivo
CSLB000442 1:50	Negativo	Positivo
CSLB000442 1:100	Negativo	Positivo
CSLB000002	Negativo	Positivo
CSLB000093	Positivo	Positivo
20 Soros positivos LFDA/MG	15/20 Positivos	Positivo
ASe (23 soros)		17/23 (73,91%)
IC 95%		(51,59% - 89,77%)
Acurácia		73,91%

AAT – Teste do Antígeno Acidificado Tamponado, SAL/2-ME – Soroaglutinação Lenta com 2-mercaptoetanol.

ASe: sensibilidade analítica IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

CSLB000442: soro padrão referência positivo com isolamento de *B. abortus*.

LFDA/MG: Laboratório Federal de Defesa Agropecuária.

Na avaliação da ASp, o soro CSLB000073 foi corretamente classificado como negativo pelo teste rBP26-TRIFL. Todos os dez soros negativos para brucelose no AAT também foram negativos no teste rBP26-TRIFL. Dos 11 soros reagentes para *Neospora* spp., 1/11 foi positivo no teste rBP26-TRIFL. Dos 13 soros reagentes para *T. vivax*, e dos 15 soros reagentes para *Leptospira*, todos foram negativos no teste rBP26-TRIFL e na prova AAT (Tabela 9).

Dos 10 soros de bezerras imunizadas com a vacina comercial RB51, apenas uma amostra de soro (1/10) foi positiva no teste rBP26-TRIFL, correspondente às coletas dos dias 45 e 90 após

a imunização (Tabela 6). Nenhum dos animais imunizados com PBS foi reagente no teste rBP26-TRIFL nos diferentes dias após a imunização (Tabela 9).

Tabela 9. Resultados da avaliação da ASp do teste rBP26-TRIFL.

ID soro	AAT	SAL/2-ME	Total de soros	Soros não reagentes no teste rBP26-TRIFL		
CSLB000073	Negativo	Negativo	1	1/1		
Soros negativos para brucelose (campo)	Negativo	Não realizado	10	10/10		
Soros reagentes <i>Neospora</i> spp.	Negativo	Não realizado	11	10/11		
Soros reagentes <i>Trypanossoma vivax</i>	Negativo	Não realizado	13	13/13		
Soros reagentes <i>Leptospira</i>	Negativo	Não realizado	15	15/15		
	AAT	SAL/2-ME	Total de soros	D 0	D 45	D 90
Bezerras imunizadas com RB51	Negativo	Não realizado	10	10/10	9/10	9/10
Bezerras imunizadas com PBS	Negativo	Não realizado	10	10/10	10/10	10/10
Total			70			
ASp (70 soros)				68/70 (97,14%)		
IC 95%				(90,06% - 99,65%)		
Acurácia				97,14%		

AAT – Teste do Antígeno Acidificado Tamponado, SAL/2-ME – Soroaglutinação Lenta com 2-mercaptoetanol

ASp: especificidade analítica IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

D 0, D 45 e D 90: dias após imunização.

AAT: antígeno acidificado tamponado; SAL: soroaglutinação lenta; 2-ME: 2-mercaptoetanol.

CSLB: Coleção de soro LFDA/MG para brucelose.

De acordo com os resultados obtidos a sensibilidade analítica foi estimada em 73,91% (IC 95% 51,59% - 89,77%) e a especificidade analítica em 97,14% (IC 95% 90,06% - 99,65%) (Tabelas 8 e 9).

5.2 Avaliação de desempenho diagnóstico

Ao avaliar o desempenho diagnóstico do teste rápido, todos os animais dos grupos 1 e 2 que foram negativos no teste AAT também o foram no teste rBP26-TRIFL. Todas as amostras do Grupo 3 que foram confirmadas como negativas no 2-ME, também foram negativas no teste rBP26-TRIFL (Tabela 10). As amostras do Grupo 4, provenientes de rebanhos certificados, somente uma (1/31) foi positiva no teste rBP26-TRIFL. Todas as amostras do Grupo 5 foram negativas no teste rBP26-TRIFL (4/4). Das 65 amostras positivas do Grupo 6, somente 2 (3,1%), foram classificadas como positivas no teste rBP26-TRIFL. As 63 (96,9%) amostras restantes foram classificadas como negativas, no teste rBP26-TRIFL. No Grupo 7, nenhuma das oito amostras positivas nos testes AAT e SAL/2-ME reagiu ao teste rBP26-TRIFL. Das 95

amostras do Grupo 8, oriundas de abate em frigorífico sob inspeção federal (SIF) o teste rBP26-TRIFL classificou 87/95 (91,57%) amostras verdadeiramente positivas como negativas (Tabela 10).

Tabela 10. Resultados dos testes padrão referência (PR) AAT, SAL/2-ME e do rBP26-TRIFL para a brucelose bovina em amostras de soro provenientes de diferentes regiões brasileiras.

Grupos (n) ^a	Resultado (%)				
	Testes padrão referência (PR)			Imunocromatográfico	
	AAT (Antígeno acidificado tamponado)			rBP26-TRIFL	
1. Amostras provenientes de três rebanhos certificados (n = 148)					
Positivo	0 (0)			0 (0)	
Negativo	148 (100)			148 (100)	
2. Amostras provenientes de um rebanho foco de brucelose (n = 61)					
Positivo	0 (0)			0 (0)	
Negativo	61 (100)			61 (100)	
3. Amostras provenientes de um rebanho não determinado o status sanitário (n = 55)					
Positivo	3 (5,45)	2 (6,5)	0 (0)	0 (0)	
Negativo	52 (94,50)	53 (96,4)	55 (100)	55 (100)	
4. Amostras provenientes de dois rebanhos certificados (n = 31)					
Positivo	4 (12,90)	2 (6,50)	0 (0)	1 (0,68)	
Negativo	27 (87,10)	29 (93,50)	31 (100)	30 (99,32)	
5. Amostras provenientes de três rebanhos certificados ou em processo de certificação (n = 4)					
Positivo	4 (100)	4 (100)	0 (0)	0 (0)	
Negativo	0 (0)	0 (0)	4 (100)	4 (100)	
6. Amostras provenientes de um rebanho positivo com isolamento (n = 65)					
Positivo	58 (89,23)	59 (90,77)	57 (87,69)	18 animais	2 (3,1)
Negativo	7 (10,77)	6 (9,23)	8 (12,31)	63 (96,9)	
7. Amostras provenientes de três rebanhos positivos sem isolamento (n = 8)					
Positivo	8 (100)	8 (100)	8 (100)	Sem isolamento	0 (0)
Negativo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (100)	
8. Amostras provenientes de abatedouro sob Inspeção Federal (SIF) com isolamento (n = 95)					
Positivo	92 (96,84)	93 (97,89)	92 (96,84)	95 animais	8 (8,42)
Negativo	3 (3,16)	2 (2,10)	3 (3,16)	87 (91,57)	

