



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO



**AVALIAÇÃO DE TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA
ÓPTICA E APRENDIZADO DE MÁQUINA PARA
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Brucella abortus* E
Mycobacterium bovis EM BOVINOS**

BRUNO SILVA DE REZENDE

**Campo Grande – MS
2023**

BRUNO SILVA DE REZENDE

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA
ÓPTICA E APRENDIZADO DE MÁQUINA PARA
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Brucella abortus* E
Mycobacterium bovis EM BOVINOS**

*Evaluation of optical spectroscopy technique and machine learning for
serological diagnosis of *Brucella abortus* and *Mycobacterium bovis* in
cattle*

BRUNO SILVA DE REZENDE

Orientador: Carlos Alberto do Nascimento Ramos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

**Campo Grande – MS
2023**

DEDICATÓRIA

Dedico esta vitória a minha madrinha Elizabeth da Silva Benites, ao meu padrinho Porfirio da Silva Benites, a minha avó Margarete Almeida de Rezende e ao meu avô Antonio Carlos Ferreira de Rezende. Estas pessoas foram fundamentais ao longo deste caminho. A minha gratidão é eterna.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por todo o amparo para que eu tivesse determinação em prol dos meus objetivos.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro. Além disso, fica aqui o meu agradecimento, pela parceria de pesquisa, ao Prof. Dr. Cícero Cena e Thiago França. Indubitavelmente, minha gratidão aos alunos de iniciação científica Maykko e Arthur, por toda ajuda com os experimentos.

Aos meus familiares, em especial a minha mãe Patricia, que sempre esteve comigo: obrigado!

Agradeço também aos meus amigos e a todos que torceram por mim!

E o meu principal agradecimento será para o meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos. Foi um verdadeiro orientador e um grande amigo! Nada disso seria possível se eu não tivesse todo o suporte deste grande ser humano. Agradeço de coração por toda ajuda, ensinamentos e conselhos!

*“Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho”
Mahatma Gandhi*

RESUMO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

A tuberculose e a brucelose bovina são doenças importantes no cenário da bovinocultura do país, haja vista os impactos econômicos devido ao sacrifício de animais positivos, condenação de produtos de origem animal e o risco à saúde pública. Ademais, *B. abortus* e *M. bovis* são microrganismos muito resistentes no ambiente o que facilita a sua disseminação. O Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) promove além de vacinação para brucelose, testes de diagnóstico para *B. abortus* e *M. bovis*, sacrifício ou abate sanitário de animais positivos e ações de adesão voluntária com a finalidade de fomentar a prevenção e controle destas doenças. Entretanto, os testes atualmente empregados podem apresentar alguns problemas seja de especificidade e ou sensibilidade, ou demanda de estrutura laboratorial complexa, alto custo e demora no tempo de execução. Dessa forma, justifica-se as pesquisas por métodos baseados em espectroscopia como FTIR, UV-Vis e outras, que associadas a métodos de análise multivariada e algoritmos de aprendizado de máquina (*machine learning*) têm demonstrado serem promissoras no diagnóstico de doenças, apresentando índices de sensibilidade-especificidade aceitáveis, custos mais baixos e rapidez na obtenção de resultados. Dessa forma, foi avaliado nessa pesquisa o método UV (Ultra violeta), associado ao aprendizado de máquina, para diagnóstico de brucelose e tuberculose em bovinos. Avaliou-se a metodologia de UV para ambas as enfermidades, com diferentes antígenos (antígeno de *B. abortus* para soroaglutinação lenta Tecpar®; antígenos recombinantes P27, MPB83 e MPB70 de *M. bovis*). Foram utilizados um total de 106 amostras de soro bovino (53 positivas e 53 negativas) para brucelose, e 88 amostras (44 positivas e 44 negativas) para tuberculose. As proporções de antígeno-soro foram avaliadas para cada antígeno e identificou-se, por meio da análise de componentes principais (PCA), que a proporção 1:1 para brucelose e, 1:16 (MPB83), 1:2 (MPB70) e 1:2 (P27), para tuberculose, apresentaram melhor separação de positivos e negativos. Ademais, com a proporção definida, foi realizado a coleta dos espectros UV do total de amostras. Em seguida os espectros foram submetidos a análise de componentes principais com o objetivo de observar a tendência da formação de agrupamentos, sendo que para brucelose, não apresentou nenhuma tendência de agrupamento, enquanto para tuberculose, somente o antígeno P27 apresentou bons resultados de agrupamento. Finalmente, usando algoritmos de aprendizado de máquina, foi alcançada uma acurácia geral de 92,5% para brucelose e 96,3% para tuberculose (usando antígeno P27).

39 **Palavras-chave:** Aprendizado de máquina, Bovino, Diagnóstico, Sorologia.

Abstract

40

41 Tuberculosis and bovine brucellosis are important diseases for cattle farming in
42 Brazil, given the economic impacts due to the sacrifice of positive animals,
43 condemnation of products of animal origin and the risk to public health. In
44 addition, *B. abortus* and *M. bovis* are very resistant microorganisms in the
45 environment, which facilitates their dissemination. The National Program for the
46 Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT) promotes
47 vaccination against brucellosis, diagnostic tests for *B. abortus* and *M. bovis*,
48 sacrifice or sanitary slaughter of positive animals and voluntary adherence
49 actions with the purpose of promoting the prevention and control of these
50 diseases. However, the tests currently employed may have some specificity
51 and/or sensitivity problems, or demand for a complex laboratory structure, high
52 cost and excessive execution time. Thus, research on methods based on
53 spectroscopy such as FTIR, UV-Vis and others is justified, which associated with
54 multivariate analysis methods and machine learning algorithms have shown to
55 be promising in the diagnosis of diseases, presenting indices acceptable
56 sensitivity-specificity, lower costs and faster results. Thus, the UV (Ultraviolet)
57 method associated with machine learning was evaluated in this research for the
58 diagnosis of brucellosis and tuberculosis in cattle. The UV methodology was
59 evaluated for both diseases, with different antigens (*B. abortus* antigen for serum
60 agglutination test; recombinant antigens P27, MPB83 and MPB70 of *M. bovis*). A
61 total of 106 bovine serum samples (53 positive and 53 negative) for brucellosis
62 and 88 samples (44 positive and 44 negative) for tuberculosis were used. The
63 antigen-serum ratios were evaluated for each antigen, and it was identified,
64 through principal component analysis (PCA), that the ratio 1:1 for brucellosis and,
65 1:16 (MPB83), 1:2 (MPB70) and 1:2 (P27), for tuberculosis, showed better
66 separation of positives and negatives. Furthermore, with the proportion defined,
67 the collection of the UV spectra of the total samples was carried out. Then the
68 spectra were submitted to principal component analysis in order to observe the
69 tendency of cluster formation. For brucellosis, no clustering tendency was
70 observed, while for tuberculosis, only the P27 antigen showed good clustering
71 results. Finally, using machine learning algorithms, an overall accuracy of 92.5%
72 for brucellosis and 96.3% for tuberculosis (using P27 antigen) was achieved.

73

Keywords: Bovine, Diagnosis, Machine learning, Serology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Prevalência de casos de brucelose bovina por UF.
- Figura 2. Prevalência de focos de brucelose bovina por UF.
- Figura 3. Prevalência de casos de tuberculose bovina por UF.
- Figura 4. Prevalência de focos de tuberculose bovina por UF.
- Figura 5. PCA realizada com os dados de espectroscopia UV-Vis de amostras positivas (preto) e negativas (azul) para *Mycobacterium bovis*.
- Figura 6. Descrição hierárquica e exemplos de técnicas de IA e suas subáreas ML e *Deep Learning* (DL).
- Figura 7. Os quatro componentes básicos do processo de *machine learning*.
- Figura 8. Average antigen/serum UV-SNV spectra for bovine brucellosis positive (POS - red color) and negative (NEG – blue color) groups. The standard deviation is evidenced by the colored shadow around the mainline. Main electronic bands centered around 206, 220, and 273 nm, assigned to $n \rightarrow \pi^*$ and $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions in carbonyl groups from proteins and amino acids.
- Figura 9. Principal Component Analysis for UV-SNV spectra: (a) score plot for PC1 versus PC2 from bovine blood serum UV-SNV spectra, [red square] bovine brucellosis positive group, and [blue circle] negative group. (b) Loadings for PC1 and PC2 in the 200 to 300 nm range.
- Figura 10 Violin plot for three main PCs normalized scores selected by RFE in 200 to 300 nm from bovine brucellosis positive group (red color), and negative group (blue color). A monomodal distribution is shown with the main peak center dislocated for both groups when projected over the y-axis direction. The data variance percentage of each PC is described below each plot. Respective loading plots for PC3 (b), PC4 (d), and PC14 (f) are also shown.
- Figura 11 Principal Component Analysis for UV-SNV spectra after RFE analysis. 3D Score plot for PC3 versus PC4, and PC14 from bovine blood serum UV-SNV spectra in the 200 to 300 nm range, [red

circle] bovine brucellosis positive group, and [blue square] negative group.

- Figura 12 (a) Overall accuracy obtained in the LOOCV tests (light blue bars with right inclined line pattern) for Discriminant analysis (DA), K-nearest neighbor (KNN), and Support vector machine (SVM) algorithms by using PC3, PC4, and PC14 data in the 200 to 300 nm range. Confusion matrix for the performance of (b) SVM algorithm with a linear function, and (c) KNN algorithm with weighted function. The highest overall accuracy was 92.5%.
- Figura 13 Scatter plot based on Principal component analysis for UV-SNV spectra of bovine blood serum. Bovine tuberculosis positive samples (red) and negative (blue). The (a) correspond to the P27 antigen, (b) correspond to the MPB70 antigen, and (c) to the MPB83 antigen.
- Figura 14 (a) Overall accuracy obtained in LOOCV tests (light blue bars) for the machine learning algorithms. (b) Confusion matrix for the performance of the KNNM algorithm with an accuracy of 96.3%.

SUMÁRIO

RESUMO	V
Abstract	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Brucelose bovina no Brasil	14
2.1.1 Etiologia e patogenia	14
2.1.2 Técnicas de diagnóstico	17
2.1.3 Distribuição geográfica	20
2.2 Tuberculose bovina no Brasil	22
2.2.1 Etiologia e patogenia	22
2.2.2 Técnicas de diagnóstico	23
2.2.3 Distribuição geográfica	26
2.3 Espectroscopia UV-Vis	27
2.4 PCA e <i>Machine Learning</i>	28
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
4. CAPÍTULO I: Turning chaotic sample group clusterization into organized ones by feature selection: Application on photodiagnosis of <i>Brucella abortus</i> serological test	42
5. CAPÍTULO II: Evaluation of UV spectroscopy and machine learning for serological diagnosis of bovine tuberculosis	58
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS	72
7. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TÉCNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO	72

74 1. INTRODUÇÃO

75 A brucelose e a tuberculose são enfermidades infectocontagiosas,
76 causadas por microorganismos do gênero *Brucella* e *Mycobacterium*,
77 respectivamente. Às duas doenças têm grande impacto econômico por gerar
78 inúmeros prejuízos à bovinocultura além de serem zoonoses importantes
79 (BRASIL, 2006). A prevalência de focos de brucelose em bovinos pelo país
80 depende de cada região, variando entre 0,32% e 41,5% (CHATE et al., 2009).
81 Ademais, a tuberculose bovina, em um estudo entre 1989 e 1998, apresentou
82 prevalência média em todo o território nacional de 1,3% (FILHO et al., 2017). No
83 estado de Mato Grosso do Sul (MS), a partir de um levantamento epidemiológico
84 no ano de 1998, observou-se prevalência para brucelose de 6,3% (BRASIL,
85 2006). Além disso, em um estudo realizado entre 2012 e 2019, o estado de MS
86 apresentou prevalência para tuberculose bovina de 0,15% (GARCIA et al.,
87 2021).

88 A ocorrência de brucelose no rebanho bovino brasileiro pode ocasionar
89 um impacto significativo haja vista a condenação de produtos alimentícios como:
90 carne e leite. Além disso, há grandes gastos para a implementação dos
91 programas de controle e erradicação da doença somado aos prejuízos na
92 bovinocultura devido aos abortos, bezerros subdesenvolvidos, menor índice
93 reprodutivo, menor produção de leite e derivados (POESTER et al., 2009).
94 Indubitavelmente, tais fatores mencionados somam-se com as mortalidades e
95 intervenções veterinária. A brucelose bovina no Brasil gera perdas estimadas em
96 R\$ 420,12 ou R\$ 226,47, para cada fêmea infectada acima de 24 meses em
97 rebanhos de leite ou corte, respectivamente. O prejuízo total anual estimado para
98 tal doença no rebanho bovino brasileiro, foi de R\$ 892 milhões, correspondendo
99 a 0,32% do PIB do Brasil em 2011 (SANTOS et al., 2013).

100 O homem pode ser infectado por meio dos produtos de origem animal
101 contaminados ou por contato direto ou indireto com animais infectados (PAULIN
102 et al., 2008). Dores articulares, febre, tosse, náusea, cefaleia, linfonodos
103 reativos, mialgia, depressão e perda de peso são os principais sinais clínicos
104 observados em humanos. Além disso, pode ocorrer supurações em órgão como
105 fígado e baço (LAWINSKY et al., 2010).

106 A tuberculose bovina é uma doença que pode acometer diferentes
107 espécies de animais e humanos, caracterizando assim sua importância para a
108 bovinocultura e saúde pública (SALAZAR, 2005). O agente da tuberculose se
109 caracteriza por gerar uma doença principalmente respiratória, pois quando há a
110 inalação dos bacilos pelo hospedeiro, macrófagos alveolares fagocitam o
111 microorganismo, causando lesões denominadas tubérculos (MARCONDES,
112 2002; PRITCHARD, 1988). Além disso, a transmissão ocorre principalmente por
113 via aerógena, mas também há a inclusão de via oral, congênita e venérea (NEIL
114 et al., 1994). Em seres humanos, comumente, a transmissão pode ocorrer pelo
115 consumo de leite e derivados contaminados (ACHA et al., 2001). Ademais,
116 segundo o estudo de Ruggiero et al. (2022), a disseminação do bacilo pode
117 ocorrer por meio de corrimento nasal, leite, fezes, urina, secreção vaginal e
118 uterina e pelo sêmen.

119 *Mycobacterium bovis* pode causar uma grande variedade de sinais
120 clínicos tanto em humanos como em animais, associando-se a variação da
121 localização das lesões (COSIV et al., 1998). Comumente a tuberculose em
122 bovinos é inaparente, apresentando poucos ou ausência de sintomas, mas em
123 casos avançados os hospedeiros podem apresentar dispneia (MATTHIAS,
124 1988).

125 Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)
126 instituiu no Brasil o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose
127 e Tuberculose Animal (PNCEBT), buscando diminuir a prevalência das
128 enfermidades a partir de medidas sanitárias. Este programa visa o controle dos
129 animais em risco, certificação das propriedades livres ou monitoradas,
130 aprimoramento para médicos veterinários que atuem nessa área, educação
131 sanitária e diagnósticos laboratoriais (BRASIL, 2006).

132 O PNCEBT se baseia no controle através do diagnóstico, sacrifício ou
133 abate sanitário dos animais infectados e vacinação para brucelose. Ademais,
134 este programa sugere a desinfecção de currais, estábulos, manejo de
135 pastagens, desinfecção de solos e veículos de transporte de animais, como
136 medidas preventivas.

137 O diagnóstico de *B. abortus* é baseado nos aspectos clínicos,
138 epidemiológicos e principalmente nos laboratoriais, sendo estes últimos divididos

139 em diretos e indiretos. Os métodos diretos incluem o isolamento do agente,
140 identificação por imuno-histoquímica ou PCR (BRASIL, 2006).

141 Os métodos indiretos para brucelose bovina são bastante amplos. O
142 PNCEBT define como oficiais os seguintes testes: Antígeno acidificado
143 tamponado (AAT), Teste do Anel em Leite (TAL), 2-Mercaptoetanol (2-ME),
144 Soroaglutinação Lenta (SAL), Fixação de Complemento (FC) e Teste de
145 Polarização Fluorescente (FPA), sendo que os dois primeiros testes são
146 realizados como triagem; e os quatro últimos são considerados confirmatórios
147 (BRASIL, 2006). Embora os testes acima descritos apresentem em geral bons
148 parâmetros de sensibilidade e especificidade, o diagnóstico definitivo de um
149 animal suspeito pode levar alguns dias, devido a necessidade de realização de
150 testes de triagem e confirmatório.

151 O diagnóstico clínico da tuberculose bovina torna-se difícil haja vista,
152 muitas vezes, sinais inaparentes e condição crônica do portador. Portanto, o uso
153 de métodos laboratoriais é de extrema importância. Após a morte do animal, a
154 necrópsia pode ser realizada e associada a coleta de material, para assim ser
155 realizada a histopatologia, PCR e isolamento bacteriano. Entretanto, o teste
156 tuberculínico é a principal metodologia recomendada pelo MAPA para o
157 diagnóstico de tuberculose bovina in vivo. Tal teste in vivo, se caracteriza pela
158 aplicação de tuberculina e verificação da reação de hipersensibilidade (para os
159 animais positivos). Com isso, esta última ferramenta pode ser dividida em três
160 tipos: Teste da Prega Caudal (TPC), Teste Cervical Simples (TCS) e Teste
161 Cervical Comparativo (TCC) (BRASIL, 2006). Embora de grande importância
162 para identificação de animais infectados, os testes baseados em
163 tuberculinização apresentam inconvenientes, sejam relacionados a sensibilidade
164 e especificidade, seja relacionado a praticidade de execução.

165 Diante do exposto, a busca por novas metodologias de diagnóstico, é
166 justificada, para o aprimoramento do controle das enfermidades. Neste cenário,
167 técnicas de espectroscopia óptica associadas a metodologias de análise
168 baseadas em aprendizado de máquina surgem como promissoras. Estas se
169 baseiam na interação da radiação com a matéria gerando informações que
170 podem ser analisadas para classificar e determinar as propriedades do
171 respectivo material. O estímulo da luz é capaz de fazer com que o material em

172 análise mude de um estado fundamental para excitado. Com isso, a partir da
173 medição da radiação emitida ou a quantidade de radiação absorvida, é possível
174 obter resultados e informações importantes sobre a substância em questão
175 (SKOOG et al., 2005).