^a Número de animais por grupo

SAL/2-ME: Soroaglutinação lenta/2-mercaptoetanol (Teste confirmatório); PR: padrão referência.

As estimativas da DSe, DSp, acurácia e índice *kappa* para cada grupo avaliado estão apresentadas na Tabela 11.

A DSp relativa do rBP26-TRIFL nos grupos 1, 2, 3, 5 foi de 100%, entretanto, o índice *kappa* não pôde ser calculado em função das frequências observadas iguais a zero nas caselas de resultados positivos das tabelas de contingência. Nestes grupos, não foi possível calcular a DSe por se tratarem de animais negativos para a brucelose (Tabela 11).

No Grupo 4, DSp foi de 96,77% com um valor de *kappa* igual a 0. Apesar de apresentar uma DSp relativamente alta, o *kappa* 0, indica que os resultados concordam ao acaso (Tabela 11). No Grupo 6, as DSe e DSp foram de 1,75% e 87,5%, respectivamente.

No Grupo 7, as amostras que foram positivas no padrão referência, foram negativas no teste rBP26-TRIFL (Tabelas 10 e 11) portanto, a sensibilidade neste grupo foi igual a zero. A especificidade para este grupo não pode ser calculada por se tratar de um grupo de animais positivos.

As amostras do Grupo 8, são consideradas amostras verdadeiramente positivas pois, todas tiveram isolamento de *B. abortus*. A DSe do teste rBP26-TRIFL para esse grupo 8,70%. Dos 87 animais negativos no teste rBP26-TRIFL, três animais também foram identificados como negativos pelo padrão referência (AAT/SAL/2-ME) (Tabela 11). O valor de *kappa* calculado foi igual a zero. Para os animais negativos identificados em ambos testes a DSp foi de 100%.

O valor *kappa* igual a zero, informa que os resultados entre os testes rBP26-TRIFL e o padrão referência (AAT/SAL/2-ME) concordam ao acaso (Tabela 11). O cálculo do índice *kappa* por grupos apresentou limitação em função do tamanho amostral nos diversos grupos, com consequentes reflexos nas marginais utilizadas para a estimativa do índice.

A acurácia calculada para os grupos variou de 0% a 100%, sendo que nos grupos 6 e 8 apresentaram valores de 12,31% e 11,58%, respectivamente. Nos grupos 1, 2, 3 e 5 os valores encontrados foram de 100%, já que todas as amostras classificadas como negativas pelo teste rBP26-TRIFL também o foram pelo padrão referência (PR). No grupo 4, em função de uma amostra detectada pelo teste rBP26-TRIFL como positiva, a acurácia foi de 96,77% (Tabela 11).

Tabela 11. Estimativas das sensibilidade (DSe) e especificidade (DSp) diagnósticas relativas do rBP26-TRIFL, índice *kappa* e acurácia utilizando os testes padrão referência (PR) AAT e SAL/2-ME para a classificação das amostras de soro como positivas e negativas para a brucelose bovina.

	Grupos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Positivos PR	0	0	0	0	0	57	8	92
Positivos rBP26-TRIFL	0	0	0	1	0	2	0	8
Negativos PR	148	61	55	31	4	8	0	3
Negativos rBP26-TRIFL	148	61	55	30	4	63	8	87
<i>kappa</i> (IC 95%)	NC	NC	NC	0	NA	-0,027	0	0
DSe (IC 95%)	NC	NC	NC	NC	NC	1,75% (0,04% - 9,39%)	NC	8,70% (3,83% - 16,42%)
DSp (IC 95%)	100% (97,54% - 100%)	100% (94,13% - 100%)	100% (93,51% - 100%)	96,77% (83,30% - 99,92%)	100% (39,76% - 100%)	87,5% (47,35% - 99,68%)	NC	100% (29,24% - 100%)
Acurácia (%)	100%	100%	100%	96,77%	100%	12,31%	0%	11,58%

IC: Intervalo de confiança de 95%. NC: Não calculado.

TRIFL: Teste rápido imunocromatográfico de fluxo lateral.

Devido à impossibilidade de se calcular as estimativas de alguns dos parâmetros de desempenho do teste rBP26-TRIFL por grupos isoladamente, as amostras de soro foram reagrupadas em dois grupos e classificadas como positivas e negativas conforme os testes padrão referência, e os valores de DSe e DSp relativas do teste acurácia e o índice *kappa* foram recalculados (Tabela 12).

Tabela 12. Estimativas das sensibilidade (DSe) e especificidade (DSp) diagnósticas relativas do rBP26-TRIFL, índice *kappa* e acurácia no total das amostras (n = 467) utilizando os testes padrão referência AAT e SAL/2-ME (PR) para a classificação das amostras de soros como positivas e negativas para brucelose bovina.