176 A espectroscopia óptica são um conjunto de técnicas que podem ser
177 executadas a partir da radiação por luz infravermelha, ultravioleta ou visível,
178 entre outras (MARTINHO, 1994). A partir disso, a espectroscopia pode ter
179 inúmeras aplicações, com a análise de variados materiais assim como sistemas
180 mais complexos que podem envolver células e tecidos. Esta técnica pode ser
181 muito útil, pois é capaz de analisar amostras nos três estados físicos (líquido,
182 sólido e gasoso) e estando a matéria pouco ou sem prévia preparação. Ademais,
183 há um baixo custo tanto para suporte quanto para a manutenção dos
184 equipamentos por esta técnica (SILVA, 2007).

185 Assim a técnica de espectroscopia pode ser útil no diagnóstico de
186 inúmeras doenças, assim como doenças causadas por bactérias. Com isso há a
187 hipótese de que tal tecnologia poderia contribuir no diagnóstico de brucelose e
188 tuberculose bovina resultando em ótima performance na confiabilidade dos
189 resultados bem como na rapidez e baixo custo para a sua funcionalidade.

190 Após a obtenção dos espectros de uma determinada amostra, pode ser
191 utilizado uma ferramenta de grande valia: análise de componentes principais
192 (PCA). Esta análise é um método fatorial no qual os fatores são relacionados a
193 variância total. O objetivo da PCA é utilizar muitas variáveis e encontrar
194 combinações destas para produzir índices que descrevam a variação dos dados
195 (ARAUJO et al., 2009). Este sistema, em outras palavras, permite reter as
196 informações relevantes e mostrar, de modo mais simples, cada variável
197 individualmente. Ou seja, um espaço multidimensional é transformado em um
198 subespaço menor, criando assim, em termos geométricos das componentes
199 principais, a covariância das variâncias usando baixo número de autovetores
200 (GODINHO et al., 2008). E quando a PCA é associada a métodos de
201 aprendizado de máquina, temos uma metodologia poderosa para identificação
202 de padrões que podem auxiliar na distinção entre amostras positivas e negativas.

203 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

204 **2.1 Brucelose bovina no brasil**

205 **2.1.1 Etiologia e patogenia**

206 *Brucella* é o gênero da bactéria que pode causar a doença brucelose,
207 comumente associada a diversos hospedeiros (suínos, bovinos, caninos etc.)
208 incluindo humanos (MORENO et al., 2006). *Brucella abortus* é o principal agente
209 causador de brucelose em bovinos, podendo gerar inúmeros prejuízos a
210 bovinocultura, comumente relacionado a sua capacidade de causar infertilidade
211 no hospedeiro, aborto, diminuição na produção de leite e outros prejuízos de
212 ordem reprodutiva (HARMON et al., 1988; XAVIER, 2009; NETA et al., 2010).

213 *B. abortus* é uma bactéria gram-negativa, não formadora de esporos, não
214 móvel, intracelular facultativa, aeróbia e flagelada (LAGE et al., 2008; BRASIL,
215 2006). Tal bactéria apresenta morfologia de colônia lisa, ou seja, há a presença
216 de lipídeo A, núcleo oligossacarídeo e cadeia O na composição do LPS
217 (lipopolissacarídeo) que constitui a parede celular. Ademais, tal característica
218 morfológica tem relação direta com a virulência do microrganismo, sendo que o
219 grupo das bactérias lisas são mais patogênicas (PAULIN et al., 2003; LAGE et
220 al., 2008). Embora os gêneros sejam aeróbios, uma atmosfera com
221 concentração de 5 a 10 % de CO₂ propicia o crescimento de algumas espécies.
222 A multiplicação deste patógeno acontece na faixa de 20 a 40°C, sendo a
223 temperatura ideal de 37°C, e um pH entre 6.6 e 7.4 (PAJUABA, 2006; OIE, 2009).
224 Este microrganismo resiste bem a inativação no ambiente, levando a um alto
225 potencial de transmissibilidade, podendo permanecer por vários meses na água,
226 em vestimentas, feno, locais secos, temperaturas baixas e determinados
227 materiais biológicos (OIE, 2016).

228 As espécies do gênero são sensíveis à acidez e ao calor, podendo ser
229 eliminadas em até 15 minutos quando em contato com compostos fenólicos a
230 2,5%, permanganato de potássio (1:5000) e soluções de formaldeído a 2%. Além
231 disso, o carbonato de cálcio (1:10) consegue eliminar os microrganismos em 30
232 minutos e o álcool a 70% elimina de imediato (PAULIN et al., 2003; OIE, 2009).

233 Em alimentos como carne, *Brucella spp.* pode manter-se viável durante
234 meses, sendo resistentes ao congelamento e refrigeração, bem como a

235 acidificação do meio. Portanto, a eliminação, neste caso, só ocorre com o uso
236 do calor e em condições de pH inferior a 4,0 (PESSEGUEIRO et al., 2005).

237 Em produtos lácteos e no leite, tal bactéria, pode sobreviver de 15 a 90
238 dias, dependendo do pH, presença de outros microrganismos e temperatura. A
239 fervura do leite bem como os métodos de esterilização e processos de
240 pasteurização contribuem para a erradicação de *Brucella spp.* (CARVALHO et
241 al., 1995; PAULIN et al., 2003; BRASIL, 2006).

242 A mais comum porta de entrada de *B. abortus* é a mucosa orofaríngea,
243 entretanto há de se considerar as mucosas nasofaríngeas, conjuntiva ocular, oral
244 e em soluções de continuidade de pele (BRASIL, 2006). Geralmente a
245 transmissão ocorre quando o bovino está em contato com fetos abortados,
246 líquidos vaginais, envoltórios fetais, fômites e ingestão de água e alimentos
247 contaminados (OIE, 2009).

248 Após a entrada da bactéria no hospedeiro, os macrófagos fagocitam estes
249 microrganismos levando-os aos linfócitos regionais, e estes, por sua vez, sofrem
250 multiplicação do agente podendo originar um quadro de hiperplasia e linfadenite
251 (BISHOP et al., 1994; LAGE et al., 2008; NETA et al., 2010). Ademais, após a
252 circulação nos primeiros linfonodos, *B. abortus* pode, através do sangue ou linfa,
253 acometer outros linfonodos, como os supramamários, e órgãos como o fígado e
254 baço, albergando-se por longos períodos e sobrevivendo a resposta imune do
255 hospedeiro (HARMON et al., 1988; GORVEL et al., 2002; CAMPAÑA et al., 2003;
256 LAGE et al., 2008; LIRA, 2008; MATRONE et al., 2009; XAVIER, 2009).

257 Indubitavelmente, um grande fator responsável pela patogenicidade do
258 microrganismo, é sua capacidade de escape da resposta imune do hospedeiro.
259 *B. abortus* é capaz de permanecer no interior dos macrófagos sintetizando
260 enzimas antioxidantes, as quais somada à produção de guanosina 5'
261 monofosfato-GMP e adenina, impedem a degranulação dos macrófagos, e
262 conseqüentemente a destruição do agente (ARÉSTEGUI et al., 2001; BALDWIN
263 et al., 2002; NETA et al., 2010).

264 Além disso, este patógeno pode causar reações inflamatórias diversas
265 que podem resultar em esplenomegalia, hepatomegalia e até hiperplasia linfóide,
266 podendo ocorrer sinais clínicos no aparelho locomotor associado a
267 acometimento de músculos, bursas, tendões e articulações (MASCARENHAS,

268 2017). Os tecidos acometidos, devido a inflamação, além da modulação por
269 macrófagos, há a infiltração de plasmócitos e linfócitos, podendo resultar em
270 focos de necrose somado ao desenvolvimento de capsulas devido a proliferação
271 de tecido conjuntivo. Contudo, a preferência do microrganismo é por órgãos que
272 oferecem elementos para o desenvolvimento do seu metabolismo, como o
273 eritritol. Este elemento, por sua vez, é encontrado principalmente no útero
274 gravídico, tecidos osteoarticulares, tecido mamário e órgãos reprodutivos do
275 macho (RIBEIRO et al., 2008; XAVIER, 2009).

276 De acordo com Silva et al. (2005), as *Brucellas* possuem afinidade pelos
277 trofoblastos devido à grande quantidade de eritritol e progesterona produzida
278 pela placenta. Ademais, a infecção no útero através da via hematogênica, pode
279 causar diferentes intensidades de alterações associado ao fator do tempo de
280 gestação. A concentração de eritritol no bovino varia de acordo com o período
281 gestacional, sendo que há maior quantidade de tal componente próximo ao
282 parto, e com isso aumentando a chance de infecção e multiplicação do
283 microrganismo (CARTER et al., 1991; LAGE et al., 2008). Com isso, as lesões
284 necróticas e inflamatórias na placenta, causam descolamento de cotilédones
285 somado a lise de vilosidades, comprometendo a circulação entre mãe e filhote,
286 e conseqüentemente impossibilidade de troca de nutrientes e oxigênio,
287 resultando em variados danos incluindo o subdesenvolvimento do feto e até o
288 aborto. Além disso, outras manifestações materno-fetal podem ocorrer, tais
289 como: retenção de placenta, nascimento de bezerros fracos e endometrite
290 crônica, que pode acarretar problemas de fertilidade (BISHOP et al., 1994;
291 PAULIN et al., 2003; LAGE et al., 2008; XAVIER, 2009).

292 Os machos infectados por *B. abortus*, podem apresentar aumento de
293 volume testicular, além de comprometimento de vesículas seminais, ampolas e
294 epidídimo. As lesões inflamatórias podem evoluir para necrose causando atrofia
295 dos testículos e conseqüentemente levando o animal a quadro de infertilidade
296 ou subfertilidade (GORVEL et al., 2002; PAULIN et al., 2003; LAGE et al., 2008;
297 NOZAKI, 2008).

298 As lesões de aparelho locomotor causadas por *B. abortus*, estão
299 principalmente relacionadas aos tendões, bursa, músculos e articulações.
300 Ademais, as artrites carpianas e tarsianas são comuns, assim como espondilites

301 e bursite, podendo atingir bainha dos tendões e medula óssea (PAULIN et al.,
302 2003).

303 **2.1.2 Técnicas de diagnóstico**

304 Os métodos indiretos ou sorológicos constituem importantes ferramentas
305 para o diagnóstico da brucelose bovina (POESTER et al., 2005).

306 O PNCEBT definiu como oficiais os seguintes testes: Teste do Antígeno
307 Acidificado Tamponado (AAT), Teste do Anel do Leite (TAL), Teste do 2-
308 Mercaptoetanol (2-ME), Soroaglutinação Lenta (SAL), Fixação do Complemento
309 (FC) e Fluorescência de Polarização (FPA), sendo os dois primeiros definidos
310 como testes de triagem e os quatro últimos como confirmatórios (BRASIL, 2006).
311 Sem dúvidas, tais testes não apresentam total sensibilidade, e por isso há a
312 necessidade, muitas vezes, da associação entre eles em busca de melhor
313 eficiência na detecção de animais positivos (COSTA et al., 2011; OLIVEIRA,
314 2003).

315 O AAT é um teste indireto de triagem na qual se caracteriza pela
316 simplicidade da sua realização, além de que é sensível e rápido. Entretanto, a
317 aplicação da vacina B19, pode resultar em animais falso positivos quando
318 submetidos a tal teste (HUBER et al., 1986; TANYA et al., 1993; ABIMERHI et
319 al., 1998; MEGID et al., 2000; FOSGATE et al., 2002).

320 Já o TAL consiste em um teste bastante sensível no qual quando há a
321 combinação de antígeno-anticorpo, forma-se um anel azulado indicando assim
322 resultado positivo. Este teste é realizado para diagnóstico e monitoramento de
323 rebanho de gado de leite, sendo que os positivos, devem ser testados
324 individualmente por AAT, 2-ME e SAL, para se descobrir qual ou quais estão
325 infectados. Contudo, o teste de anel em leite pode apresentar falsos positivos
326 em animais portadores de mamites, presença de leites ácidos ou em colostros
327 (BRASIL, 2006).

328 O 2-Mercaptoenol (2-ME) é um teste confirmatório altamente específico,
329 pois devido a degradação de anticorpos IgM, há a detecção somente de IgG o
330 que indica, quando presente, uma infecção crônica. Além disso, deve ser
331 executada em paralelo com a prova lenta em tubos. Ademais, a prova lenta,

332 também chamada de Soroaglutinação em Tubos (SAT), embora possa identificar
333 uma alta proporção de animais positivos, pode apresentar resultados falso-
334 negativos em infecções crônicas somado a demora (aproximadamente 48 horas)
335 para leitura (BRASIL, 2006).

336 A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda a FC como
337 teste referência para o trânsito internacional de animais (DAJER et al., 1999).
338 Este teste tem sido utilizado em muitos países como ferramenta de controle e
339 erradicação (NIELSEN, 2002), pois além da alta especificidade, há menor
340 interferência de anticorpos vacinais quando comparado aos testes do AAT e 2-
341 ME (ALTON et al., 1988).

342 A FPA fundamenta-se na diferença de rotação entre a molécula de
343 antígeno (marcado com fluorocromo) e a conjugação antígeno-anticorpo.
344 Moléculas individualizadas (somente o antígeno) giram a uma velocidade maior,
345 resultando em maior despolarização da luz, e moléculas maiores (antígeno
346 ligado ao anticorpo) giram a uma menor velocidade, produzindo-se menor
347 despolarização luminosa. A detecção de diferenças de polarização
348 consequentemente consegue diferenciar amostras positivas e negativas
349 (NIELSEN, 2002). Ademais, tal método indireto tem boa sensibilidade e
350 especificidade, pode ser realizado a campo e com pouco tempo de execução (2
351 minutos) (NIELSEN, 2002; POESTER et al., 2005; OIE, 2008). Segundo Mathias
352 et al., (2010) a FPA apresentou sensibilidade de até 97,3% e especificidade de
353 até 98,3 %. Contudo, tal técnica apresenta a desvantagem do alto custo de
354 equipamentos e reagentes somado ao fato de que é necessária a importação
355 dos itens.

356 De acordo com Meirelles-Bartoli et al. (2010) foi realizado um estudo
357 comparativo entre os testes sorológicos preconizados pelo PNCEBT para o
358 diagnóstico de brucelose bovina. Então, foram analisadas 1061 amostras de
359 soros bovinos e comparou-se as provas de AAT, a combinação de SAL e 2-ME
360 e FC. Constatou-se sensibilidade relativa de 99,6%, 98,8% e 91,1%,
361 respectivamente, para o AAT, 2-ME e a FC, e especificidade relativa de 83,9%,
362 96,2% e 100%. Portanto, observou-se boa concordância entre os testes de
363 triagem e os testes confirmatórios, e ótima concordância quando os
364 confirmatórios foram comparados entre si. Contudo, houve soros com titulação

365 elevada em um dos testes confirmatórios e resultado negativo em outro,
366 ratificando a suposição de que o diagnóstico de brucelose bovina é mais
367 confiável quando são realizados vários testes.

368 Os diferentes métodos diretos (isolamento bacteriano, imuno-
369 histoquímica e PCR) para diagnóstico de *B. abortus*, podem apresentar
370 vantagens e desvantagens (BRASIL, 2006). A realização de isolamento
371 bacteriano através de material de aborto, sêmen e líquido sinovial de articulações
372 comprometidas apresentam resultados muito bons. Porém, é necessário
373 colheita, transporte e processamento adequado (LAGE et al., 2006). Ademais,
374 tal técnica possui como vantagem a alta especificidade, sendo capaz de
375 identificar diferentes espécies, contribuindo assim para avanços na
376 epidemiologia da doença (LAGE et al., 2008). Entretanto, além da baixa
377 sensibilidade, o isolamento requer tempo de execução de 3 a 5 dias de
378 incubação, em alguns casos 21 dias antes que um resultado esteja disponível
379 (WALKER, 2003). Além disso, há como desvantagens a necessidade de
380 instalações e equipamentos de bioproteção de nível 3, pois, tal técnica possui
381 riscos de infecção aos profissionais que manuseiam material altamente
382 contaminado e infeccioso (POESTER et al., 2005).

383 A imuno-histoquímica, por sua vez, é considerada versátil e prática, pois
384 apenas requer a adição de um anticorpo específico com um determinado
385 marcador, na amostra preparada para histopatologia. Com isso, é possível além
386 da identificação do agente, a visualização das lesões ocasionadas pelo
387 microrganismo (XAVIER, 2009). Todavia, este método direto é de execução
388 complexa e laboriosa, gerando falhas significativas e sendo necessário extrema
389 cautela para interpretação dos resultados (BRANDTZAEG, 1998).

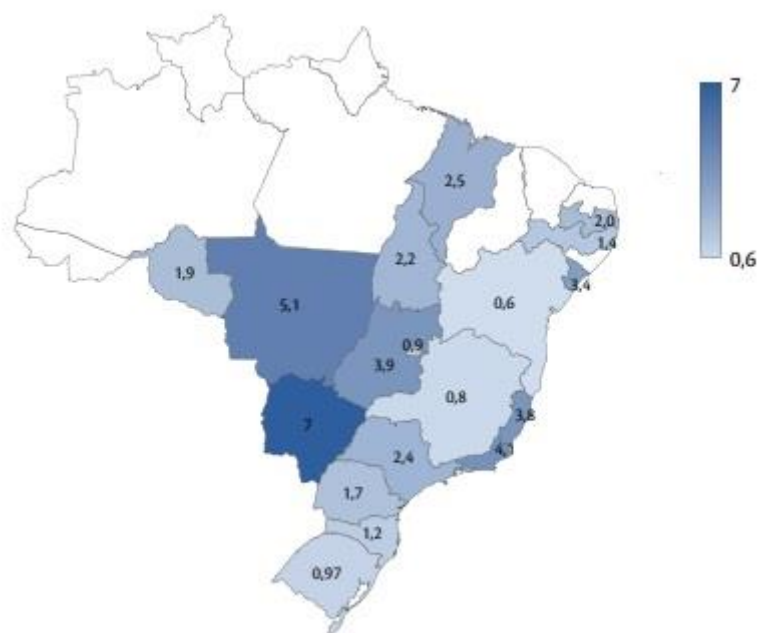
390 A PCR tem se popularizado nos últimos anos como útil na identificação
391 de *Brucella spp.*, a partir de material de aborto, sangue e sêmen (QUIEPO-
392 ORTUNO et al., 1997). Possui como vantagens a alta sensibilidade e
393 especificidade, permite trabalhar com a bactéria inativada além de demandar
394 baixo tempo de execução quando comparado aos métodos citados
395 anteriormente (FEKETE et al., 1990; BRICKER, 2002). As principais
396 desvantagens são a presença de fatores inibidores de amplificação nas
397 amostras (proteínas, lipídeos e carboidratos), o alto custo de equipamentos e

398 reagentes, e demanda por profissionais qualificados (LAGE et al, 2006). Leyla
399 et al., (2003) utilizaram a PCR baseado no gene IS711 para detectar *Brucella*
400 *spp.* em material de conteúdo estomacal de fetos ovinos, com sensibilidade de
401 97,4%, e especificidade de 100% quando comparada ao isolamento
402 microbiológico. Ademais, Seónadh et al. (2006) avaliaram o método
403 convencional e a PCR em tempo real (qPCR) para detecção de *B. abortus* em
404 sangue, linfonodos e leite de vacas infectadas, concluindo que é possível
405 detectar *B. abortus* a partir de amostras de linfonodo e leite com eficiência. No
406 entanto, a partir de sangue, não se observou grande eficiência.