Total de soros (n = 467)	Positivos = 157 Negativos = 310				
Positivos no PR e rBP26-TRIFL	Negativos no PR e rBP26-TRIFL	DSe (IC 95%)	DSp (IC 95%)	<i>kappa</i> (IC 95%)	Acurácia (%)
9	308	5,73% (2,65% - 10,60%)	99,35% (97,69% - 99,92%)	0,07 (0,018% - 0,11%)	67,88

IC 95% = Intervalo de confiança 95%; PR: padrão referência.

TRIFL = Teste rápido imunocromatográfico de fluxo lateral

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o desempenho do teste rBP26-TRIFL para o diagnóstico da brucelose bovina desenvolvido em parceria com a empresa Safetest Diagnósticos e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O antígeno utilizado foi a proteína recombinante BP26 produzida por França et al., 2014.

Na avaliação analítica, o teste rBP26-TRIFL foi capaz de detectar anticorpos contra a rBP26 em uma diluição de até 1:4 de um soro sabidamente positivo (CSLB000442) oriundo de uma vaca reagente aos testes AAT, SAL/2-ME e com isolamento de *B. abortus*. Comparando-se a reação do soro CLSB000442 com as provas diagnósticas que têm o S-LPS como antígeno (AAT/SAL/2-ME) obtiveram-se reações positivas em diluições maiores que aquelas obtidas com o teste rBP26-TRIFL. Estes resultados concordam com a literatura já que o S-LPS é imunodominante em relação a outros antígenos da bactéria (Cloeckaert et al., 2002; Corbel, 2006; Smith, 2018; Stranahan et al., 2021). A BP26 é uma proteína periplasmática cuja resposta imune aparece mais tardiamente no soro dos animais infectados quando comparado com as proteínas de localização na membrana externa (OMPs) da bactéria (Ducrotoy et al., 2016; Bulashev et al., 2019). Apesar de muitos autores a considerarem como uma das proteínas imunodominantes, a sua quantidade em relação ao LPS, no corpo bacteriano, é muito menor e a sua localização no periplasma bacteriano não favorece a exposição ao sistema imunológico do hospedeiro, induzindo resposta de anticorpos bem menos intensa em bovinos infectados com *B. abortus* (Cloeckaert et al., 2002; Ducrotoy et al., 2016). Ao utilizarmos um soro fraco positivo no AAT (CSLB000002), o teste rBP26-TRIFL também não conseguiu detectar anticorpos contra a proteína BP26, corroborando mais uma vez a característica imunodominante do S-LPS e provavelmente o aparecimento mais tardio de anticorpos contra a BP26 no soro dos animais infectados, além da intensidade de resposta para a BP26 ser menor em relação ao S-LPS. Dos 23 soros de bovinos reagentes no AAT/SAL/2-ME, 17 (73,91%) reagiram ao teste rBP26-TRIFL, considerada suficientemente satisfatória para o prosseguimento de uma avaliação analítica de especificidade.

A proteína BP26 é conservada no gênero *Brucella* (Chaudhuri et al., 2009; Bulashev et al., 2019; Kim et al., 2013). Para avaliar se o teste rápido reagia com soros de animais infectados por outros tipos de microrganismos, soros bovinos reagentes à *Neospora* spp., *T. vivax* e *Leptospira* foram utilizados para avaliação da ocorrência de possíveis reações cruzadas. De todos os soros utilizados houve reação somente com um soro bovino oriundo de animal com

anticorpos contra *Neospora* sp. A *Neospora caninum* e *Leptospira* sp. são causas frequentes de aborto em bovinos e devem ser diferenciados da brucelose já que medidas de controle variam de acordo com o agente etiológico envolvido (Silva et al., 2009). Reação cruzada induzida por vacinas comerciais contra *Leptospira* spp. em testes sorológicos para a brucelose bovina que utilizam S-LPS como antígeno já foi descrita na literatura (De Faria Naves et al., 2012), entretanto, nos resultados da especificidade analítica do teste rBP26-TRIFL não foram observadas reações cruzadas com a proteína BP26. A reação positiva observada em soro positivo para *Neospora* spp. muito provavelmente se deveu a alguma reação mediada por epitopo semelhante com o da proteína BP26 da *B. abortus*, entretanto, nenhum dado na literatura foi encontrado de forma a confirmar essa hipótese.

Dos 10 soros negativos para brucelose utilizados na avaliação analítica da especificidade, o teste rBP26-TRIFL concordou em 100% com os resultados do AAT corroborando com os resultados de Kumar et al. (2008) que observaram que o ELISA-BP26 apresentou especificidade de 100% para os soros negativos.

Dos 20 soros provenientes dos grupos de animais imunizados com RB51 e PBS, apenas um soro de animal vacinado com RB51 reagiu no teste rBP26-TRIFL com 45 e 90 dias pós-imunização. A amostra vacinal RB51 é uma amostra de *B. abortus* rugosa que não possui a cadeia O do LPS. É possível que outros epitopos desta amostra vacinal possam ter se tornado mais acessíveis ao sistema imune do animal reagente, como da proteína BP26 (OMP28), sensibilizando o animal com conseqüente produção de anticorpos que reagiram no teste rBP26-TRIFL. O que não ocorreu no teste AAT que tem a cadeia O como principal antígeno (Corbel, 1997; Guci et al., 2019). No dia 0 pós imunização com a cepa vacinal RB51, o resultado do rBP26-TRIFL concordou com o resultado do AAT. Entretanto, na análise de 45 e 90 dias pós imunização houve detecção de reação no rBP26-TRIFL podendo ter relação com a detecção de anticorpos mais tardiamente para esse tipo de antígeno, como já comentado por Ducrottoy et al., 2016. De acordo com o trabalho de Guci et al., 2019, que avaliaram o desempenho diagnóstico de três testes diagnóstico baseado em LPS (AAT, iELISA e TRIFL) para brucelose bovina apenas o teste AAT não reagiu com os soros de animais vacinados com RB51.

Em função desses resultados analíticos, a avaliação do desempenho diagnóstico do teste rBP26-TRIFL foi realizada em 467 amostras de soros de bovinos provenientes de diferentes regiões do Brasil com cenários epidemiológicos diferenciados.