407 **2.1.3 Distribuição geográfica**

408 Indubitavelmente, o conhecimento epidemiológico acerca da distribuição
409 da doença sobre estados e regiões, torna-se muito importante para a
410 implementação de um programa que objetiva o controle e a erradicação.
411 Ademais, a razão para tal afirmativa é a de que, com o conhecimento da
412 distribuição da morbidade, permite-se escolher as melhores estratégias,
413 relacionadas especificamente com as diferentes frequências de prevalência das
414 subpopulações estudadas. Além disso, o acompanhamento das diferentes
415 localidades, fomenta para um melhor estudo, queixando-se de forma racional a
416 necessidade de correções bem como evitando o desperdício de tempo e
417 recursos (CHATE et al., 2009).

418 Em 2001 começou o inquérito epidemiológico para conhecer a
419 prevalência de brucelose bovina nos estados da BA, DF, ES, GO, MA, MT, MS,
420 MG, PB, PR, PE, RJ, RS, RO, SC, SP, SE e TO, entretanto AC, AL e PA tinham
421 previsão de finalizar os estudos até o ano de 2020 e ficando sem inquéritos
422 apenas AP, AM, CE, PI, EM e RR (BRASIL, 2020). A seguir, a partir das figuras
423 1 e 2, observa-se os resultados dos inquéritos realizados pelas unidades
424 federativas (UF).

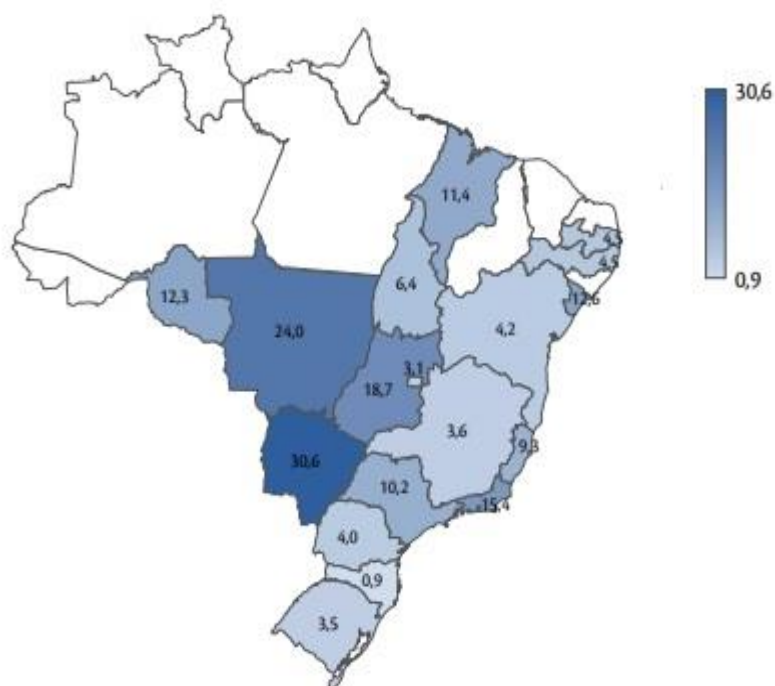


425

Figura 1. Prevalência de casos de brucelose bovina por UF.

426

Fonte: (BRASIL, 2020).



427

Figura 2. Prevalência de focos de brucelose bovina por UF.

428

Fonte: (BRASIL, 2020).

429 **2.2 Tuberculose bovina no Brasil**

430 **2.2.1 Etiologia e patogenia**

431 A tuberculose bovina é uma importante doença infecciosa de bovinos,
432 causada pela bactéria *Mycobacterium bovis* e que tem prevalência relevante
433 principalmente em países em desenvolvimento. Geralmente a doença se
434 caracteriza por quadro crônico, raramente apresentando evolução aguda. Este
435 bacilo acomete principalmente bovinos, mas também pode infectar outras
436 espécies de animais silvestres e domésticos, assim como o ser humano
437 (CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS, 1988).

438 *Mycobacterium bovis* é um microrganismo que se caracteriza por ser
439 imóvel, não capsulado, intracelular facultativo, bacilos curtos e não flagelados
440 (SILVA et al., 2011). Além disso, este agente é muito resistente, sendo capaz de
441 sobreviver em pasto, esterco e estábulo por até 2 anos, e por até 10 meses em
442 materiais biológicos contaminados. Ademais, é sensível a pasteurização do leite
443 e podem ser eliminados por alguns agentes desinfetantes, como álcool,
444 hipoclorito de sódio e formol (JORGE, 2010).

445 A tuberculose bovina pode causar lesões do tipo granulomatosas
446 nodulares, denominadas tubérculos, e isso se caracteriza como principal sinal
447 clínico (SILVA et al., 2011). Mas também, vale ressaltar que a localização das
448 lesões corresponde, de modo geral, as rotas de infecção do animal pelos bacilos.
449 A infecção por via aerógena (inalação de aerossóis contaminados) é a mais
450 comum (BRASIL, 2006), correspondendo assim a lesões que se restringem a
451 cavidade torácica. Entretanto, quando a infecção ocorre por via digestiva
452 (ingestão de pastagem, água e fômites contaminados), lesões podem aparecer
453 em linfonodos mesentéricos e faríngeos e posteriormente a disseminação para
454 todo o organismo. Ademais, bezerros podem ser infectados ao ingerir o leite
455 materno contaminado (JORGE, 2010).

456 De acordo com (THOMAZ, 2006), as lesões iniciadas nas junção
457 bronquíolo-alveolar disseminam-se para os alvéolos e linfonodos brônquicos,
458 podendo persistir no local, progredir ou regredir. A queda da imunidade do animal
459 pode estar diretamente relacionada a disseminação da infecção para outros
460 órgãos. Além disso, a dispersão da infecção pode ocorrer de forma miliar

461 (quando ocorre de maneira intensa, com grande quantidade de bacilos na
462 circulação) e protraída (através de vasos linfáticos e sanguíneos atingindo
463 linfonodos, sistema nervoso, fígado, rim, baço, ossos, entre outros tecidos)
464 (BEER, 1998).

465 Geralmente os animais que estão infectados por *M. bovis* apresentam
466 uma evolução crônica da doença, permanecendo assintomáticos até o estágio
467 terminal. Entretanto, em algum momento, o animal infectado pode apresentar
468 sintomatologia tais como linfonodos aumentados, emagrecimento e dificuldade
469 respiratória. Além disso, pode ocorrer diarreia, mastite, lesões na genitália e
470 infertilidade (CARVALHO, 2013; JORGE, 2010; SALAZAR, 2005).

471 **2.2.2 Técnicas de diagnóstico**

472 Para o diagnóstico de *M. bovis*, os testes são extremamente importantes
473 haja vista que o diagnóstico clínico, muitas vezes, torna-se difícil pois com a
474 evolução crônica da doença há uma ausência de sinais clínicos identificáveis.
475 Dessa forma, os testes de tuberculização (TCC, TCS e TPC), são os principais
476 métodos para triagem e confirmação de casos in vivo de tuberculose em bovinos.
477 Para diagnóstico post-mortem, tecidos como linfonodos de cabeça e tórax,
478 pulmão e fígado, podem ser utilizados para histopatologia, testes moleculares e
479 isolamento bacteriano (SALES, 2012; BRASIL, 2006).

480 O MAPA recomenda os testes tuberculínicos, e estes por sua vez, são os
481 métodos de diagnóstico mais comuns no Brasil (BRASIL, 2006). Os testes
482 consistem na inoculação intradérmica de tuberculina, e posterior aferição da
483 resposta de hipersensibilidade do tipo IV, por meio do aumento da espessura da
484 dobra de pele no local da inoculação. Quando os animais estão infectados, há
485 uma intensa reação que aumenta significativamente a espessura da pele alguns
486 dias após a inoculação (MONAGHAN et al., 1994). O procedimento de
487 tuberculinização pode ser dividido em três testes, sendo que o teste da prega
488 caudal (TPC) é empregado em gado de corte; o teste cervical simples (TCS), é
489 também utilizado como teste de triagem, mas para gado de leite; e há o teste
490 confirmatório, para animais com resultados positivos no TCS e TPC,
491 compreendido pelo teste cervical comparativo (TCC) (BRASIL, 2006).

492 Entretanto, os testes intradérmicos podem apresentar algumas
493 desvantagens, pois, por se tratar de testes in vivo, há dificuldade na aplicação
494 em rebanhos com alto contingente, e com isso há dificuldades na realização de
495 estudos epidemiológicos (MENZIES, 1999; LIU et al., 2007). Ademais, tais
496 métodos não são 100% específicos, podendo ocorrer reações falso-positivas,
497 devido a sensibilização dos animais com micobacterias ambientais, podendo
498 acarretar sacrifício desnecessário do animal (WOOD et al., 1991; MONAGHAN
499 et al., 1994). Somado a isso, em caso de reações indeterminadas, os animais
500 devem ser testados novamente apenas após 60 dias a partir da primeira
501 inoculação, sendo necessário novamente a contenção dos animais. (BRASIL,
502 2004; AAGAARD et al., 2006). Reações falso-negativas, para tal método indireto,
503 podem acontecer em animais anérgicos cronicamente infectados, tornando
504 estes animais possíveis fontes de infecção para o rebanho.

505 A técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), para
506 diagnóstico de tuberculose bovina, se mostra útil para identificação de animais
507 positivos anérgicos, e como ferramenta complementar aos testes que avaliam a
508 imunidade celular (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994). De acordo com
509 Waters et al., (2011) um teste ELISA utilizando antígenos recombinantes MPB70
510 e MPB83 forneceu sensibilidade de 63,0% e especificidade de 98,0% em
511 bovinos. Ademais, Meneses et al., (2015) avaliaram proteínas recombinantes
512 para detecção de anticorpos contra *M. bovis* por ELISA, e concluíram que a
513 quimera com fragmentos hidrofílicos de MPB70, MPB83 e ESAT-6 de *M. bovis*,
514 apresentou melhor resultado (sensibilidade de 83,2% e especificidade de 86,5%)
515 quando avaliaram os soros bovinos previamente testados pelo TCC. Um outro
516 estudo, foi realizado por Farias et al., (2012), no qual avaliou-se o teste ELISA
517 baseado em proteínas recombinantes P27 e MPB70 contra anticorpos de *M.*
518 *bovis*. Neste último estudo citado, a sensibilidade e especificidade do teste foram
519 respectivamente 88,7% e 94,6% para MPB70 e 98,1% e 91,9% para P27.
520 Entretanto, tal teste pode apresentar algumas desvantagens como necessidade
521 de muito tempo para a sua execução, alto custo e necessidade de laboratório
522 especializado (FRÁGUAS et al., 2008).

523 O teste de interferon gama bovino objetiva detectar a reação imune celular
524 a infecção por *M. bovis* (CENTRO PANAMERICANO ZOONOSIS, 1988). Tal

525 método é definido pela dosagem de uma citocina (interferon gama) presente em
526 amostras de sangue de animais infectados, quando há a estimulação prévia dos
527 linfócitos com PPD bovino e aviário, sendo que, animais não infectados não
528 produzem a citocina (JONES et al., 1992; WOOD et al., 1991). As vantagens de
529 tal técnica baseiam-se em ser um procedimento não invasivo, permitir a
530 realização várias vezes e sem intervalo de tempo, e necessidade de contenção
531 do animal apenas uma vez. Porém, é um diagnóstico de alto custo, restrito tempo
532 para o processamento das amostras (8 horas), e possibilidade de reações
533 cruzadas com outras microbactérias (ABRAHÃO, 1998; KANTOR et al., 1994).

534 Outras ferramentas como a cromatografia líquida de alta resolução
535 (HPLC) para análise do ácido micólico, foi sugerida como técnica de identificação
536 de microbactérias em culturas (BUTLER et al., 1991). Mas, esse ensaio não é
537 capaz de diferenciar por exemplo *M. bovis* de *M. tuberculosis*, possuindo então
538 pouca especificidade (FLOYD et al., 1992).

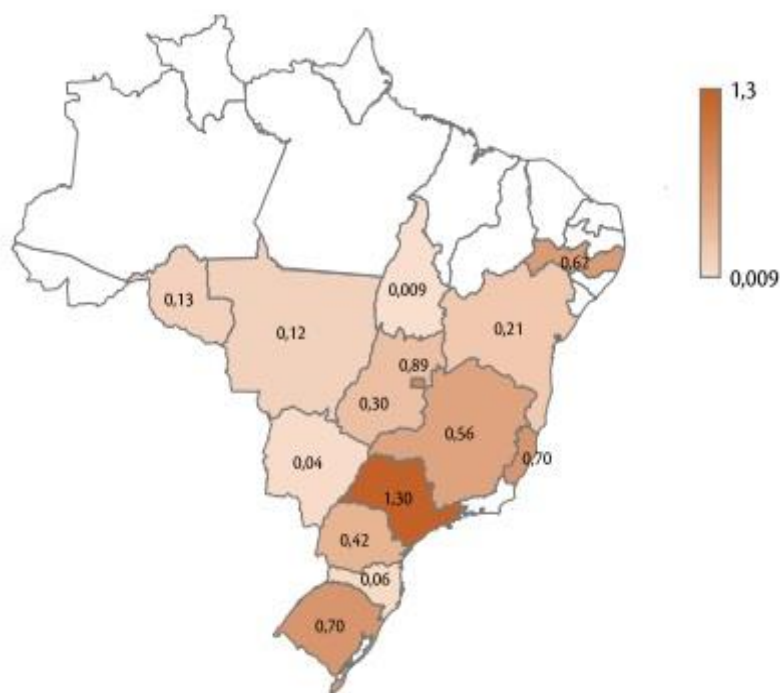
539 Os exames bacteriológicos e histológicos são importantes na
540 comprovação do diagnóstico realizado a campo, assim como a tuberculinização,
541 e com isso requerem que as amostras de animais suspeitos sejam coletadas de
542 forma rápida e adequada (CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS, 1988;
543 ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1995). O isolamento
544 bacteriano apresenta baixa sensibilidade, exigindo grande quantidade de bacilos
545 viáveis e demora no tempo de execução (tempo de crescimento da cultura varia
546 entre 1 e 12 semanas) (CORNER, 1994). A histologia, por sua vez, embora seja
547 um método rápido e barato, requer grande quantidade de microrganismos e
548 algumas lesões causadas por outras bactérias podem ser semelhantes as
549 causadas por *M. bovis* (HAAGSMA, 1995; WARDS et al., 1995; ZANINI et al.,
550 2001).

551 A PCR como técnica de diagnóstico para tuberculose pode ser realizada
552 usando isolados de cultivos e materiais clínicos (WIT et al., 1990; SAKAMOTO
553 et al., 1999). Embora tal técnica apresente ótimos resultados de sensibilidade e
554 especificidade, há um alto custo somado a complexidade de execução. Esses
555 fatores têm sido relatados como restrição para o uso no diagnóstico de
556 tuberculose bovina (KLAFTER et al., 1998; VITALE et al., 1998; ZANDEN, 2002).
557 Os primeiros estudos utilizando PCR para diagnóstico de *M. bovis* oriundos de

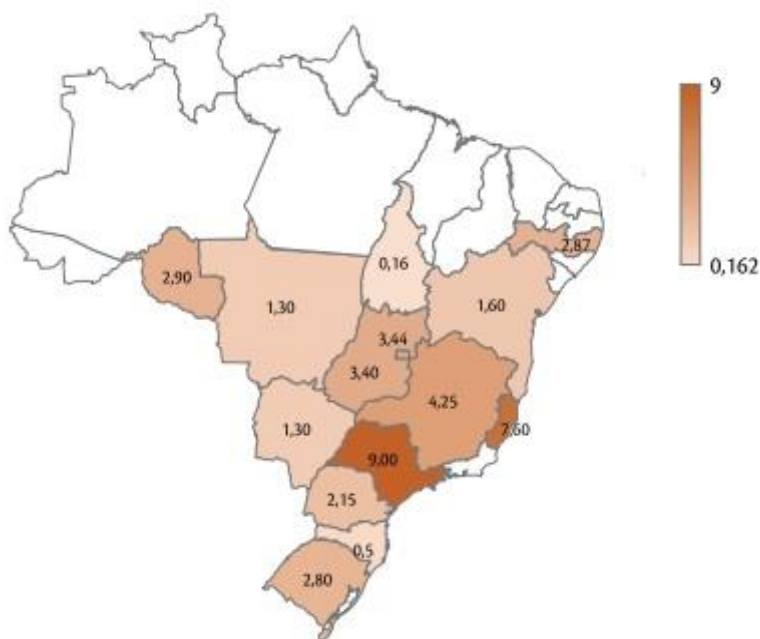
558 amostras de bovinos, denotam de 1995 e com isso tal ferramenta mostrou-se
559 eficaz na identificação de bacilos inviáveis bem como na rapidez de execução,
560 mas as desvantagens se restringiam aos métodos de extração (COLLINS et al.,
561 1994; RORING et al., 2000).

562 **2.2.3 Distribuição geográfica**

563 Em 2003 iniciou-se os inquéritos epidemiológicos com o objetivo de
564 identificar a prevalência de tuberculose bovina nos estados do Brasil. Até o ano
565 de 2018 foram realizadas as avaliações nas seguintes Unidades Federativas
566 (UF): BA, DF, ES, GO, MT, MS, MG, PR, PE, RS, RO, SC, SP e TO, entretanto
567 no presente estudo as UF de AC, PA e SE estavam com inquéritos em
568 andamento (Figuras 3 e 4) (BRASIL, 2020).



569 **Figura 3.** Prevalência de casos de tuberculose bovina por UF.
570 Fonte: (BRASIL, 2020).



571 **Figura 4.** Prevalência de focos de tuberculose bovina por UF.
 572 Fonte: (BRASIL, 2020).

573 **2.3 Espectroscopia UV-Vis**

574 A espectroscopia UV-Vis é uma técnica capaz de medir a absorção de
 575 radiação UV e/ou luz visível a partir das moléculas que compõe a substância
 576 analisada. Tal técnica funciona sob um intervalo de longitude de onda de 200 a
 577 800nm, resultando em informações sobre os estados de energia da amostra em
 578 questão (PERKAMPUS, 1992).

579 Espectrofotômetro é o instrumento usado para obter espectros de uma
 580 determinada amostra (OWEN, 2000). Além disso, dentre as espectroscopias, a
 581 UV-Vis é a mais utilizada no mundo, tendo aplicações diversas, contribuindo por
 582 exemplo em áreas biológicas na quantificação de proteínas determinação de
 583 atividades enzimáticas (BACON et al., 2004), avaliação de viabilidade celular
 584 (STOCKERT et al., 2012) e entre outras atividades.

585 Dentre as variadas aplicações, o uso de UV-Vis associado ao
 586 infravermelho, podem ser utilizadas na medicina resultando em efeitos gerais de
 587 fônica no corpo, cabelos, ossos e pele (ANDERSON et al., 1981; LIEBOLD et
 588 al., 2000). Ademais, a utilização dessa tecnologia pode ser útil no tratamento de
 589 eritema que é causado por determinadas doenças (KOLLIAS et al., 1994). Mas

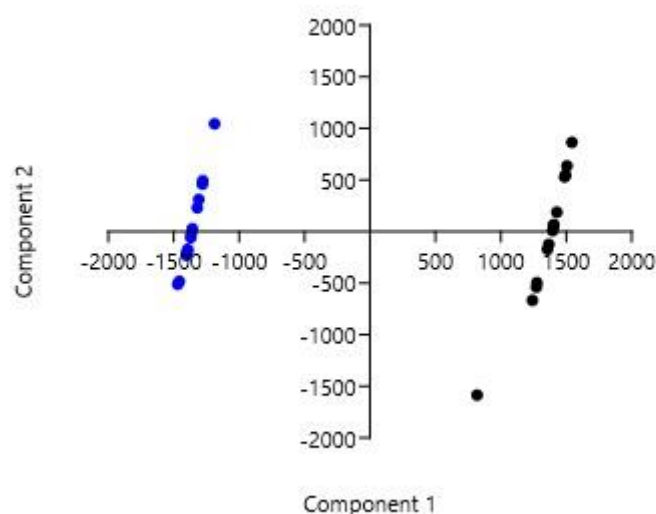
590 também vale destacar que diagnósticos prévios tem sido consequência do uso
591 desta tecnologia, por exemplo na detecção de pré-câncer e câncer de colo de
592 útero (BURGHARDT, 1984).

593 Neste cenário, o uso da técnica de espectroscopia ultravioleta-visível a
594 partir de biofluidos para diagnóstico de doenças infecciosas tais como a
595 brucelose e tuberculose bovina, pode resultar em um método de análise
596 sensível, específico e rápido, que poderá ser explorado em uma nova etapa do
597 programa nacional sanitário do Brasil (PNCEBT), contribuindo para identificação
598 de infectados em cenários de baixas prevalências, e erradicação da doença.

599 **2.4 PCA e Machine Learning**

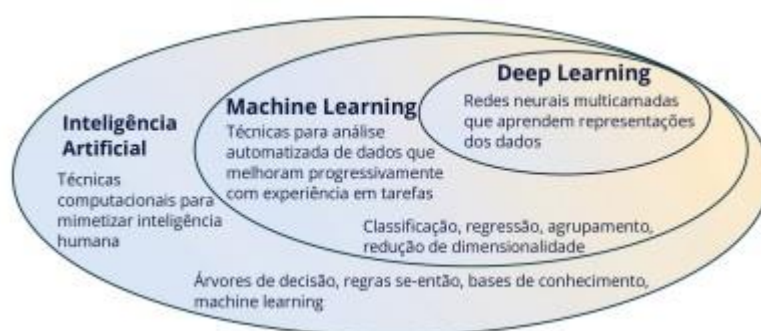
600 Análise de componentes principais (PCA) é uma ferramenta que
601 possibilita a partir de um conjunto de dados, a redução da sua dimensionalidade
602 em uma forma interpretável possibilitando a manutenção da maioria das
603 informações e com isso preservar o máximo de variabilidade possível (JOLLIFFE
604 et al., 2016). Em outras palavras, a PCA é uma técnica estatística de análise
605 multivariada que é capaz de utilizar e transformar um montante de dados
606 originais (variáveis) em um conjunto menor de variáveis (HONGYU et al., 2016).

607 A PCA tem como vantagens a exclusão da multicolinearidade das
608 informações, objetivando a mudança de dados originais intercorrelacionados em
609 um novo conjunto de dados não correlacionados (componentes principais).
610 Ademais, reduz as variáveis a eixos perpendiculares que explicam a variação
611 dos dados de forma independente e decrescente. As desvantagens de tal técnica
612 se restringem a sensibilidade a *outliers* não recomendada quando se tem muitos
613 zeros na matriz e dados ausentes. A seguir, na figura 5, é possível observar uma
614 representação gráfica de análise de componentes principais de amostras
615 positivas e negativas para tuberculose bovina obtidas através de espectros UV-
616 Vis.



617 **Figura 5.** PCA realizada com os dados de espectroscopia
 618 UV-Vis de amostras positivas (preto) e negativas (azul)
 619 para *Mycobacterium bovis*.
 620 Fonte: Arquivo pessoal.

621 O aprendizado de máquina (*machine learning*, ML), é uma ferramenta
 622 estatística que auxilia na busca de conhecimento científico através da
 623 identificação automatizada em diferentes conjuntos de dados e assim, em outras
 624 palavras, busca detectar padrões dos dados (HEY et al., 2009). Portanto, com o
 625 reconhecimento de diferentes padrões dos dados, é possível prever informações
 626 desconhecidas ou ajudar no processo de tomada de decisões em situações de
 627 incertezas (MURPHY, 2012). Além disso, segundo outras definições, ML
 628 melhora com a experiência em tarefas determinadas, mas sem ser totalmente
 629 colocada para efetuar tal função (SAMUEL, 1959; HASTIE et al., 2001). Tal
 630 técnica evoluiu a partir da inteligência artificial (IA), e basicamente, esta última,
 631 por sua vez, é qualquer auxílio que permite os computadores imitar a inteligência
 632 humana. A figura 6 exemplifica melhor a relação entre IA e ML (SCHLEDER et
 633 al., 2021).



634 **Figura 6.** Descrição hierárquica e exemplos de técnicas de IA e
 635 suas subáreas ML e Deep Learning (DL).
 636 Fonte: (SCHLEDER et al., 2021).

637 Assim, ML pode ser usada para duas finalidades: a primeira é com
 638 objetivo de solucionar problemas os quais outros métodos, como os tradicionais
 639 não conseguem resolver; a segunda seria para melhorar a resolução de
 640 questões que já foram resolvidas, seja de uma forma melhor e mais robusta,
 641 mais econômica, mais rápida, ou tudo simultaneamente. A seguir, na figura 7, há
 642 a demonstração, de uma forma básica, de como funciona um ML (SCHLEDER
 643 et al., 2021).



644 **Figura 7.** Os quatro componentes básicos do processo
 645 de *machine learning*.
 646 Fonte: (SCHLEDER et al., 2021).

647 Portanto, o aprendizado de máquina pode ser utilizado seguindo os quatro
 648 passos fundamentais: definição do problema; dados; representação; e
 649 algoritmos, validação e aplicação (SCHLEDER et al., 2021). Assim, ML pode ser
 650 usada como complemento, otimização e validação dos dados obtido através da

651 PCA, sendo que os dados desta última são rotineiramente empregados em
652 algoritmos de ML (HEEL et al., 2016).

653 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

654 AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MEIKLE, V. et al. Optimizing antigen
655 cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences
656 of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and
657 specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.12, p.4326-4335, 2006.

658 ABIMERHI, D.; GUTIÉRREZ, A.F.; VILLALOBOS, E.J. Uso de las pruebas
659 de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y aglutinación con rivanol para el
660 diagnóstico de brucelosis bovina en Yucatán. **Veterinária México**, v.29, n.2,
661 p.167-171, 1998.

662 ABRAHÃO, R.M.C.M. **Tuberculose humana causada pelo**
663 ***Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos**
664 **reservatórios animais**. 1998. 273p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
665 Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

666 ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles**
667 **comunes al hombre y a los animales**. Washington: O.P.S. p.28-25. 2001.

668 ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D. et al. **Techniques for the**
669 **brucellosis laboratory**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique,
670 1988. 190p.

671 ANDERSON, R.R.; PARRISH, J.A. The optics of human skin. **The**
672 **Journal of Investigative Dermatology**, v.77,1, n.77(1), p.13-9, 1981.

673 ARAUJO, O.W.; COELHO, C.J. Análise de componentes principais (PCA).
674 **University Center of Anápolis**, 2009.

675 ARÉSTEGUI, M.B.; GUALTIERI, S.C.; DOMÍNGUEZ, J. et al. El género
676 *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. **Veterinária**
677 **México**, v.32, n 2, p.131-139, 2001.

678 BACON, C.P.; MATTLEY, Y.; DEFRECE, R. Miniature spectroscopic
679 instrumentation: Applications to biology and chemistry. **Review of Scientific**
680 **instruments**, v.75, n.1-1, p.1-16, 2004.

681 BALDWIN, C.L.; PARENT, M. Fundamentals of host immune response
682 against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of
683 infection. **Veterinary Microbiology**, v.90, n.1-4, p.367-382, 2002.

684 BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. São Paulo:
685 Roca, p.178-183, 1998.

686 BISHOP, G.C.; BOSMAN, O.; HERR, S. et al. **Infectious diseases of**
687 **livestock**, Austin, Texas: AeM University Press, p.1053-1066, 1994.

688 BRANDTZAEG, P. The increasing power of immunohistochemistry and
689 immunocytochemistry. **Journal of Immunological Methods**, v.216, n.1-2 p.49-
690 67. 1998.

- 691 **Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento.**
692 Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
693 Animal, 2001.
- 694 **Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.**
695 Secretaria da Defesa Sanitária. Instrução normativa SDA nº 06, de 08 de janeiro
696 de 2004, aprova o regulamento técnico do Programa nacional de controle e
697 erradicação da brucelose e tuberculose animal. Diário Oficial da União, Brasília,
698 DF, Seção 1, p.6-10, 2004.
- 699 **Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.**
700 Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
701 Animal, 2006.
- 702 **Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.**
703 Diagnóstico Situacional do PNCEBT: Programa Nacional de Controle e
704 Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, 2020.
- 705 BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary**
706 **Microbiology**, v.90, n1-4, p.435-446, 2002.
- 707 BURGHARDT, E. **Colposcopy Cervical Pathology Textbook and Atlas.**
708 Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1984.
- 709 BUTLER, W.R.; JOST, K.C.; KILBURN, J.O. Identification of mycobacteria
710 by high-performance liquid chromatography. **Journal of Clinical Microbiology**,
711 v.29, n.1, p.268-272, 1991.
- 712 CAMPANÃ, R.N.; GOTARDO, D.J.; ISHIZUCA, M.M. **Epidemiologia e**
713 **Profilaxia da Brucelose Bovina e Bubalina.** Campinas, São Paulo:
714 Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA, 2003, 20p.
- 715 CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M. **Essentials of Veterinary**
716 **Bacteriology and Mycology.** Philadelphia, London, p.196-200, 1991.
- 717 CARVALHO, M.S.; BARROSO, M.R.; PINHAL, F. et al. Brucelose: Alguns
718 aspectos epidemiológicos. **Medicina Interna**, v.2, n.4, p.259-261. 1995.
- 719 CARVALHO, R. **Uso da Nested PCR para diagnóstico de tuberculose**
720 **em carcaças de bovinos.** 2013. Tese (Mestrado) - Faculdade de Agronomia,
721 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso,
722 Cuiabá, 2013.
- 723 **Centro panamericano de zoonosis.** Manual de normas y procedimientos
724 tecnicos para la bacteriologia de la tuberculosis. Buenos Aires: Cepancho, 30p,
725 1988.
- 726 CHATE, S.C.; DIAS, R.A.; AMAKU, M. et al. Situação epidemiológica da
727 brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivos Brasileiros de**
728 **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.46-55. 2009.

- 729 COLLINS, D.M.; ADFORD, A.J.; LISLE, G.W. et al. Diagnosis and
730 epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches.
731 **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2, p.83-94, 1994.
- 732 CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection
733 in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2, p.53-63, 1994.
- 734 COSIVI, O.; GRANGE, J.M.; DABORN, C.J. et al. Zoonotic tuberculosis
735 due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious**
736 **Diseases**, v.4, n.1, p.59-70, 1998.
- 737 COSTA, A.C.; REIS, M.C.G.; SILVA, B.D.S. et al. Resposta imune
738 humoral ao antígeno rGroES do *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com
739 tuberculose e seus contatos domiciliares. **Revista de Patologia Tropical**, v.40,
740 n.1, p.23-34, 2011.
- 741 DAJER, A.; LUNA-MARTÍNEZ, E.; ZAPATA, D. et al. Evaluation of a
742 fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in México.
743 **Preventive Veterinary Medicine**, v.40, n.1, p.67-73, 1999.
- 744 FARIAS, T.A.; ARAÚJO, F.R.; OSÓRIO, A.L.A.R. et al. ELISA based on
745 recombinant MPB70 and P27 for detection of antibodies against *Mycobacterium*
746 *bovis*. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, n.2, p.155-162, 2012.
- 747 FEKETE, A.; BANTLE, J.A.; HALLING, S.M. et al. Development of a
748 diagnostic Test for *Brucella* using Polymerase Chain Reaction. **Journal of**
749 **Applied Bacteriology**, v.69, n.2, p.216-227, 1990.
- 750 FILHO, G.L.P.; ALVES, A.J.S.; CARVALHO, L.G. et al. Occurrence of
751 brucellosis and bovine tuberculosis and risk perception in Mato Grosso do Sul,
752 Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.84, e0472016, 2017.
- 753 FLOYD, M.M.; SILCOX, V.A.; JONES, W.D. et al. Separation of
754 *Mycobacterium bovis* BCG from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium*
755 *bovis* by using high-performance liquid chromatography of mycolic acids. **Journal**
756 **of Clinical Microbiology**, v.30, n.5, p.1327-1330, 1992.
- 757 FOSGATE, G.T.; ADESIYUN, A.A.; HIRD, D.W. et al. Comparison of
758 serologic test for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo
759 (*Bubalus bubalis*). **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.11,
760 p.1598-1605, 2002.
- 761 FRÁGUAS, S.; CUNHA-ABREU, M.S.; FERREIRA, A.M. et al. Estudo
762 comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose
763 bovina em animais reagentes à tuberculinização. **Revista Brasileira de Ciência**
764 **Veterinária**, v. 15, n. 3, p.117-121, 2008.
- 765 GARCIA, M.; MELO, A.F.; CARVALHO, G.F. et al. Epidemiologia da
766 tuberculose bovina na América do Sul. **Research, Society and Development**,
767 v.10, n.9, p.e8610917936-e8610917936, 2021.

- 768 GODINHO, M.S.; PEREIRA, R.O.; RIBEIRO, K.D.O. et al. Classificação
769 de refrigerantes através de análise de imagens e análise de componentes
770 principais (PCA). **Química Nova**, v.31, n.6, p.1485-1489, 2008.
- 771 GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to
772 intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, v.90, n.1-4, p.281-297, 2002.
- 773 HAAGSMA, J. **Bovine tuberculosis**. Geneve: Office International des
774 Épizooties, 1995. 11p. (Manual Amendment 2).
- 775 HARMON, B.G.; ADAMS, L.G.; FREY, M. Survival of rough and smooth
776 strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. **American**
777 **Journal of Veterinary Research**, v.49, n.7, p.1092– 1097, 1988.
- 778 HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R.; FRIEDMAN, J.H. **The elements of**
779 **statistical learning: data mining, inference, and prediction**. New York:
780 Springer, 2001.
- 781 HEEL, M.V.; PORTUGAL, R.V; SCHATZ, M. et al. Multivariate statistical
782 analysis of large datasets: single particle electron microscopy. **Open Journal of**
783 **Statistics**, v.6, n.04, p.701, 2016.
- 784 HEY, T.; TANSLEY, S.; TOLLE, K. et al. **The Fourth Paradigm: Data-**
785 **Intensive Scientific Discovery**, Redmond, WA: Microsoft research, 2009.
- 786 HONGYU, K.; SANDANIELO, V.L.M.; OLIVEIRA, J. et al. Análise de
787 componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **E&S**
788 **Engineering and Science**, v.5, n.1, p.83-90, 2016.
- 789 Huber, J.D.; Nicoletti, P. Comparison of the results of card, rivanol,
790 complement-fixation, and milk ring tests with the isolation rate of *Brucella abortus*
791 from cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.7, p.1529-1531,
792 1986.
- 793 JONES, S.L.; COX, J.C.; SHEPHERD, J.M. et al. Removal of false-
794 positive reactions from plasma in an enzyme immunoassay for bovine interferon-
795 gamma. **Journal of Immunology Methods**, v.155, n.2, p.233-240, 1992.
- 796 JOLLIFFE, I.T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and
797 recent developments. **Philosophical transactions of the royal society A:**
798 **Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v.374, n.2065,
799 p.20150202, 2016.
- 800 JORGE, K. **Identificação de Mycobacterium bovis em bovinos e sua**
801 **importância na ocorrência de tuberculose zoonótica**. 2010. Tese de
802 doutorado - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.
- 803 KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and
804 Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary**
805 **Microbiology**, v.40, n.1-2, p.5-14, 1994.