Das amostras provenientes de rebanhos certificados livres (grupos 1, 4 e 5) todas que foram classificadas como negativas nos testes padrão de referência, também foram negativas no teste rBP26-TRIFL, exceto para uma amostra do Grupo 4. Tiwari et al. (2011) encontraram que o ELISA-rBP26 apresentou melhor desempenho na detecção de animais negativos em relação ao AAT. Da mesma forma, o resultado observado para o teste rBP26-TRIFL quando considerado somente o resultado do AAT também foi melhor. Entretanto, essas amostras não foram confirmadas no 2-ME. A amostra que foi reagente no teste rBP26-TRIFL não foi classificada como positiva no AAT e nem no SAL/2-ME. Manat et al. (2016) observaram uma DSp (96%) no teste ELISA, com uma proteína recombinante OMP28, melhor em relação a sua DSe (95%), o que foi observado neste estudo para os grupos onde a sensibilidade pôde ser calculada. Além disso, Tian et al. (2020), em análises de bioinformática, encontraram que a proteína BP26 apresenta em torno de 30% de identidade e aproximadamente 50% de reação positiva com proteínas das bactérias *Y. enterocolitica* e *E. coli*, o que pode contribuir para reações inespecíficas no diagnóstico clínico. Como o teste rBP26-TRIFL também mede IgM, esta poderia estar reagindo inespecificamente gerando resultado falso-positivo (Poester et al., 2010).

O teste rBP26-TRIFL, padronizado a partir dos dados obtidos na avaliação analítica, apresentou baixa sensibilidade diagnóstica para a detecção das amostras de campo verdadeiramente positivas provenientes dos grupos 6 e 8. As amostras do Grupo 6 são provenientes de um rebanho com histórico de aborto, problemas reprodutivos e com isolamento de *B. abortus* em 18 animais. Dos 18 animais com isolamento, o teste rBP26-TRIFL reagiu somente com amostra de soro de um único animal. O outro soro reagente ao teste rBP26-TRIFL não apresentou isolamento e foi classificado pelos testes padrão referência como não reagente para brucelose bovina. Conforme a literatura a proteína BP26 estimula resposta imune em animais infectados, entretanto, a resposta é inferior à resposta elicitada pelo S-LPS, aumentando com a cronicidade da doença. O baixo nível de anticorpos contra a BP26 se presentes nas amostras pode não ter sido detectado pelo teste rBP26-TRIFL em função das condições de padronização do antígeno proteico baseado na fase da avaliação do desempenho analítico.

As amostras do grupo 7 foram todas caracterizadas pelo AAT na sua maioria como soros fraco positivos e confirmadas no 2-ME como amostras com títulos menores ou iguais a 1:100. Todas as amostras foram classificadas pelo teste rBP26-TRIFL como negativas. Mesmo nas amostras provenientes do Grupo 8, onde todas elas eram provenientes de animais que apresentaram isolamento de *B. abortus*, o resultado composto dos testes utilizados como padrão referência

não identificaram três destas amostras verdadeiramente positivas, ao passo que o teste rBP26-TRIFL não identificou 87 delas. Possivelmente, as condições estabelecidas na padronização do antígeno durante a fase analítica não foram adequadas para a avaliação do desempenho diagnóstico do teste rBP26-TRIFL. Problemas relacionados ao lote do antígeno rBP26 podem ter ocorrido em função dos valores muito discrepantes das sensibilidades analítica e diagnóstica.

O antígeno BP26 quando em comparação com o S-LPS sempre estará em desvantagem do ponto de vista estrutural da bactéria além de parecer que realmente não existe uma correlação clara entre as respostas contra S-LPS e proteínas conforme observado por Cloeckert e colaboradores (1992). Contudo, um estudo conduzido em populações de animais com diferentes prevalências conhecidas talvez pudesse determinar um melhor cenário de aplicação para essa categoria de antígeno que sinaliza ser muito específico.

A DS_p no teste rBP26-TRIFL para rebanhos certificados livres (grupos 1, 4 e 5) apresentou valor variando de 96,7 a 100%, o que seria um bom resultado para uso nesse tipo de cenário epidemiológico, apesar do Grupo 5 ter tido um número limitado de amostras. As DS_p para todos os grupos do estudo, exceto o Grupo 7, foram maiores que 85%. Nos testes TRIFL avaliados por Abdoel et al. (2008), Elshemey e Abd-Elrahman (2014), Herrera et al. (2015) e Gusi et al. (2019) a especificidade foi significativamente melhor que a sensibilidade, entretanto, todos os testes utilizaram o S-LPS da *B. abortus* como antígeno. Apenas os autores Abdoel et al. (2008) e Gusi et al. (2019) utilizaram amostras de soro com isolamento de *Brucella* spp. Elshemey e Abd-Elrahman (2014) utilizaram soros de vacas provenientes de rebanho com histórico de abortos e problemas reprodutivos e Herrera et al. (2015) utilizaram soros pertencentes a um painel de referência. Todos os autores utilizaram os testes sorológicos AAT, FC ou iELISA para a caracterização dos soros.

Nos grupos os quais o índice *kappa* pôde ser calculado os índices apresentados foram zero ou negativo, ou seja, os resultados encontrados apesar de apresentar valores altos de DS_p não concordam com os testes oficiais (Sim e Wright, 2005). Elshemey e Abd-elrahman (2014) e Herrera et al. (2015) encontraram um *kappa* de 0,76 e 0,98, respectivamente. Mas ambos os autores avaliaram testes TRIFL utilizando o antígeno S-LPS, o que certamente é a causa das diferenças entre as estimativas encontradas neste trabalho e naqueles. O cálculo do índice *kappa* é influenciado pela baixa prevalência dos fatores na tabela de contingência (Sim e Wright, 2005; Vieira et al., 2005), dessa forma, o estudo apresentou limitação de número de amostras nos grupos, mesmo assim, naqueles grupos com isolamento a tendência dos resultados foi

semelhante aos grupos sem isolamento, ou seja, o teste rBP26-TRIFL, como foi padronizado, não apresentou boa sensibilidade na detecção dos animais verdadeiramente positivos.