- 806 KLASTER, P.R.; KUIJPER, S.; INGEN, C.W.V. et al. Stabilized, freeze-
807 dried PCR mix for detection of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**,
808 v.36, n.6, p.1798-1800, 1998.
- 809 KOLLIAS, N.; BAQER, A.; SADIQ, I. Minimum erythema dose
810 determination in individuals of skin type V and VI with diffuse reflectance
811 spectroscopy. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**,
812 v.10, n.6, p.249–254, 1994.
- 813 LAGE, A.P.; ROXO, E.; MULLER, E. et al. **Programa nacional de**
814 **controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT)**.
815 Brasília: Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento, 2006. 188p.
816 (Manual técnico).
- 817 LAGE, A.P.; POESTER, F.P.; PAIXÃO, T.A. et al. Brucelose bovina: uma
818 atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.3, p.202-212,
819 2008.
- 820 LAWINSKY, M.L.J.; OHARA, P.M.; ELKHOURY, M.R. et al. Estado da arte
821 da brucelose em humanos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.4, p.10-
822 10, 2010.
- 823 LEYLA, G.; KADRI, G.; UMRAN, O.K. Comparison of polymerase chain
824 reaction and bacteriological cultura for the diagnosis of sheep brucellosis using
825 aborted fetus samples. **Veterinary Microbiology**, v.93, n.1, p.53-61, 2003.
- 826 LIEBOLD, K.; FASSLER, D.; SCHMIDT, W.D. et al. In vivo spectroscopy
827 in dermatology: methods and new fields of application. **Journal of the European**
828 **Academy of Dermatology Venereology**, v.14, n.1, p.1-4, 2000.
- 829 LIRA, N.S.C. **Lesões anatomopatológicas e detecção da *Brucella ovis***
830 **cepa REO em ovinos inoculados experimentalmente pelas vias**
831 **intraprepucial e conjuntival simultaneamente**. 2008. Tese (Doutorado) -
832 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista,
833 FMVZ/UNESP - Campus de Botucatu/SP, Botucatu, São Paulo, 2008.
- 834 LIU, S.; GUO, S.; WANG, C. et al. A novel fusion protein-based indirect
835 enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis.
836 **Tuberculosis**, v 87, n.3, p.212-217, 2007.
- 837 MARCONDES, A.G. **Padronização da técnica de cultivo em**
838 **camadadelgada de agar mildlebrook 7 H11 para isolamento de**
839 ***Mycobacterium bovis***. 2002. 115p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
840 Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo,
841 2002.
- 842 MARTINHO, J. M. G. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e
843 Visível. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v.52, n.3, p.44-46,
844 1994.
- 845 MASCARENHAS, D.R.M. **Validação da técnica de PCR em tempo real**
846 **(qPCR) para detecção de *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus* em**

- 847 **amostras de leite cru**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
848 Viçosa, Viçosa, 2017.
- 849 MATHIAS, L.A.; CORBELLINI, L.G.; MAIA, L. et al. Validação
850 interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico
851 sorológico da brucelose bovina. **Ciência Rural**, v.40, n.10, p.2135-2140, 2010.
- 852 MATRONE, M.; KEID, L.B.; ROCHA, V.C.M. et al. Evaluation of DNA
853 extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted PCR detection
854 in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain
855 2308. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 480-489, 2009.
- 856 MATTHIAS, D. Infecções por microbactérias. In: Beer, J. **Doenças**
857 **infeciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, p.261-289, 1988.
- 858 MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MARCOS, J.G. et al. Evaluation of rapid
859 agglutination, tube agglutination, buffered plate antigen and 2- mercaptoethanol
860 tests in the diagnosis of bovine brucellosis. **Brazilian Journal of Veterinary**
861 **Research and Animal Science**, v.37, n.4, p.395-399, 2000.
- 862 MEIRELLES-BARTOLI, R.B.; MATHIAS, L.A. Estudo comparativo entre
863 os testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em
864 bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.11-17, 2010
- 865 MENESES, I.D.S. **Avaliação de proteínas recombinantes para**
866 **detecção de anticorpos contra Mycobacterium bovis por ELISA**. 2015.
- 867 MENZIES, D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting,
868 conversion, and reversion. **American Journal of Respiratory and Critical Care**
869 **Medicine**, v.159, n.1, p.15-21, 1999.
- 870 MONAGHAN, M.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, D. et al. The tuberculin test.
871 **Veterinary Microbiology**. v.40, n.1-2, p.111-124, 1994.
- 872 MORENO, E.; MORIYÓN, I. et al., Thegenus Brucella. In: Kersters, K.;
873 Paul, M.G.V.; SWINGS, J. et al. (eds). **The Prokaryotes**. New York, NY:Springer,
874 p.315–456, 2006.
- 875 MURPHY, KP. **Machine Learning: A Probabilistic Perspective**. London:
876 MIT Press, 2012. 421p.
- 877 NEILL, S.D.; POLLOCK, I.M.; BRYSON, D.B. et al. Pathogenesis of
878 *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2,
879 p.41-52, 1994.
- 880 NETA, A.V.C.; MOL, J.P.; XAVIER, M.N. et al. Pathogenesis of bovine
881 brucellosis. **The Veterinary Journal**, v.184, n.2, p.146–155, 2010.
- 882 NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary**
883 **Microbiology**, v.90, p.447-459, 2002.

- 884 NOZAKI, C.N. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação de**
885 **métodos de diagnósticos nas fases da evolução da brucelose em ovinos**
886 **inoculados experimentalmente com *Brucella ovis***. 2008. 109p. Tese
887 (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade
888 Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.
- 889 **OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES**. Manual of
890 Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 5 ed. Paris: Office International
891 des Epizooties, p. 328-345, 2008.
- 892 **OIE - Organização Mundial de Saúde Animal**. Terrestrial manual -
893 access online. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
894 Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE. Bovine
895 tuberculosis, v.1, pt 2, chap. 2.4.7. Bovine tuberculosis, 2009.
- 896 **OIE- Organização mundial de saúde animal**. Listed Diseases, Infections
897 and Infestations in Force in 2016; 2016.
- 898 OLIVEIRA, JP. **Estudo das lesões sugestivas de brucelose em**
899 **bovinos e bubalinos abatidos para consumo**. 2003. 53p. Dissertação
900 (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Pará, 2003.
- 901 **Organización panamericana de la salud**. Situación de la tuberculosis
902 bovina en las Américas. Washington, D.C.,1995. 6p. (RIMS A 9, Informativo 26).
- 903 OWEN, T. **Fundamentals of UV-Visible Spectroscopy: A Primer**.
904 Agilent Technologies, Germany, 2000.
- 905 PAJUABA, A.C.A.M. **Avaliação de frações hidrofóbicas e hidrofílicas**
906 **de *Brucella abortus* em ensaios imunoenzimáticos para caracterizar o perfil**
907 **de anticorpos produzidos por bovinos vacinados e não-vacinados**. 2006.
908 64 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade
909 Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.
- 910 PAULIN, L.M.; NETO, J.S.F. **O combate à brucelose bovina: situação**
911 **brasileira**. Jaboticabal: Funep, 2003. 154p.
- 912 PAULIN, L.M.; NETO, J.S.F. Brucelose em búfalos. **Arquivos do**
913 **Instituto Biológico**, v.75, n.3, p.389-401, 2008.
- 914 PERKAMPUS, H.H. **Introduction**. In: **UV-VIS Spectroscopy and Its**
915 **Applications**. Berlin: Springer Science & Business media, 1992, 29p.
- 916 PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose – uma revisão
917 sistematizada. **Medicina Interna**, v.10, n.2, p.91-100. 2005.
- 918 POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; LAGE, A.P. Diagnóstico da
919 brucelose bovina. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n.47, p.13-29,
920 2005.
- 921 POESTER, F.; FIGUEIREDO, V.C.F.D.; LÔBO, J.R. et al. Estudos de
922 prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e

- 923 Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de**
924 **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.01-05, 2009.
- 925 PRITCHARD, D.G.A. A century of bovine tuberculosis 1888 - 1988,
926 conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v.99, n.4,
927 p.357-399, 1988.
- 928 QUEIPO-ORTUNO, M.I.; MORATA, P.; OCÓN, P. et al. Rapid diagnosis
929 of human brucellosis by peripheral-blood pcr assay. **Journal of Clinical**
930 **Microbiology**, v.35, n.11, p.2927-2930. 1997.
- 931 RIBEIRO, M.G.; MOTTA, R.G.; ALMEIDA, C.A.S. Brucelose equina:
932 aspectos da 646 doença no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**,
933 v.32, 647 n. 2, p.83-92, 2008.
- 934 RORING, S.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R.A. et al. Simultaneous detection
935 and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue
936 specimens by spoligotyping. **Veterinary Microbiology**, v.74, p.227-236, 2000.
- 937 RUGGIERO, A.P.; IKUNO, A.A.; FERREIRA, V.C.A. et al. Tuberculose
938 bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74,
939 p.55-65, 2022.
- 940 SAKAMOTO, S.M.; HEINEMANN, M.B.; TELLES, M.A.S. et al. Detecção
941 e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação em cadeia da polimerase
942 (PCR). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.66, n.2, p.44-58, 1999.
- 943 SALAZAR, F.H.P. **Ocorrência de tuberculose causada por**
944 ***Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de**
945 **Mato Grosso**. 2005. 68p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
946 Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo
947 Grande, 2005.
- 948 SALES, M.L. **Identificação de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium***
949 **tuberculosis por PCR**. 2012. 62p. Tese (Mestrado) - Escola de Veterinária da
950 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- 951 SAMUEL, A.L. Some studies in machine learning using the game of
952 checkers. **IBM Journal of Research and Development**, v.3, n.3, p.210-229,
953 1959.
- 954 SANTOS, RL.; MARTINS, T.M.; BORGES, Á.M. et al. Perdas econômicas
955 devidas à brucelose bovina no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.
956 3, p.759-764, 2013.
- 957 SCHLEDER, G.R.; FAZZIO, A. Machine Learning na Física, Química, e
958 Ciência de Materiais: Descoberta e Design de Materiais. **Revista Brasileira de**
959 **Ensino de Física**, v.43, 2021.
- 960 SEÓNADH, O.L.; MICHAEL, S.; TORRES, S. *Brucella abortus* detection
961 by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows.
962 **Research in Veterinary Science**, v.81, n.2, p.170-176, 2006.

- 963 SILVA, C.S. **Espectroscopia no Infravermelho para Aplicações**
964 **Forenses: documentoscopia e identificação de sêmen em tecidos.** 2007.
965 Tese (doutorado) - Departamento de Química Fundamental da Universidade
966 Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- 967 SILVA, F.L.; PAIXÃO, T.A.; BORGES, A.M. et al. Brucelose Bovina.
968 **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, v.47, p.1-12, 2005.
- 969 SILVA, M.C.; MOURA, M.S.; REIS, D.O. **Tuberculose – Revisão de**
970 **literatura.** Londrina: PUBVET, v.5, n.17, 2011.
- 971 SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F.J. **Fundamentos de Química**
972 **Analítica.** Mexico: Thompson, 2005.
- 973 SOUZA, I.I.; MELO, E.S.; RAMOS, C.A.N. et al. Screening of recombinant
974 proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine
975 tuberculosis. **Springerplus**, v.1, n.1, p.1-6, 2012.
- 976 STOCKERT, J.C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M. et al. MTT
977 assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid
978 droplets. **Acta Histochemica**, v.114, n.8, p.785-796, 2012.
- 979 TANYA, V.; NICOLETTI, P.V. Comparison of enzymelabeled
980 immunosorbent assay and particle concentration fluorescence immunoassay
981 with standard serologic methods and bacteriologic culture for detection of
982 *Brucella* sp.-infected cows in herds with brucellosis. **Journal of the American**
983 **Veterinary Medical Association**, v.202, n.12, p.1975-1977, 1993.
- 984 THOMAZ, L.W. Apostila: **Conhecimentos Específicos para Médico**
985 **Veterinário.** Editora Vesticon, p.48-82, 2006.
- 986 VITALE, F.; CAPRA, G.; AXIA, L. Detection of *Mycobacterium tuberculosis*
987 complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates and nasal swabs.
988 **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.4, p.1050-1055, 1998.
- 989 WALKER, R.L. *Brucella*. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia**
990 **Veterinária.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., p.185-191, 2003.
- 991 WARDS, B.J.; COLLINS, D.M.; LISLE, G.W. Detection of *Mycobacterium*
992 *bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v.43,
993 n.2-3, p.227-240, 1995.
- 994 WATERS, W.R.; BUDDLE, B.M.; VORDERMEIER, H.M. et al.
995 Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use
996 in the detection of bovine tuberculosis in cattle. **Clinical and Vaccine**
997 **Immunology**, v.18, n.11, p.1882-1888. 2011.
- 998 WIT, D.; TEYN, L.; SHOEMAKER, S. et al. Direct detection of
999 *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. **Journal**
1000 **of Clinical Microbiology**, v.28, n.11, p.2437-2441, 1990.

1001 WOOD, P.R.; ORNER, L.A.; ROTHEL, J.S. et al. Field comparison of the
1002 interferon gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of
1003 bovine tuberculosis. **Australian Veterinary Journal**, v.68, n.9, p.286-290, 1991.

1004 **World health organization**. Zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*)
1005 memorandum from a WHO meeting with the participation of FAO. Bulletin of
1006 World Health Organization, v.72, p.8510-8857, 1994.

1007 XAVIER, M.N. **Desenvolvimento de PCR espécie-específico para o**
1008 **diagnóstico da infecção por Brucella ovis e avaliação comparativa de**
1009 **métodos sorológicos**. 2009. 68p. Dissertação (Mestrado) - Escola de
1010 Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

1011 ZANDEN, A.G.M. **Spoligotyping, a tool in epidemiology, diagnosis**
1012 **and control of tuberculosis**. 2002. p.12-45. Tese (Doutorado) - Katholieke
1013 Universiteit Nijmegen, Nijmegen, 2002.

1014 ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P. et al. *Mycobacterium*
1015 *bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and
1016 genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction
1017 fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.6,
1018 p.2809-2813, 2001.

1019 **4. CAPÍTULO I**

1020 **Turning chaotic sample group clusterization into organized ones by** 1021 **feature selection: Application on photodiagnosis of *Brucella abortus*** 1022 **serological test**

1023

1024 Bruno Silva de Rezende^a, Thiago França^b, Herbert Patric Kellermann
1025 Cleveland^a, Cícero Cena^{*b} and Carlos Alberto do Nascimento Ramos^a

1026 Bovine brucellosis diagnosis is a major problem to be solved, the disease has a
1027 great economic impact with significant losses in meat and dairy products, besides
1028 the fact that it can be transmitted to humans. The sanitary measures instituted in
1029 Brazil are based on disease control through diagnosis, animal sacrifice, and
1030 vaccination. Although the currently available diagnostic tests show good quality
1031 parameters, they are time-consuming, and the incidence of false-positive and/or
1032 false-negative results is still observed, which difficult the effectively control the
1033 disease. The development of a low-cost, fast, and accurate brucellosis diagnosis
1034 test remains a need for proper sanitary measures at a large-scale analysis. In this
1035 context, spectroscopy techniques associated with machine learning tools have
1036 shown great potential for use in diagnostic tests. In this study, bovine blood serum
1037 was investigated by UV-vis spectroscopy and machine learning algorithms to
1038 build a prediction model for *Brucella abortus* diagnosis. Here we first apply
1039 principal component analysis to observe the group formation tendency, the first
1040 results showed no clustering tendency with a messy sample score distribution,
1041 then we properly select the main principal components to improve clusterization.
1042 Finally, by using machine learning algorithms (SVM and KNN), the predicting
1043 models achieved a 92.5% overall accuracy. The present methodology provides
1044 a test result in an average time of 5 minutes, while the standard diagnosis, with
1045 the screening and confirmatory tests, can take up to 48 hours. The present result
1046 demonstrates the viability of the method for diagnosing bovine brucellosis, which
1047 can significantly contribute to disease control programs in Brazil and other
1048 countries.

1049 **Keywords:** photodiagnosis; diagnostic test; UV-vis spectroscopy; machine
1050 learning; bovine brucellosis

1051 **Introduction**

1052 Bovine brucellosis is a chronic disease that has a great economic
1053 impact with significant losses in meat and dairy products, besides the fact
1054 that it can be transmitted to humans¹. The prevalence of bovine brucellosis
1055 outbreaks in Brazil is variable according to the region ranging from 0.32%
1056 to 41.5%². The economic impact of brucellosis in cattle herds occurs mainly
1057 due to abortions, underdeveloped calves, lower reproductive index, and
1058 lower production of milk and dairy products³. Bovine brucellosis in Brazil
1059 generated important economic losses. In some regions, the annual
1060 economic losses per herd can reach US\$ 5.890,16⁴.

1061 *Brucella abortus*, the causative agent of brucellosis in cattle, is a
1062 gram-negative, non-spore-forming, non-motile, facultative intracellular,
1063 aerobic, and flagellated bacterium⁵. This microorganism is resistant to
1064 inactivation in the environment being able to remain active for several
1065 months with a high transmission potential⁶. The infection can cause various
1066 inflammatory reactions that can result in splenomegaly, hepatomegaly, and
1067 even lymphoid hyperplasia, in addition, clinical signs in the locomotor
1068 system can affect associated muscles, bursae, tendons, and joints⁷.

1069 The bacterial infection settles preferentially in the pregnant uterus,
1070 breast tissue, bones, organs, and male reproductive system. In general,
1071 infected pregnant females may present placental deficiency, endometritis,
1072 abortions, or even give birth to underdeveloped calves^{8,9}. Humans can also
1073 be infected by contact with contaminated animal products or animals,
1074 showing clinical symptoms of joint pain, fever, cough, nausea, headache,
1075 reactive lymph nodes, myalgia, depression, and weight loss. In addition,
1076 suppurations may occur in organs such as the liver and spleen^{10,11}.

1077 In 2001, sanitary measures were instituted in Brazil by the National
1078 Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and

1079 Tuberculosis (PNCEBT), seeking to reduce the prevalence and incidence
1080 of brucellosis and tuberculosis. The PNCEBT is based on disease control
1081 through diagnosis, animal sacrifice, and vaccination for brucellosis. The
1082 diagnosis of *B. abortus* consists of clinical, epidemiological, and mainly
1083 laboratory tests, the latter being divided into direct and indirect. The
1084 PNCEBT defines as official laboratory tests (i) screening tests: Buffered
1085 Acidified Antigen (BAAT), Milk Ring Test (MRT); and (ii) confirmatory tests:
1086 2-Mercaptoethanol (2-ME), Seroagglutination in Tubes (SAT),
1087 Complement Fixation Test (CFT) and Fluorescent Polarization Test (FPA)
1088 ¹².

1089 The BAAT test is based on the agglutination of the antigen with
1090 specific IgG antibodies, although it is considered a low-specificity test once
1091 the same reaction can also occur due to the vaccine (B19) antibodies, and
1092 infected animals by other bacteria genera. While the MRT test consists of
1093 a high-sensitivity test, in which a positive result is obtained when a bluish
1094 ring is formed if an antigen-antibody combination occurs. However, the
1095 MRT can present false positive results due to mastitis, the presence of
1096 acidic milk, and colostrum ¹². Although BAAT and 2-ME associated with
1097 SAT tests are routinely used in Brazil as screening and confirmatory tests,
1098 a small number of false-negative and false-positive results are still
1099 observed ¹³. If an animal was considered negative in the screening or
1100 confirmatory test, it will remain in the herds as a source of infection for other
1101 animals, making it difficult to effectively control the disease.

1102 Then, the development of fast and accurate methods for practical
1103 diagnoses arises to improve disease control at a low-cost and easy
1104 implementation. In recent years, optical spectroscopy has been evaluated
1105 in the diagnosis of different diseases ^{14,15,16}. Although smaller values for
1106 sensitivity and specificity have been observed compared to standard tests,
1107 the easy implementation, low cost, fast response, lack of multiple
1108 processing steps, or the use of specific reagents call attention. In recent
1109 studies, by using canine blood serum *Leishmania infantum* infected dogs
1110 were identified with 85% accuracy by using Fourier-transformed infrared
1111 spectroscopy (FTIR), and 75% accuracy by using UV-vis spectroscopy ¹⁷.

1112 Besides the different data analyses, the main difference in the final
1113 accuracy result may be related to each technique, FTIR provides
1114 information related to molecular vibrational modes, while UV-vis provides
1115 information related to the electronic transition in molecular orbitals.

1116 FTIR can be able to access more important information from a
1117 molecular point of view, but UV-Vis spectroscopy is much more common in
1118 laboratories, easy to handle, economic, and technically more viable. In this
1119 study, bovine blood serum was investigated by UV-Vis spectroscopy and
1120 machine learning algorithms to build a prediction model for *Brucella abortus*
1121 diagnosis. Here the inclusion of an antigen source in the serum may
1122 promote an antigen-antibody interaction, in positive samples, causing
1123 changes in the sample molecular electronic orbitals. Whereas in negative
1124 samples, antigen and antibody molecules would remain separate and no
1125 significant changes may occur. These differences may allow more
1126 efficient identification of the spectra with the aid of machine learning
1127 algorithms.

1128 **Materials and Methods**

1129 **Sample description, preparation, and UV-Vis spectroscopy**

1130 A total of 106 bovine blood serum samples were kindly provided by
1131 the National Agricultural Laboratory of Pedro Leopoldo, Minas Gerais
1132 (LANAGRO – MG), Brazil. The samples were divided into negative (53
1133 samples) and positive (53 samples) for antibodies against *B. abortus*
1134 groups according to reference tests recommended by Brazilian legislation
1135 (BAAT, 2-ME, and SAT). Also, commercial antigens composed of an
1136 inactivated suspension of *B. abortus* 1119/3 diluted to 4.5% in 0.85% saline
1137 containing 0.5% of phenol and manufactured by Instituto Biológico (São
1138 Paulo, Brazil) were used. The antigen was kept under refrigeration (4°C)
1139 before use, according to the manufacturer's instructions.

1140 First, an exploratory test was performed by using 6 positives and 6
1141 negative serum samples to determine the better antigen/serum proportion

1142 rate for group discrimination in our analysis. Different antigen-serum
1143 dilutions (1:1 to 1:16) were evaluated, and the best ratio (1:1) was found
1144 and used to investigate the other samples. Then, the UV sample spectrum
1145 was obtained from 2 μ L of serum antigen mixture, in a NanoDrop One C
1146 (Thermo Fisher Scientific) spectrophotometer, in the 200 to 300 nm range,
1147 after 3 minutes of incubation at room temperature.

1148 **Data analysis and sample classification**

1149 The data analysis was implemented and performed in the Python
1150 programming language (version 3.9.12), using the Scikit-learn package
1151 (version 1.1.2) ¹⁸. First, each UV-Vis spectra were subjected to pre-
1152 processing using the Standard Normal Variate (SNV). This method allows
1153 the removal of the variation from the baseline and rescales the
1154 absorbances, preventing random experimental variations from interfering
1155 with the result ¹⁹. Then, UV-SNV spectra, in the 200 nm to 300 nm range,
1156 was submitted to principal component analysis (PCA) ²⁰, an unsupervised
1157 method that converts multiple variables into a few principal components
1158 through dimension reduction, retaining most of the information from the
1159 original variables and express the data variation in a score plot. It also,
1160 allows us to analyze the main data variance in the analyzed spectral range
1161 through the loading plot. PCA is an important step to visualize the group
1162 classification tendency, and the output data have shown better
1163 performance to build a prediction model based on machine learning
1164 algorithms than raw spectral data ^{17,21}.

1165 Finally, a sample classification test was performed by using PCA
1166 data submitted to machine learning (ML) algorithms. We use ML algorithms
1167 based on three different methods: (i) Discriminant Analysis (DA), which
1168 classifies the sample based on the distance between the sample data and
1169 the contour built by using a linear or quadratic function to separate the
1170 classes (group) ²²; (ii) k-Nearest Neighbor (KNN) uses the Euclidean
1171 distance between k (k= 1, 5, 10, 100) closest neighbors to classify the
1172 sample ²³; and (iii) Support Vector Machine (SVM), which organizes each

1173 sample class through the optimization of a hyperplane – the hyperplane
1174 can be linear or nonlinear, being optimized to reach high performance –
1175 between the classes ²⁴.

1176 Each ML algorithm can use a determined number of PCs (input data)
1177 to build the predicting model, but to avoid overfitting and underfitting is
1178 mandatory to determine the ideal number of Principal Components (PCs).
1179 Here we used the Feature Selection Recursive Feature Elimination (RFE),
1180 which may select the main PCs that most contribute to achieve high
1181 accuracy and remove other PCs with the weakest contribution. The use or
1182 removal of a determined PC was made based on the accuracy achieved by
1183 using Linear Discriminant Analysis (LDA) to classify the samples in a Leave
1184 One Out Cross-validation (LOOCV) test.

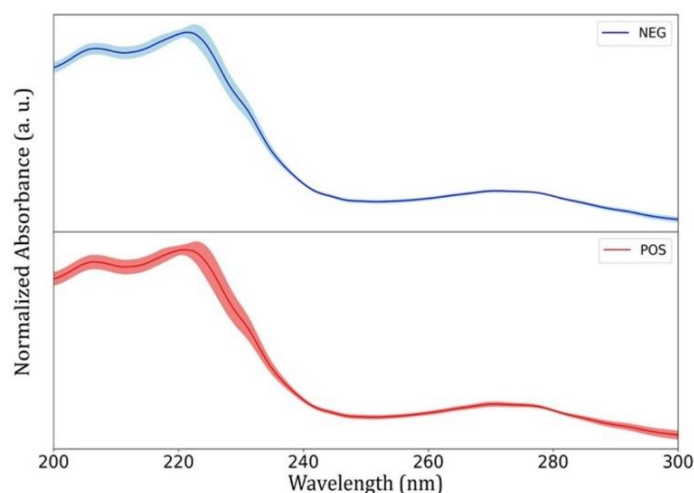
1185 In LOOCV, one sample is taken from the data set, and the others are
1186 used to build the prediction model (training). Then, the sample data draw is
1187 used to assess the quality of the model (test). The procedure is repeated
1188 until all sample data have been tested. Model quality is measured by
1189 accuracy, and the average percentage of correct answers remains in each
1190 test ²⁵.

1191 Then, a ranking of PCs is established and the PCs with the weakest
1192 contribution for accuracy are gradually removed from the data set until the
1193 highest accuracy is obtained with the lowest number of PCs ²⁶. Finally, once
1194 the main PCs were determined and selected by RFE, a new LOOCV test
1195 was performed by using DA, KNN, and SVM algorithms.

1196 **Results and Discussion**

1197 The average antigen/serum UV-SNV spectra for bovine brucellosis
1198 positive and negative groups, Figure 8, exhibit two wide electronic bands
1199 centered around 206 and 220 nm, followed by a small shoulder around 230
1200 nm, and a wide and weak band centered around 273 nm, probably
1201 assigned to $n \rightarrow \pi^*$ and $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions in carbonyl groups from proteins
1202 and amino acids [ref]. The data standard deviation is shown as a shadow
1203 around the main average spectra, the first three absorption bands carry the

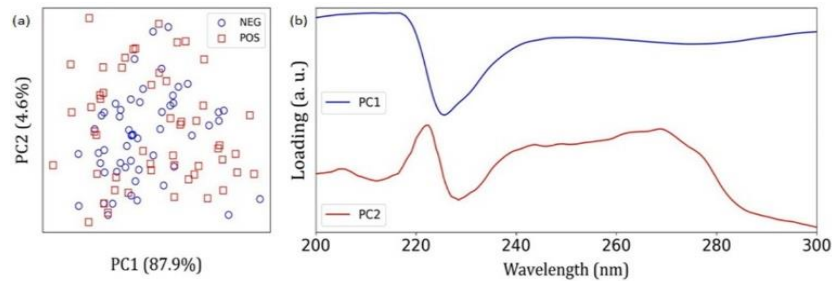
1204 largest contribution to the standard deviation, despite this, the data
 1205 obtained showed a small and usual deviation between them. No difference
 1206 between both UV-SNV spectra could be identified by the naked eye, then
 1207 we use a multivariate analysis approach to differentiate both groups.



1208 Figure 8: Average antigen/serum UV-SNV spectra for bovine
 1209 brucellosis positive (POS - red color) and negative (NEG – blue color)
 1210 groups. The standard deviation is evidenced by the colored shadow
 1211 around the mainline. Main electronic bands centered around 206,
 1212 220, and 273 nm, assigned to $n \rightarrow \pi^*$ and $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions in
 1213 carbonyl groups from proteins and amino acids.

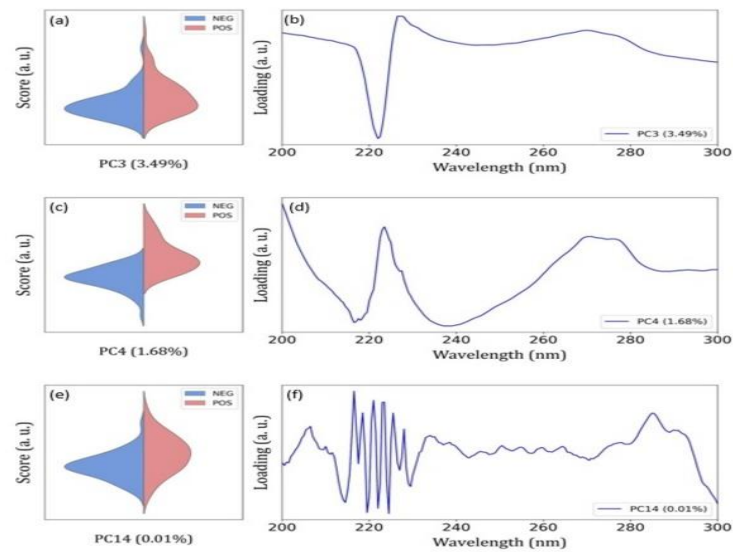
1214 Figure 9 shows the principal component analysis results for the UV-
 1215 SNV spectral data from bovine brucellosis positive and negative groups.
 1216 Figure 9^a exhibits the PC1 versus PC2 score plot, which was responsible
 1217 for 92.1% of data variance with no cluster formation or group separation
 1218 evidenced – exhibiting a messy sample score distribution. The loading plot,
 1219 Figure 9^b, suggests that the main contribution for data variance in PC1 and
 1220 PC2 is assigned to the 220-230 nm range followed by the 235-280 nm
 1221 range. To improve group separation and clustering formation with success,
 1222 usually we divide the data set into different ranges ^{27,28}, searching for
 1223 spectral information that most contributes to group separation. But here the
 1224 antigen/serum UV bands are too wide, and the data variance is present in
 1225 the entire range for PC1 and PC2, so as an alternative, we have to find the

1226 best PCs – it means, the best data projection – that most contribute to data
 1227 separation.



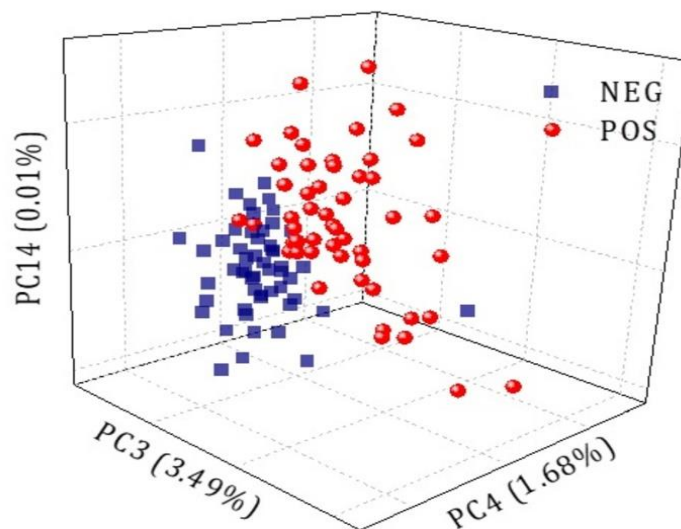
1228 Figure 9: Principal Component Analysis for UV-SNV
 1229 spectra: (a) score plot for PC1 versus PC2 from bovine
 1230 blood serum UV-SNV spectra, [red square] bovine
 1231 brucellosis positive group, and [blue circle] negative
 1232 group. (b) Loadings for PC1 and PC2 in the 200 to 300 nm
 1233 range.

1234 First, the Feature Selection Recursive Feature Elimination (RFE) was used
 1235 to find the main PCs that most contribute to achieving high accuracy. To perform
 1236 such selection the overall accuracy for sample classification achieved by one
 1237 specific PC was determined by using Linear Discriminant Analysis (LDA) in a
 1238 Leave One Out Cross-validation (LOOCV) test. The main PCs found for our data
 1239 were PC3, PC4, and PC14. Figure 10 shows the violin plot and loading plot for
 1240 PC3, PC4, and PC14, respectively. The violin plot exhibits the score data
 1241 distribution project over the respective PC for the bovine brucellosis positive and
 1242 negative groups. A monomodal distribution was found for both PCs, and the
 1243 median value (around the peak center) assumes a better distinct position
 1244 projection over the axis for these PCs compared to the others.



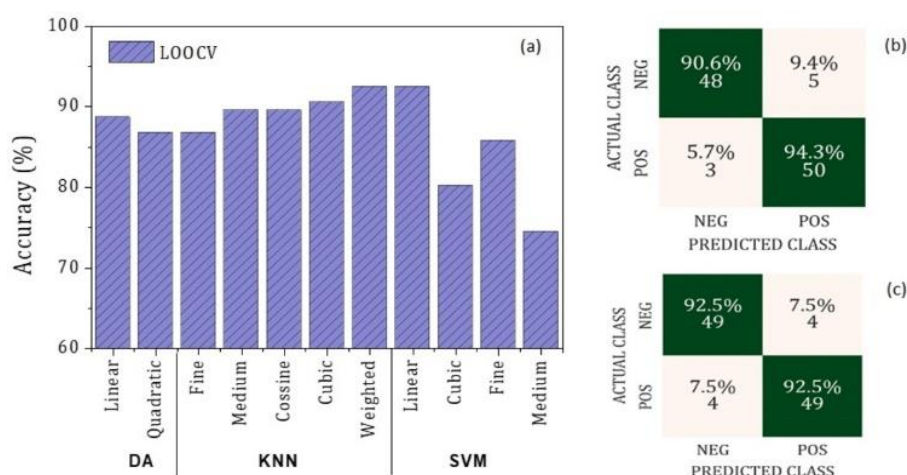
1245 Figure 10: Violin plot for three main PCs normalized scores
 1246 selected by RFE in 200 to 300 nm from bovine brucellosis positive
 1247 group (red color), and negative group (blue color). A monomodal
 1248 distribution is shown with the main peak center dislocated for both
 1249 groups when projected over the y-axis direction. The data variance
 1250 percentage of each PC is described below each plot. Respective
 1251 loading plots for PC3 (b), PC4 (d), and PC14 (f) are also shown.

1252 The PC3, PC4, and PC14 were responsible for only 5.18% of data
 1253 variance. The PC14 was responsible for only 0.01%, but the median for
 1254 score distribution over the vertical axis for both groups drive us to a different
 1255 position, which contributes to sample classification in the LDA algorithm.
 1256 Besides that, the loading plot for each PC, Figure 10 (right column), shows
 1257 a high contribution for data variance in the 220 to 230 nm range in
 1258 accordance with the main bands identified in the UV-SNV spectra (Figure
 1259 8). Then, low data variance PCs can be also useful for sample
 1260 classification, not only PC with high accuracy must influence the algorithm
 1261 performance. These aspects were confirmed by the score plot for PC3 x
 1262 PC4 x PC14, Figure 11, which exhibited a clear tendency for clustering and
 1263 group separation.



1264 Figure 11: Principal Component Analysis for UV-SNV spectra after
1265 RFE analysis. 3D Score plot for PC3 versus PC4, and PC14 from
1266 bovine blood serum UV-SNV spectra in the 200 to 300 nm range,
1267 [red circle] bovine brucellosis positive group, and [blue square]
1268 negative group.

1269 Finally, the PC3, PC4, and PC14 were submitted to machine learning
1270 algorithms (DA, SVM, and KNN) to build a prediction model for sample
1271 classification. Figure 12^a shows the maximum overall accuracy achieved
1272 by the algorithms in a LOOCV test by using different functions for
1273 classification. The maximum overall accuracy achieved by the predicting
1274 models was 92.5% for Linear SVM and Weighted KNN.



1275 Figure 12: (a) Overall accuracy obtained in the LOOCV tests (light
 1276 blue bars with right inclined line pattern) for Discriminant analysis
 1277 (DA), K-nearest neighbor (KNN), and Support vector machine
 1278 (SVM) algorithms by using PC3, PC4, and PC14 data in the 200
 1279 to 300 nm range. Confusion matrix for the performance of (b) SVM
 1280 algorithm with a linear function, and (c) KNN algorithm with
 1281 weighted function. The highest overall accuracy was 92.5%.