Quando foram consideradas as amostras com agrupamento em somente dois grupos, os valores das DSe e DSp apresentaram também uma baixa DSe (5,73%) e uma alta DSp (99,35%) com uma baixa concordância com os testes oficiais ($kappa = 0$). O valor de acurácia encontrado para o rBP26-TRIFL foi de 67,88% em determinar a presença ou ausência de infecção, o que para um programa sanitário não representa um teste interessante para ser aplicado em nível nacional.

Os resultados encontrados na literatura sobre a utilização da proteína BP26 como antígeno, foram todos desenvolvidos em plataforma ELISA, os quais apresentaram boas avaliações de desempenho. Entretanto, todos os autores utilizaram amostras caracterizadas por testes imperfeitos e amostras de conveniência que pode levar a parâmetros de desempenho enviesados por não serem representativas das populações alvo (Cloeckert et al., 1992; Kumar et al., 2008; Tiwari et al., 2011; Manat et al., 2016; Bulashev et al., 2019; Tian et al., 2020; Bai et al., 2021). Por outro lado, todos os testes TRIFL desenvolvidos utilizaram o S-LPS como antígeno (Abdoel et al., 2008; Elshemey e Abd-Elrahman, 2014; Herrera et al., 2015; Gusi et al., 2019) diferentemente deste estudo. Estas condições limitam a comparação de resultados obtidos no presente trabalho com os demais, uma vez que este é o primeiro trabalho que avalia o emprego do antígeno baseado na proteína BP26 em um TRIFL para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina.

Interessante observar uma diferença marcante nos valores estimados das ASe e ASp em relação aos resultados encontrados para as DSe e DSp. A baixa de detecção pelo teste rBP26-TRIFL das amostras verdadeiramente positivas durante a avaliação diagnóstica, levando em consideração os resultados obtidos na avaliação de desempenho analítico, nos leva a pensar em possíveis problemas relacionados à ligação primária entre o antígeno e anticorpo. Como já citado anteriormente, a BP26 é um antígeno conservado no gênero *Brucella* com potencial de indução de anticorpos em animais infectados por estas bactérias e com aparecimento mais tardio no soro desses animais.

A baixíssima sensibilidade diagnóstica e acurácia coloca em dúvida a alta especificidade diagnóstica encontrada. Possíveis diferenças relacionadas ao teste rápido rBP26-TRIFL tais como: uso de lotes diferentes do antígeno, falta de ligação adequada da rBP26 ao ouro coloidal levando a problemas no sistema revelador da prova (conjugado), padronização da concentração

da rBP26 na tira de nitrocelulose baseada nos resultados da avaliação analítica (que pode ser diferente das condições observadas em amostras de campo), problemas relacionados com as amostras utilizadas na padronização da fase analítica (amostras de soro com resultados extremos) e ampliação da escala de produção são fatores que podem ter interferido para estimativas de sensibilidade diagnóstica limitadas. Durante a fase da avaliação diagnóstica, todas as amostras de soro foram provenientes de rebanhos em seu ambiente natural, obtidas de animais de raça, sexo e idade diferentes e com possíveis heterogeneidade de respostas imunológicas em função dos diferentes desafios encontrados no ambiente o que poderia explicar a falta de detecção pelo teste rBP26-TRIFL conforme foi inicialmente padronizado.

Existem vários modelos recomendados para avaliação de testes diagnósticos, todos eles com vantagens e desvantagens e aplicabilidade de acordo com as condições de avaliação (Enoe et al., 2000; Gall et al, 2004; Banoo et al., 2010; WOA, 2022). Mesmo estimativas de sensibilidade e especificidade diagnósticas obtidas por modelos enviesados têm valor, uma vez que permitem dar uma ideia do desempenho dos testes, desde que sejam conhecidas as limitações da metodologia utilizada na avaliação (Banoo et al., 2010). Dessa forma, o modelo utilizado no presente trabalho mostrou-se adequado ao demonstrar bom desempenho analítico, entretanto, na avaliação do desempenho diagnóstico, a baixa sensibilidade com alta especificidade do teste rBP26-TRIFL indica a necessidade de uma nova padronização do antígeno recombinante levando em consideração a perda excessiva de sensibilidade e comprometimento da confiabilidade das estimativas de especificidade e acurácia.

As estimativas de DSe e DS_p são parâmetros que direcionam a escolha e o uso prático dos testes diagnósticos. Estes parâmetros são dependentes da capacidade do teste de detectar anticorpos nos animais infectados e do antígeno utilizado para tal. Estudos adicionais, tais como a repadronização e otimização do antígeno no teste rBP26-TRIFL e a utilização de um conjunto maior de soros bem caracterizados provenientes de diferentes cenários epidemiológicos serão requeridos para clarear as incertezas sobre o uso prático do antígeno BP26 no diagnóstico da brucelose bovina e a validade das estimativas de desempenho diagnóstico.

7. CONCLUSÃO

O teste rBP26-TRIFL, com sua atual padronização, apresentou um bom desempenho analítico, mas desempenho diagnóstico limitado, restringindo, por ora, sua recomendação de uso pelo PNCEBT nos diferentes cenários epidemiológicos da brucelose no Brasil.

Este estudo permitiu ainda demonstrar que um teste com bom desempenho analítico pode não apresentar, necessariamente, bom desempenho diagnóstico. Indicando que nestes casos, há necessidade de uma nova padronização conforme condições de campo e que ambas as avaliações, analíticas e diagnósticas, são necessárias para tomada de decisão mais acertada quanto ao seu uso por um programa sanitário.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOEL, T.; DIAS, I. T.; CARDOSO, R. et al. Simple and rapid field tests for brucellosis in livestock. *Vet. Microbiol.*, v. 130, n. 3–4, p. 312–319, 2008.

ADAMS, L. G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n. 1–4, p. 553–561, 2002.

ADONE, R.; PASQUALI, P. Epidemiosurveillance of brucellosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, v. 32, n. 1, p. 199–205, 2013.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D. et al. Techniques for the brucellosis laboratory, Paris: Institut National de La Recherche Agronomique, 1988. 190p.

BAI, Q.; LI, H.; WU, X. et al. Comparative analysis of the main outer membrane proteins of *Brucella* in the diagnosis of brucellosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 560, p. 126–131, 2021.

BANOO, S.; BELL, D.; BOSSUYT, P.M. et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 8, n. 12, p. S17–S29, 2010.

BARQUERO-CALVO, E.; CHAVES-OLARTE, E.; WEISS, D.S. et al. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS ONE*, v. 2, n. 7, 2007.

BARSHEVSKAYA, L. V.; SOTNIKOV, D. V.; ZHERDEV, A. V. et al. Triple immunochromatographic system for simultaneous serodiagnosis of bovine brucellosis, tuberculosis, and leukemia. *Biosensors*, v. 9, n. 4, p. 1-10, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 02, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº06, 08 de janeiro de 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) - Manual Técnico, 03 de março de 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº10, 03 de março de 2017.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diagnostico Situacional do PNCEBT. Brasília: 2020. 102 p. Disponível em: <DSPNCEBT.pdf (www.gov.br)> Acesso em: 24 jun. 2021. 06 set. 2021.

BERKVENS, D.; SPEYBROECK, N.; PRAET, N. et al. Estimating disease prevalence in a bayesian framework using probabilistic constraints. *Epidemiology*, v. 17, n. 2, p. 145–153, 2006.

BOSCHIROLI, M.; FOULONGNE, V.; CALLAGHAN, D. O. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 4, p. 58–64, 2001.

BULASHEV, A.; AKIBEKOV, O.; SURANSHIYEV, Z. et al. Serodiagnostic potential of *Brucella* outer membrane and periplasmic proteins. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, v. 43, p. 486–493, 2019.

CÁRDENAS, L.; AWADA, L.; TIZZANI, P. et al. Characterization and evolution of countries affected by bovine brucellosis (1996–2014). *Transbound Emerg Dis.*, v. 66, n. 3, p. 1280–1290, 2019.

CARDOSO, P. G.; MACEDO, G. C.; AZEVEDO, V. et al. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb. Cell. Factories*, v. 5, p. 1–11, 2006.

CARVALHO NETA, A. V.; MOL, J.P.S.; XAVIER, M.N. et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet. J.*, v. 184, n. 2, p. 146–155, 2010.

CHAUDHURI, P.; PRASAD, R.; KUMAR, V. et al. Recombinant OMP28 antigen-based indirect ELISA for serodiagnosis of bovine brucellosis. *Mol. Cell. Probes*, v. 24, n. 3, p. 142–145, 2010.

CHRISTOPHER, S.; UMAPATHY, B.; RAVIKUMAR, K. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *J. Lab. Physicians*, v. 2, n. 2, p. 55–60, 2010.

CLOECKAERT, A.; KERKHOFS, P.; LIMET, J. N. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n. 12, p. 3168–3174, 1992.

CLOECKAERT, A.; VIZCAÍNO, N.; PAQUET, J. Y. et al. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n. 1–4, p. 229–247, 2002.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. *Emerging Infect. Dis.*, v. 3, n. 2, p. 213–221, 1997.

CORBEL, M. J.; Brucellosis in humans and animals. Geneva: WOAHA, 2006. 89p.

CUTLER, S. J.; WHATMORE, A. M.; COMMANDER, N. J. Brucellosis – new aspects of an old diseases, *J. Appl. Microbiol.*, v.98, p.1270-1281, 2005.

DEBBARH, H. S. A.; CLOECKARERT, A.; BÉZARD, G. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay with partially purified cytosoluble 28-kilodalton protein for serological differentiation between *Brucella melitensis*-infected and *B. melitensis* Rev 1-vaccinated sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 3, n. 3, p. 305–308, 1996.

DE FARIA NAVES, J. H. F.; REZENDE, L.M.; RAMOS, G.C. et al. Interference in diagnostic tests for brucellosis in cattle recently vaccinated against leptospirosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 24, n. 2, p. 283–287, 2012.

DE FIGUEIREDO, P.; FICHT, T. A.; RICE-FICHT, A. et al. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of *Brucella*-host interactions. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 185, n. 6, p. 1505–1517, 2015.

DUCROTOY, M. J.; CONDE-ÁLVAREZ, R.; BLASCO, J. M. et al. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 171, p. 81–102, 2016.

DUCROTOY, M. J.; MUNÓZ, P. M.; CONDE-ÁLVAREZ, R. et al. A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. *Prev. Vet. Med.*, v. 151, n. 1, p. 57–72, 2018.

ENØE, C.; GEORGIADIS, M. P.; JOHNSON, W. O. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Prev. Vet. Med.*, v. 45, n. 1–2, p. 61–81, 2000.

EL-SAYED, A. e AWAD, W. Brucellosis: evolution and expected comeback. *Int. J. Vet. Sci.*, v.6, p. S31-S35, 2018.

ELSHEMEY, T. e ABD-ELRAHMAN, A. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Brucella abortus* antibodies in egyptian cattle sera and milk. *Alex. J. Vet. Sci.*, v. 40, n. 1, p. 24, 2014.

FRANÇA, S. A.; MOL, J. P. S.; COSTA, E. A. et al. Indirect ELISA for diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 66, n. 6, p. 1695–1702, 2014.

FERREIRA NETO, J. S.; SILVEIRA, G. B.; ROSA, B. M. et al. Analysis of 15 years of the national program for the control and eradication of animal brucellosis and tuberculosis, Brazil. *Semin. Cien. Agrar.*, v.37, n.5, suplemento 2, p.3385-33402, 2016.

GALL, D. e NIELSEN, K. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, v. 23, n. 3, p. 989-1002, 2004.