1282 The confusion matrix, Figure 12^{b,c} shows the sample classification
 1283 for Linear SVM and Weighted KNN. From the sample classification values
 1284 was possible to determine for Linear SVM a 94.3% sensitivity, and 90.6%
 1285 specificity, Figure 12^b, against 94.2% sensitivity, and specificity for
 1286 Weighted KNN, Figure 12^c. To compare, the relative sensitivity and
 1287 specificity parameters for the main tests recommended in the PNCBET
 1288 were respectively 99.6% and 83.9% (BAAT), 98.8% and 96.2% (2-ME /
 1289 SAT), 91.1 % and 100% (CFT) ¹³. Other confirmatory diagnostic tests for
 1290 brucellosis, recently introduced in the PNCBET, such as the FPA ¹², have
 1291 shown sensitivity and specificity around 94% and 95%, respectively ²⁹.

1292 The present study (UV-Vis + ML) was able to identify positive and negative
 1293 samples for antibodies against *B. abortus* in cattle with sensitivity and specificity
 1294 similar to that observed in tests currently used. Our best prediction model build
 1295 with the KNN algorithm and weighted function was able to correctly classify 49
 1296 samples from positive and negative groups, only 4 samples from each group were
 1297 misclassified according to the standard serological procedures recommended by

1298 PNCBET/Brazil ¹². These results are very promising for laboratory
1299 implementation as standard screening tests, take around only 5 minutes to
1300 provide the result, while the current standard diagnosis, with the screening and
1301 confirmatory tests, can take up to 48 hours. In addition, the need for sample
1302 processing, in the present methodology was greatly reduced, which enables a
1303 reduction in laboratory costs and an increase in sample processing capacity, in
1304 addition to the possibility of automation.

1305 **Conclusions**

1306 The methodology proposed in the present study (UV-Vis + ML) was
1307 able to identify positive and negative samples for antibodies against B.
1308 abortus in cattle with 92.5% overall accuracy, with sensitivity and specificity
1309 above 90%. The initial data analysis usually applied in photodiagnosis
1310 studies was not able to provide a promising clustering formation for future
1311 sample classification. The use of the Feature Selection Recursive Feature
1312 Elimination (RFE) algorithm, suggested only 3 main PCs as greatly
1313 responsible for group formation, eliminating the usual PCs with high data
1314 variance (PC1 and PC2). The score plot of RFE-PCs (PC3xPC4xPC14)
1315 demonstrated a clear tendency for clustering and group
1316 separation/classification, greatly improving the final sample classification.
1317 Finally, our method can provide a test result in an average time of 5
1318 minutes, while the standard diagnosis, with screening and confirmatory
1319 tests, can take up to 48 hours. In addition, the sample processing was
1320 greatly reduced, which enables a reduction in laboratory costs and an
1321 increase in sample processing capacity with great quality control.

1322 **Acknowledgments:**

1323 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
1324 code 001. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
1325 (CNPQ), code 403651/2020-5; 302525/2022-0; 440214/2021-1. Fundação
1326 de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado

1327 de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), code 007/2019; 360/2022.
1328 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/MEC – Brasil.

1329 **References**

- 1330 [1] LAGE, A. P., ROXO, E., MÜLLER, E., POESTER, F., CAVALLÉRO, J. C. M.,
1331 FERREIRA NETO, J. S., ... & GONÇALVES, V. S. P. Programa nacional de
1332 controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal
1333 (PNCEBT). Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento,
1334 2006.
- 1335 [2] CHATE, S. C.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G. M.;
1336 COSTA NETO, A. A.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V.
1337 C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. Situação epidemiológica
1338 da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. Arquivos
1339 Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61, supl. 1, p. 46-55.
1340 2009.
- 1341 [3] POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F. D.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S.
1342 P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; ... & FERREIRA NETO, J. S. Estudos de
1343 prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de
1344 Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. Arquivo
1345 Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61, p. 01-05, 2009.
- 1346 [4] POSSA, M. G; BERNARDI, F.; NETO, A. P.; CATTELAM, J.; JÚNIOR, I. A. N.;
1347 TRENKEL, C. K. G.; MOTA, M. F. Epidemiology and economic impact of
1348 brucellosis in the municipality of Santa Catarina State, Brazil. RSD
1349 [Internet]. 2021Mar.8 [cited 2023Feb.20];10(3):e12610313208. Available
1350 from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13208>
- 1351 [5] LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER,
1352 M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.;
1353 SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. Revista Brasileira de
1354 Reprodução animal, Belo Horizonte, v. 32, p. 202-212, 2008. Disponível
1355 em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB206%20Lage%20vr2%20pag202-212.pdf>>.
1356

- 1357 [6] OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. Terrestrial manual - access
1358 online. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
1359 Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May
1360 2009, vol 1, pt 2, chap. 2.4.7 Bovine tuberculosis. Disponível em:
1361 [http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.04.07_BOVINE_TB.](http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.04.07_BOVINE_TB.pdf)
1362 pdf.
- 1363 [7] MASCARENHAS, D. R. Validação da técnica de PCR em tempo real
1364 (qPCR) para detecção de Mycobacterium bovis e Brucella abortus em
1365 amostras de leite cru. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) -
1366 Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2017.
- 1367 [8] RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; ALMEIDA, C. A. S. Brucelose equina:
1368 aspectos da doença no Brasil. Revista Brasileira de Reprodução Animal.
1369 Belo Horizonte, v.32, n. 2, p.83-92, abr./jun. 2008. Disponível em:
1370 <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB155%20Ribeiro%20pag83-92.pdf>.
1371
- 1372 [9] XAVIER, M. N. Desenvolvimento de PCR espécie-específico para o
1373 diagnóstico da infecção por Brucella ovis e avaliação comparativa de
1374 métodos sorológicos. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
1375 Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo
1376 Horizonte. 2009.
- 1377 [10] PAULIN, L. M.; NETO, J. S. F. O Combate à Brucelose Bovina: situação
1378 brasileira. Jaboticabal. Funep, 2003. 154p. Disponível em:
1379 http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V69_2/paulin.pdf.
- 1380 [11] LAWINSKY, M. L. J. et al. Estado da arte da brucelose em humanos.
1381 Revista Pan-Amazônica de Saúde, v. 1, n. 4, p. 10-10, 2010.
- 1382 [12] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2017).
1383 Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da
1384 Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: IN MAPA/SDA/DSA, 10/2017.
- 1385 [13] MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; MATHIAS, L. A. Estudo comparativo entre os
1386 testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em
1387 bovinos. Arquivos do Instituto Biológico, v. 77, n. 1, p. 11-17, 2010
- 1388 [14] SAKUDO, A.; SUGANUMA, Y.; SAKIMA, R.; IKUTA, K. Diagnosis of HIV-
1389 1 infection by near-infrared spectroscopy: Analysis using molecular clones

- 1390 of various HIV-1 subtypes, *Clinica Chimica Acta*, v. 413, n. 3–4, p. 467-
1391 472, 2012.
- 1392 [15] AUNER, G. W.; KOYA, S. K.; HUANG, C.; BROADBENT, B.; TREXLER,
1393 M.; AUNER, Z.; BRUSATORI, M. A. Applications of Raman spectroscopy in
1394 cancer diagnosis. *Cancer Metastasis Rev* 37, 691–717 (2018).
- 1395 [16] BRITO, E.C.A; FRANÇA, T.; CANASSA, T.; WEBER, S.S.; PANIAGO,
1396 A.M.M.; CENA, C. Paracoccidioidomycosis screening diagnosis by FTIR
1397 spectroscopy and multivariate analysis, *Photodiagnosis and*
1398 *Photodynamic Therapy*, v.39, 102921, 2022.
- 1399 [17] LARIOS, G.; RIBEIRO, M.; ARRUDA, C.; OLIVEIRA, S. L.; CANASSA, T.;
1400 BAKER, M. J.; CENA, C. A new strategy for canine visceral leishmaniasis
1401 diagnosis based on FTIR spectroscopy and machine learning. *Journal of*
1402 *Biophotonics*, v. 14, n. 11, p. e202100141, 2021.
- 1403 [18] PEDREGOSA, F.; VAROQUAUX, G.; GRAMFORT, A.; MICHEL, V.;
1404 THIRION, B.; GRISEL, O.; DUCHESNAY, E. Scikit-learn: Machine learning
1405 in Python. *The Journal of Machine Learning Research*, v. 12, p. 2825-2830,
1406 2011.
- 1407 [19] RINNAN, Å.; BERG, F. V. D; ENGELSEN, S. B. Review of the most
1408 common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TrAC*
1409 *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009.
- 1410 [20] JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and
1411 recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A:*
1412 *Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 374, n. 2065, p.
1413 20150202, 2016.
- 1414 [21] LARIOS, G.; NICOLODELLI, G.; RIBEIRO, M.; CANASSA, T.; REIS, A.
1415 R.; OLIVEIRA, S.L.; CENA, C. Soybean seed vigor discrimination by using
1416 infrared spectroscopy and machine learning algorithms. *Anal Methods*.
1417 2020;12(35):4303–9
- 1418 [22] WU, W.; MALLETT, Y.; WALCZAK, B.; PENNINGCKX, W.; MASSART, D. L.;
1419 HEUERDING, S.; ERNI, F. Comparison of regularized discriminant analysis
1420 linear discriminant analysis and quadratic discriminant analysis applied to
1421 NIR data. *Analytica Chimica Acta*, v. 329, n. 3, p. 257-265, 1996.

- 1422 [23] MUCHERINO, A.; PAPAJORGJI, P. J.; PARDALOS, P. M. K-nearest
1423 neighbor classification. In: Data mining in agriculture. Springer, New York,
1424 NY, 2009. p. 83-106.
- 1425 [24] NOBLE, W. S. What is a support vector machine? Nature biotechnology,
1426 v. 24, n. 12, p. 1565-1567, 2006.
- 1427 [25] WONG, T.T. Performance evaluation of classification algorithms by k-fold
1428 and leave-one-out cross validation. Pattern Recognition, v. 48, n. 9, p.
1429 2839-2846, 2015.
- 1430 [26] THEERTHAGIRI, P. Predictive analysis of cardiovascular disease using
1431 gradient boosting-based learning and recursive feature elimination
1432 technique. Intelligent Systems with Applications, v. 16, p. 200121, 2022.
- 1433 [27] RIOS, T.G.; LARIOS, G.; MARANGONI, B.; OLIVEIRA, S. L.; CENA, C.;
1434 RAMOS, C. A. N. FTIR spectroscopy with machine learning: A new
1435 approach to animal DNA polymorphism screening. Spectrochim Acta A Mol
1436 Biomol Spectrosc. 2021.
- 1437 [28] FRANCA, T.; GONCALVES, D.; CENA, C. ATR-FTIR spectroscopy
1438 combined with machine learning for classification of PVA/PVP blends in
1439 low concentration. Vibrational Spectroscopy 120
- 1440 [29] KALLESHAMURTHY, T.; SHEKAR, R.; NIRANJANAMURTHY, H. H.;
1441 NATESAN, K.; SHOME, B. R.; BAMBAL, R. G.; ... & SHOME, R. Assessment
1442 of fluorescence polarization assay: a candid diagnostic tool in Brucella abortus
1443 strain 19 vaccinated areas. Microbiology and immunology, v. 62, n. 11, p. 694-
1444 701, 2018.

1445 5. CAPÍTULO II

1446 Evaluation of UV spectroscopy and machine learning for serological 1447 diagnosis of bovine tuberculosis

1448 Bruno Silva de Rezende¹, Thiago Franca², Cícero Cena², Carlos Alberto do
1449 Nascimento Ramos^{1*}

1450 [*carlos.nascimento@ufms.br](mailto:carlos.nascimento@ufms.br)

1451 1- UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de
1452 Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Campo Grande, MS, Brasil

1453 2- UFMS –Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Optics and
1454 Photonic Lab (SISFOTON-UFMS), Campo Grande, MS, Brasil

1455 Abstract

1456 Bovine tuberculosis is a disease of great importance for cattle, causing
1457 significant economic losses and risks to human health. The sanitary measures
1458 currently used in Brazil are limited to the diagnosis and sacrifice of infected
1459 animals. Furthermore, it is known that the diagnostic methodologies that are used
1460 may present some problems, either due to the high cost, delay in execution time
1461 or the presentation of false positives and false negatives. Thus, further studies
1462 are needed to develop more efficient diagnostic methodologies. In this context,
1463 as an alternative and promising measure for the diagnosis of diseases, optical
1464 spectroscopy associated with machine learning has shown great potential. In the
1465 present study, bovine blood serum was used for evaluation, through UV
1466 spectroscopy and machine learning algorithms, with the objective of making
1467 possible a standard for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* in cattle. As sources
1468 of antigens, recombinant proteins P27, MPB70 and MPB83 were used. Only with
1469 the P27 protein was it possible to observe the formation of well-defined clusters
1470 of positive and negative samples. Applying the KNNM machine learning
1471 methodology, it was possible to obtain an accuracy of 96.3%, with a sensitivity of
1472 100% and specificity of 92.6%. With the P27 protein as an antigen, the
1473 methodology evaluated in the present study proved to be promising as a

1474 diagnostic tool for bovine tuberculosis. But studies will be necessary to elucidate
1475 the poor performance of the MPB70 and MPB83 antigens.

1476 **Keywords:** photodiagnosis, diagnostic test, UV-vis spectroscopy, machine
1477 learning.

1478 **Introduction**

1479 Bovine tuberculosis, caused by *Mycobacterium bovis*, is responsible for
1480 great economic impact on livestock. In addition, *M. bovis* is an important zoonotic
1481 agent (DABORN et al., 1995). *M. bovis* is an alcohol-acid resistant bacilli, gram-
1482 positive, aerobic, non-capsulated, non-spore forming, non-flagellated, immobile
1483 and slow-growing (CORSI, 2021). Furthermore, this pathogen has a high
1484 concentration of lipids in its cell wall, thus contributing to resistance to most
1485 disinfectants, antimicrobials and the host's immune system (PALOMINO et al.,
1486 2007).

1487 The disease in cattle is characterized by lower milk production, drop in
1488 weight gain, cachexia, eventually death and condemnation of carcasses in
1489 slaughterhouses. In Brazil, the last major prevalence study carried out between
1490 1989 and 1998, found a prevalence of 1.3%, and reduction of the productive
1491 efficiency of the herds between 10% and 25% (BRASIL, 2006).

1492 Transmission occurs mainly through aerobic route, but hosts can also
1493 become infected by ingesting contaminated water and food such as grass and
1494 milk (DSAIP, 2021). According to Neill et al. (1994), even though it is of little
1495 importance, transplacental transmission can occur, in addition to infection
1496 through intercourse by contaminated semen.

1497 After infection, the microorganisms are captured by macrophages. The
1498 cellular immune response that is triggered, associated with neutrophils and
1499 macrophages, results in lesions with the appearance of a granuloma
1500 characterized by caseous necrosis and calcification in the center of the tubercle
1501 (JONES et al., 2000). When the infection occurs via the aerobic route, the lungs
1502 and regional lymph nodes are the main organs affected. However, when the
1503 animal ingests the bacillus, the mesenteric and pharyngeal lymph nodes can be

1504 affected, as well as in generalized infection all organs can be affected (SALAZAR,
1505 2005).

1506 The clinical signs of the disease will depend on the affected organs, but in
1507 general it can be said that bovine tuberculosis is a pathology of a chronic nature
1508 and that eventually it can progress to an acute condition. Thus, the clinical signs
1509 that may be present are hyperplasia of superficial and/or deep lymph nodes,
1510 endometritis, infertility, mastitis, dyspnea, cough, cachexia, fever, pneumonia,
1511 lymphadenopathy, diarrhea, among others. In addition, there are cases of
1512 congenital tuberculosis, which in turn can progress and cause death in newborn
1513 calves (DSAIP, 2021; CORSI, 2021).

1514 Therefore, due to the importance of the disease, with the objective of
1515 reducing the prevalence and incidence of brucellosis and tuberculosis, in 2001,
1516 the National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Animal
1517 Tuberculosis (PNCEBT) was instituted by the Ministry of Agriculture, Livestock
1518 and Food Supply (MAPA), of Brazil. And among the health measures employed
1519 by the program, the detection of infected animals and removing them from herds
1520 is critical (BRASIL, 2006). For this, the tuberculin test has been the main
1521 diagnostic tool used for in vivo diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil.

1522 Tuberculin tests consist of intradermal application of tuberculin (an extract
1523 of proteins from Mycobacterium) and subsequent evaluation of the type IV
1524 hypersensitivity response. Animals that are infected have an exacerbated
1525 response and have a significant increase in the skin fold at inoculation site
1526 (MONAGHAN et al., 1994). The variations of the tuberculin test currently in use
1527 in Brazil are: Single Intradermal Comparative Cervical Tuberculin (SICCT)Caudal
1528 Fold Tuberculin Test (CFTT)and Comparative Intradermal Tuberculin Test
1529 (CITT). The first two tests are used as screening tools, while the last one is a
1530 confirmatory test (BRASIL, 2006).

1531 Although tuberculin tests have several qualities, they still have
1532 disadvantages that require research to develop new diagnostic strategies. For
1533 example, the test requires handling each animal in the herd at two different times,
1534 which makes it difficult to apply in large herds (MENZIES, 1999; LIU et al., 2007).
1535 In addition, false-positive reactions may occur due to sensitization of the animals
1536 with environmental microbacteria, and false-negative reactions may occur due

1537 chronically infected animals already in a state of anergy (WOOD et al., 1991;
1538 MONAGHAN, 1994; BRASIL, 2004; AAGAARD et al., 2006). In this context,
1539 optical spectroscopy, associated with powerful data analysis tools such as
1540 machine learning, has emerged as alternative techniques that can be exploited
1541 as diagnostic tools (Sakudo et al., 2012; Auner et al., 2018; Brito et al. al., 2022).

1542 Therefore, in this study, UV spectroscopy associated with machine
1543 learning was evaluated for serological diagnosis of bovine tuberculosis, using
1544 proteins MPB70, MPB83 and P27 as antigens.

1545 **Materials and Methods**

1546 **Sample and antigens**

1547 In this study were used a total of 88 samples of bovine blood serum, 50%
1548 of them from infected animals, and another 50% from non-infected animals. The
1549 infectious status of the animals was based on the presence or absence of a
1550 positive result in the tuberculin test and identification of compatible lesions in
1551 carcasses at slaughter.