GARDNER, I. A.; COLLING, A.; GREINER, M. Design, statistical analysis and reporting standards for test accuracy studies for infectious diseases in animals: progress, challenges and recommendations. *Prev. Vet. Med.*, v. 162, p. 46-55, 2019.

GERESU, M. A.; KASSA, G. M. A review on diagnostic methods of brucellosis. *J. Vet. Sci. Technol.*, v. 07, n. 03, p. 1–8, 2016.

GIFFORD, G.; SZABÓ, M.; HIBBARD, R. et al. Validation, certification and registration of veterinary diagnostic test kits by the world organisation for animal health secretariat for registration of diagnostic kits. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, v. 40, n. 1, p. 173–188, 2021.

GONZÁLEZ-ESPINOZA, G.; ARCE-GORVEL, V.; MÉMET, S. et al. *Brucella*: reservoirs and niches in animals and humans. *Pathogens*, v. 10, n. 186, p. 1–21, 2021.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n. 1–4, p. 281–297, 2002.

GREINER, M.; GARDNER, I. A. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev. Vet. Med.*, v. 45, p. 43–59, 2000a.

GREINER, M.; GARDNER, I. A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic test. *Prev. Vet. Med.*, v. 45, p. 3–22, 2000b.

GUSI, A. M.; BERTU, W.J.; MIGUEL, M.J. et al. Comparative performance of lateral flow immunochromatography, iELISA and rose bengal tests for the diagnosis of cattle, sheep, goat and swine brucellosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 13, n. 6, p. 1–10, 2019.

HERRERA, D. F. D.; SANTANA, Y. C.; SUI, O. C. et al. Desarrollo y evaluación del desempeño de una prueba rápida inmunocromatográfica para el diagnóstico de la brucelosis. *Rev. Salud. Anim.*, v. 37, n. 2, p. 105–111, 2015.

HOBBS, E. C.; COLLING, A.; GURUNG, R. B. et al. The potential of diagnostic point-of-care tests (POCTs) for infectious and zoonotic animal diseases in developing countries: technical, regulatory and sociocultural considerations. *Transbound Emerg. Di.*, v. 68, n. 4, p. 1835–1849, 2021.

JACOBSON, R. H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v. 17, n. 2, p. 469–486, 1998.

JOHNSON, W. O.; JONES, G.; GARDNER, I. A. Gold standards are out and Bayes is in: implementing the cure for imperfect reference tests in diagnostic accuracy studies. *Prev. Vet. Med.*, v. 167, n. 1, p. 113–127, 2019.

KALTUNGO, B. Y.; SAIDU, S. N. A.; SACKKEY, A. K. B. et al. A review on diagnostic techniques for brucellosis. *Afr. J. Biotechnol.*, v.13, n.1, p.1-10, 2014.

KHAN, M. Z.; ZAHOOR, M. An overview of brucellosis in cattle and humans, and its serological and molecular diagnosis in control strategies. *Infect Dis. Trop. Med.*, v. 3, n. 2, 2018.

KIM, D.; PARK, J.; KIM, S. J. et al. *Brucella* immunogenic BP26 forms a channel-like structure. *J. Mol. Biol.*, v. 425, n. 7, p.1119–1126, 2013.

KUMAR, S.; TUTEJA, U.; KUMAR, A. et al. Expression and purification of the 26 kDa periplasmic protein of *Brucella abortus*: a reagent for the diagnosis of bovine brucellosis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 49, n. 3, p. 213–218, 2008.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A. et al. Bovine brucellosis: an updated review. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.32, p.202-212, 2008.

LAMONTAGNE, J.; FOREST, A.; MARAZZO, E. et al. Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *J. Proteome Res.*, v. 8, p. 1594–1609, 2009.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33, n. 1, p. 159, 1977.

LECLERCQ, S. O.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M. S. Taxonomic organization of the family brucellaceae based on a phylogenomic approach. *Front. Microbiol.*, v. 10, 2020.

LETESSON, J. J.; TIBOR, A.; VAN EYNDE, G. et al. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 4, n. 5, p. 556–564, 1997.

MANAT, Y.; SHUSTOV A.V.; EVTEHOVA, E. et al. Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of *Brucella* species. *Open Vet. J.*, v. 6, n. 2, p. 71-77, 2016.

MACEDO, A. A., GALVÃO, N. R., SÁ, J. C. et al. *Brucella*-associated cervical bursitis in cattle. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.51, n.3, p. 697-702, 2019.

MCGINN, T.; WYER, P. C.; NEWMAN, T.B. et al. Tips for learners of evidence-based medicine: 3. measures of observer variability (*kappa* statistic). *Can. Med. Assoc. J.*, v. 171, n. 11, p. 1369–1373, 2004.

MCGIVEN, J. A. New developments in the immunodiagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Rev. - Off. Int. Epizoot.*, v. 32, n. 1, p. 163–176, 2013.

MedCalc Statistical Software version 20.215 (MedCalc Software Ltda. Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023).

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n. 1–4, p. 209–227, 2002.

MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front Microbiol.*, v.5, p.1-18, 2014.

MORENO, E. The one hundred year journey of the genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920). *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 45, n. 1, p. 1–22, 2021.

MORENO, E.; BLASCO, J. M.; MORIYÓN, I. Facing the human and animal brucellosis conundrums: the forgotten lessons. *Microorganisms*, v. 10, n. 942, p. 1–29, 2022.

MORIYÓN, I.; LÓPEZ-GONI, I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int. Microbiol.* v. 1, n. 1, p. 19–26, 1998.

NAVARRO-SOTO, M. C.; MORALES-LOREDO, A.; ÁLVAREZ-OJEDA, G. et al. Recombinant proteins as antigens in serological diagnosis of brucellosis. In: BADDOUR, M.M. (Ed). Updates on Brucellosis. 1.ed. Croácia: In Tech, 2015. Cap. 10, p. 161-169.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n. 1–4, p. 447–459, 2002.

NIELSEN, S. S.; TOFT, N.; GARDNER, I. A. Structured approach to design of diagnostic test evaluation studies for chronic progressive infections in animals. *Vet. Microbiol.*, v. 150, p. 115–125, 2011.

ORZIL, L.L; PREIS, I.S.; ALMEIDA, I.G. et al. Validação da técnica de PCR multiplex para identificação de *Brucella* spp. *Cienc. Rural*, v. 46, n. 5, p. 847–852, 2016.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N. et al. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.*, v. 6, n. 2, p. 91-99, 2006.

PAPPAS, G. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 36, n. 1, p. S8–S11, 2010.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v. 90, n. 1–4, p. 55–62, 2002.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LOBO, J. R. et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do programa nacional de controle e erradicação de brucelose e tuberculose: Introdução. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n. 1, p. 1-5, 2009.

POESTER, F. P.; NIELSEN, K.; SAMARTINO, L. E. et al. Diagnosis of brucellosis. *Open Vet Sci J.*, v. 4, p. 46–60, 2010.

POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; SANTOS, R. L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v. 32, n. 1, p. 105-115, 2013.

POETSCH, A. and MARCHESINI, M. I. Proteomics of *Brucella*. *Proteomes*, v. 8, n. 2, p. 1–17, 2020.

PLUMB, G. E.; OLSEN, S. C.; BUTTKE, D. Brucellosis: ‘one health’ challenges and opportunities. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v. 32, n. 1, p. 271-278, 2013.

QUINTERO, A. F.; HERRERA, D. F. D; ALFONSO, D. M. et al. Evaluation of two rapid immunochromatographic tests for diagnosis of brucellosis infection in cattle. *Open Vet. J.*, v. 8, n. 3, p. 236–242, 2018.

ROEVER, L. Types of bias in studies of diagnostic test accuracy. *Evid. Based Med. Pract.*, v. 21, n. 1, p. 2, 2016.

ROOP II, R. M.; BARTON, I. S.; HOPERSBERGER, D. et al. Uncovering the hidden credentials of *Brucella* virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 85, n. 1, p. 1–45, 2021.

ROSSETTI, O. L.; ARESE, A. I.; BOSCHIROLI, M. L. et al. Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, n. 1, p. 165–169, 1996.

SANTOS, D. V.; TODESCHINI, B. R.; ROCHA, C. M. B. M. et al. A análise de risco como ferramenta estratégica para o serviço veterinário oficial brasileiro: dificuldades e desafios. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 34, n. 6, p. 542–554, 2014.

SANTOS, R. L.; MARTINS, T.M.; BORGES, A.M. et al. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, n.6, p.759-764, 2013.

SANOGO, M.; ABATI, E.; SAEGERMAN, C. Bayesian versus frequentist methods for estimating true prevalence of disease and diagnostic test performance. *Vet. J.*, v. 202, n. 2, p. 204–207, 2014.

SCHOLZ, H. C. e VERGNAUD, G. Molecular characterisation of *Brucella* species. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, v. 32, n. 1, p. 149–162, 2013.

SELEEM, N. M.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet. Microbiol.*, v.140, p. 392-398, 2010.

SILVA, T.M.A.; OLIVEIRA, R.G.; MOL, J. P. S. et al. Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. *Cienc. Rural*, v. 39, n. 9, p. 2563–2570, 2009.

SIM, J.; WRIGHT, C. C. The *kappa* statistic in reliability studies - uses, interpretation and sample size requirements. *Phys. Ther.*, v. 85, n. 3, p. 257–268, 2005.

SMITH, J. A. *Brucella* lipopolysaccharide and pathogenicity: the core of the matter. *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 379–382, 2018.

STRANAHAN, L. W.; ARENAS-GAMBOA, A. M. When the going gets rough: the significance of *Brucella* lipopolysaccharide phenotype in host–pathogen interactions. *Front. Microbiol.*, v. 12, p. 1–20, 15 jul. 2021.

TIAN, M.; SONG, M.; YIN, Y. et al. Characterization of the main immunogenic proteins in *Brucella* infection for their application in diagnosis of brucellosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 70, p. 1–6, 2020.

TIWARI, A. K.; KUMAR, S.; PAL, V. et al. Evaluation of the recombinant 10-kilodalton immunodominant region of the BP26 protein of *Brucella abortus* for specific diagnosis of bovine brucellosis. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 18, n. 10, p. 1760–1764, 2011.

TOFT, N.; JØRGENSEN, E.; HØJSGAARD, S. Diagnosing diagnostic tests: evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard. *Prev. Vet. Med.*, v. 68, n. 1, p. 19–33, 2005.

TYLER, J. W. & CULLOR, J. S. Titers, tests, truisms: rational interpretation of diagnosis serologic testing. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.194, p.1550-1558, 1998.

VIEIRA, ANTHONY J.; GARRET, J. M. Understanding interobserver agreement: the *kappa* Statistic. *Fam. Med.*, v. 37, n. 5, p. 360–363, 2005.

VON BARGEN, K.; GORVEL, J.-P.; SALCEDO, S. P. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol Rev*, v. 36, p. 533–562, 2012.

WARETH, G.; ERAVCI, M.; WEISE, C. et al. Comprehensive identification of immunodominant proteins of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* using antibodies in the sera from naturally infected hosts. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, n. 5, p. 1–19, 2016.

WOAH. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Chapter 1.1.6. (Version adopted in May 2013). In: WOAHA (Ed). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022. Available from: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf Accessed in: 04/02/2023.

WOAH. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). Chapter 3.1.4. Version adopted in May 2022. In WOAHA (Ed). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022. Available from: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELOSIS.pdf Accessed in: 04/02/2023.

WOAH. Statistical approaches to validation. Chapter 2.2.5. Version adopted in May 2014. In WOAHA (Ed). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022. Available from: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.05_STATISTICAL_VALIDATION.pdf Accessed in: 04/02/2023.