1552 The antigen sources were recombinant proteins P27, MPB70 and MPB 83
1553 (all with a concentration of 1 mg/ml), produced as described by SOUZA et al.
1554 (2012) and provided by Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

1555 **Reaction and acquisition of UV spectra**

1556 The best reaction conditions were evaluated with 14 positive and 14
1557 negative samples for *Mycobacterium bovis*. Initially, different antigen-serum
1558 proportions (1:1 – 1:16), for each antigen, was performed. After homogenization
1559 at room temperature, 2uL of each dilution was submitted to collection of UV
1560 spectrum, in NanoDrop One C (Thermo Fisher Scientific), between 200 and 300
1561 nm. The spectra of each serum/antigen combination were exported to a
1562 spreadsheet and submitted to multivariate analysis (Principal Component
1563 Analysis - PCA), with the aid of the software (PAST 4.03) using the scatter plot
1564 methodology. The best serum antigen proportion was defined as the one with the
1565 greatest distance between the clusters of the groups (positive and negative).

1566 Thus, better results were observed: P27 and MPB70 (1:2 antigen/serum
1567 proportion), and MPB83 antigen (1:16 antigen/serum proportion). With the best

1568 proportions for each antigen defined, the total number of samples were
1569 evaluated.

1570 **Data analysis and sample classification**

1571 Data analysis was implemented and performed in the Python
1572 programming language (version 3.9.12), using the Scikit-learn package (version
1573 1.1.2) (PEDREGOSA et al., 2011). First, each UV-Vis spectrum was subjected to
1574 pre-processing using Standard Normal Variation (SNV). This method allows
1575 removing the baseline variation and resizing the absorbances, preventing
1576 random experimental variations from interfering with the result (RINNAN et al.,
1577 2009). Then, the UV-SNV spectra, in the range of 200 nm to 300 nm, were
1578 subjected to principal component analysis (PCA) (JOLLIFFE et al., 2016), an
1579 unsupervised method that converts multiple variables into some principal
1580 components through dimension reduction, retaining most of the original variable
1581 information and expressing the data variance in a score chart. It also allows us to
1582 analyze the variation of the main data in the analyzed spectral range through the
1583 loading graph. The PCA is an important step to visualize the group classification
1584 trend, and the output data showed better performance to build a prediction model
1585 based on machine learning algorithms than on raw spectral data.

1586 Finally, a sample classification test was performed using PCA data
1587 subjected to machine learning (ML) algorithms. We use ML algorithms based on
1588 three different methods: (i) Discriminant Analysis (DA), which classifies the
1589 sample based on the distance between the sample data and the constructed
1590 contour using a linear or quadratic function to separate the classes (group) (Wu
1591 et al., 1996); (ii) k-Nearest Neighbor (KNN) uses the Euclidean distance between
1592 k (k= 1, 5, 10, 100) nearest neighbors to classify the sample (MUCHERINO et al.,
1593 2009); and (iii) Support Vector Machine (SVM), which organizes each sample
1594 class through the optimization of a hyperplane – the hyperplane can be linear or
1595 non-linear, being optimized to achieve high performance – between classes
1596 (NOBLE, 2006).

1597 Each ML algorithm can use a certain number of PCs (input data) to build
1598 the prediction model, but to avoid overfitting and underfitting it is mandatory to
1599 determine the ideal number of Principal Components (PCs). Here we use Feature

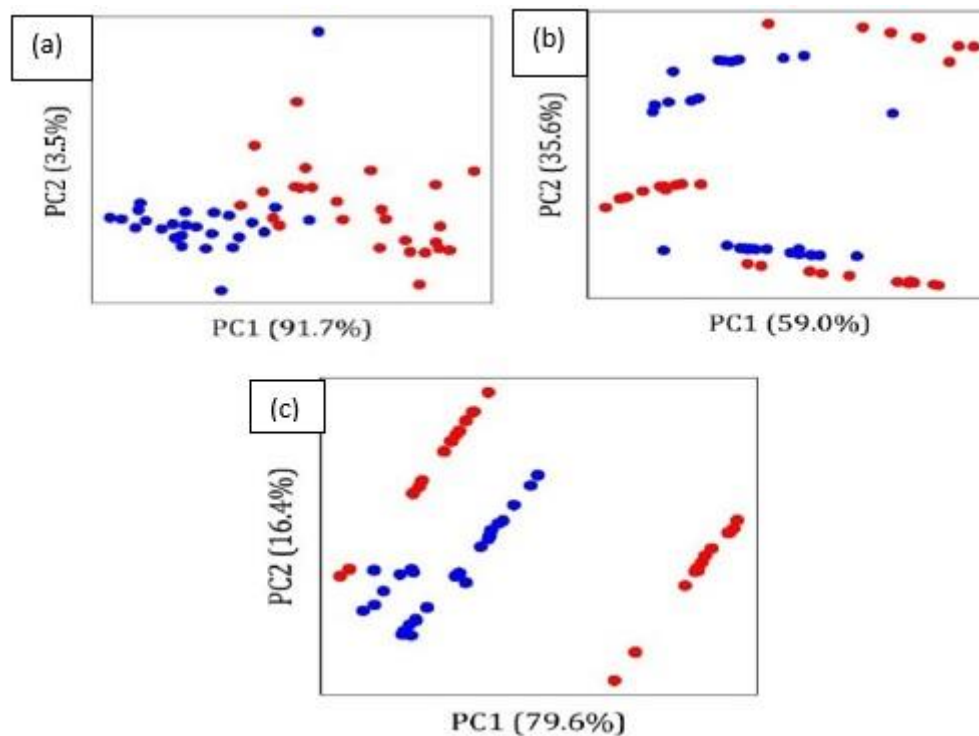
1600 Selection Recursive Feature Elimination (RFE), which can select the top PCs that
1601 contribute the most to achieving high accuracy and remove other PCs with the
1602 weakest contribution. The use or removal of a given PC was based on the
1603 accuracy obtained using Linear Discriminant Analysis (LDA) to classify samples
1604 in a Leave One Out Cross Validation Test (LOOCV).

1605 In LOOCV, a sample is taken from the dataset and the others are used to
1606 build the prediction (training) model. Then, the sample data draw is used to
1607 assess the quality of the model (test). The procedure is repeated until all sample
1608 data has been tested. The quality of the model is measured by precision,
1609 remaining the average percentage of correct answers in each test (WONG,
1610 2015).

1611 Then, a ranking of CPs is established and the CPs with the weakest
1612 contribution to accuracy are gradually removed from the dataset until the highest
1613 accuracy is obtained with the smallest number of CPs (THEERTHAGIRI, 2022).
1614 Finally, once the main PCs were determined and selected by the RFE, a new
1615 LOOCV test was performed using the DA, KNN and SVM algorithms.

1616 **Results and Discussion**

1617 Figure 13 shows the scatter plot based on principal component analysis
1618 results for the UV-SNV spectral data of the bovine tuberculosis positive and
1619 negative groups. Figure 13^a shows the result using P27 antigen, Figure 13^b to
1620 MPB70 and Figure 13^c to MPB83. Only with the P27 antigen was it possible to
1621 observe the formation of two clusters (positive and negative). For the MPB70 and
1622 MPB83 antigens, additional clusters were formed, containing samples previously
1623 classified as positive or negative.



1624 **Figure 13:** Scatter plot based on Principal component analysis for UV-
 1625 SNV spectra of bovine blood serum. Bovine tuberculosis positive
 1626 samples (red) and negative (blue). The (a) correspond to the P27
 1627 antigen, (b) correspond to the MPB70 antigen, and (c) to the MPB83
 1628 antigen.

1629 Proteins P27, MPB70 and MPB83 has been explored as an antigen for
 1630 serological diagnosis of bovine tuberculosis for more than a decade (Farias et al.,
 1631 2012; Souza et al., 2012). In evaluation of antigens (P27 and MPB70) in ELISA
 1632 tests, FARIAS et al. (2012) observed that the sensitivity and specificity of the tests
 1633 were respectively 98.1% and 91.9% for P27 and 88,7% and 94.6% for MPB70,
 1634 Already Souza et al. (2012), in a chimeric construction composed of MPB70,
 1635 MPB83 and ESAT6, also observed in the ELISA test, sensitivity of 83.2% and
 1636 specificity of 86.5%. In the present study, satisfactory results were observed only
 1637 using P27 as antigen (Figure 13^a).

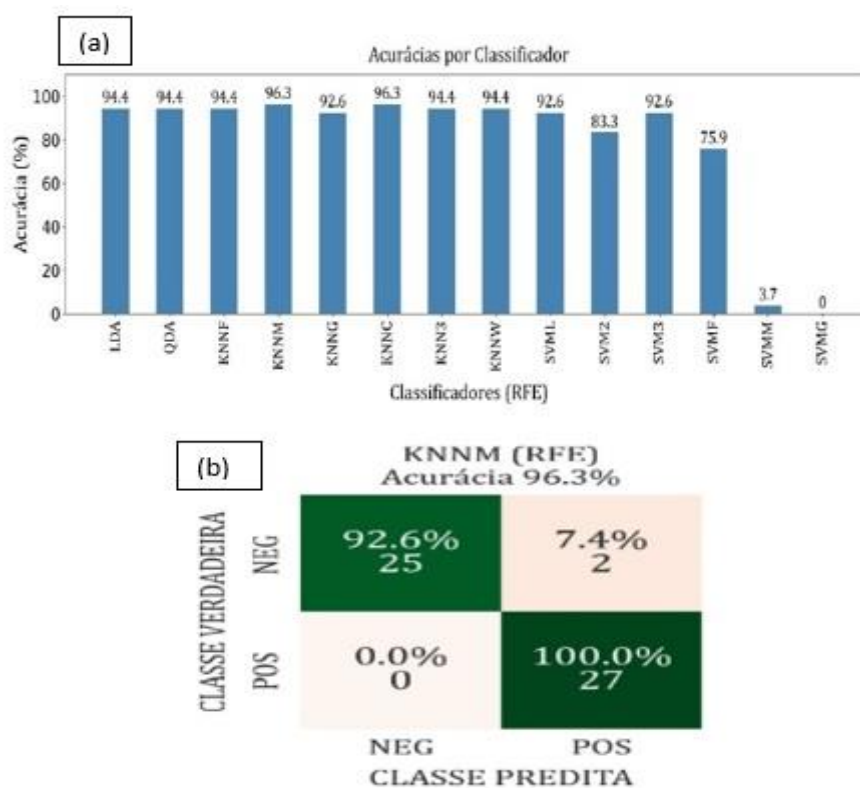
1638 In Figures 13^b and 13^c, it is possible to observe the formation of at least
 1639 three clusters, composed of mixture of positive and negative samples. Although
 1640 we still do not have a definitive answer to explain the results with the MPB70 and
 1641 MPB83 antigens, one hypothesis is that there were false-negative and false-

1642 positive results in the reference tests. And thus, the training of the machine
1643 learning algorithm was compromised, making it difficult to accurately classify the
1644 samples.

1645 The infectious status of the animals from which the serum samples were
1646 used in the present study was based on tuberculin tests and identification of
1647 lesions compatible with tuberculosis (LST). However, both methods have high
1648 rates of misdiagnosis. In a study conducted by Souza et al. (2012), 24 of the 32
1649 CITT-negative cattle from infected herds exhibited LST, from which *M. bovis* was
1650 isolated. On the other hand, in LST collected from 39 carcasses of cattle
1651 slaughtered in a region of Brazil, and subjected to specific microbiological
1652 isolation for *M. bovis*, only in 17.94% (7/39) was observed positive bacteriological
1653 diagnosis for *Mycobacterium* spp (Ferreira et al., 2021).

1654 The performance differences observed between P27 and the other
1655 antigens in the present study may also be related to the samples that were used
1656 in each evaluation. Although the total number of samples used in the study was
1657 88 (44 positive and 44 negative), the applied outliers identification methodology
1658 excluded different samples for each antigen from the analyses. And effectively,
1659 54 samples were used for P27 analysis, 60 for MPB70 and 56 for MPB83. This,
1660 associated to the fact that the kinetics of antibody production in animals infected
1661 with *M. bovis* varies according to the stage of infection and due the individual
1662 genetic of each animal, may have contributed to the large differences observed
1663 (Waters et al., 2017; Souza et al., 2019). In addition, kinetics of the antibody
1664 responses to different *M. bovis* antigens is variable upon infection. Anti-MPB83
1665 antibodies can be detected relatively early, typically around four weeks post-
1666 infection (Waters et al., 2006). Anti-ESAT6 antibodies can be detected 12 weeks
1667 after experimental infection (Lyashchenko et al., 1998). In contrast, antibodies for
1668 MBP70 usually develop 18 to 22 months after experimental infection (Harboe et
1669 al., 1990; Fifis et al., 1992). PC1 and PC2 were subjected to machine learning
1670 algorithms to build a prediction model for sample classification. For the P27
1671 antigen, data were submitted to algorithms (LDA, QDA, KNNF, KNNM, KNNG,
1672 KNNC, KNN3, KNNW, SVML, SVM2, SVM3, SVMF, SVMM, SVMG). Figure 14^a
1673 shows the maximum overall accuracy achieved by the algorithms in a LOOCV

1674 test using different classification functions. The maximum overall accuracy
 1675 achieved by the precision models was 96.3% for KNNM.



1676 **Figure 14:** (a) Overall accuracy obtained in LOOCV tests (light
 1677 blue bars) for the machine learning algorithms. (b) Confusion
 1678 matrix for the performance of the KNNM algorithm with an
 1679 accuracy of 96.3%.

1680 The confusion matrix, figure 14^b, shows the sample classification for
 1681 KNNM. From the sample classification values, it was possible to determine for
 1682 KNNM a sensitivity of 100.0% and a specificity of 92.6%. To compare, in a study
 1683 carried out by Jones et al. (1992), they performed the interferon gamma test using
 1684 bovine PPD and observed 81.8% sensitivity and 99.1% specificity. Furthermore,
 1685 this same author used bovine PPD in the tuberculin test and observed sensitivity
 1686 of 68.1% and a specificity of 96.7%. Furthermore, other methodologies such as
 1687 ELISA using chimera with hydrophilic fragments of MPB70, MPB83 and ESAT-6
 1688 from *M. bovis*, showed a result of sensitivity of 83.2% and specificity of 86.5%
 1689 (Souza et al., 2012).

1690 In this study (UV spectroscopy and machine learning), it was possible to
1691 identify positive and negative samples for *M. bovis* with sensitivity and specificity
1692 similar to those observed in the tests usually employed, using P27 antigen. In
1693 addition, it is worth mentioning that the results can be obtained in an average time
1694 of 3 minutes, which is faster than the tests currently employed. Another positive
1695 point was the lower complexity for processing samples, requiring less labor and
1696 possibility of automation.

1697 **Conclusion**

1698 The proposed methodology, using UV-Vis associated with machine
1699 learning, was able to identify and separate positive and negative samples for
1700 *Mycobacterium bovis* antibodies, using the P27 antigen, with a total accuracy of
1701 96.3%, with sensitivity and specificity above 90%. For the other antigens, it was
1702 not possible to observe separation of two groups according to the cluster results,
1703 and therefore it was not possible to clearly identify positives and negatives.
1704 Although the methodology has proven to be useful and practical, further studies
1705 and adjustments in machine learning algorithms and sample classification are still
1706 needed, so that we can better understand the poor performance of the MPB70
1707 and MBP83 antigens.

1708 **Acknowledgments:**

1709 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), code
1710 001. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ),
1711 code 403651/2020-5; 302525/2022-0; 440214/2021-1. Fundação de Apoio ao
1712 Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do
1713 Sul (FUNDECT), code 007/2019; 360/2022. Embrapa Gado de Corte.
1714 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/MEC – Brasil.

1715 **References**

1716 AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MEIKLE, V. et al. Optimizing antigen cocktails
1717 for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine
1718 tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity.
1719 **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.12, p.4326-4335, 2006.

1720 AUNER, G.W.; KOYA, S.K.; HUANG, C. et al. Applications of Raman
1721 spectroscopy in cancer diagnosis. **Cancer Metastasis Review**, v.37, p.691–717,
1722 2018.

1723 **Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Secretaria da
1724 Defesa Sanitária. Instrução normativa SDA nº 06, de 08 de janeiro de 2004,
1725 aprova o regulamento técnico do Programa nacional de controle e erradicação
1726 da brucelose e tuberculose animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Seção
1727 1, p. 6-10, 2004.

1728 **Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Programa
1729 Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal
1730 (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p.

1731 BRITO, E.C.A.; FRANÇA, T.; CANASSA, T. et al. Paracoccidiodomycosis
1732 screening diagnosis by FTIR spectroscopy and multivariate analysis.
1733 **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.39, p.102921, 2022.

1734 CORSI, C. **Tuberculose.** Disponível em:
1735 https://www.crmvsp.gov.br/arquivo_zoonoses/TUBERCULOSE.pdf. Acesso em:
1736 05 abr. 2021.

1737 DABORN, C.J.; O'REILLY, L.M. **The epidemiology of *Mycobacterium bovis***
1738 **infections in animals and man: a review.** *Tuber Lung Dis*, v.76, p.1-46, 1995.

1739 **DSAIP - Departamento de Saúde Animal e Insumos Pecuários.** Ficha
1740 Técnica. Disponível em:
1741 http://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/fichas_tecnicas/Ficha_T%C3%A9cnica_TUBERCULOSE_jan20.pdf. Acesso em: 04 de abril de 2021.

1743 FARIAS, T.A.; ARAÚJO, F.R., OSÓRIO, A.L.A.R. et al. ELISA based on
1744 recombinant MPB70 and P27 for detection of antibodies against *Mycobacterium*
1745 *bovis*. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, n.2, p.155-162, 2012.

1746 FERREIRA, F.F.; OLIVEIRA, M.L.M.; FILHO, F.A. et al. Isolation and genotyping
1747 of *Mycobacterium bovis* in suggestive lesions of tuberculosis in cattle slaughtered

- 1748 in the state of Ceará, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.40, p.863-870,
1749 2021.
- 1750 FIFIS, T.; COSTOPOULOS, C.; CORNER, L.A. et al. Serological reactivity to
1751 Mycobacterium bovis protein antigens in cattle. **Veterinary Microbiology**, v30,
1752 n.4, p.343–354, 1992.
- 1753 HARBOE, M.; WIKER, H.G.; DUNCAN, J.R. et al. Protein G-based enzyme-
1754 linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis.
1755 **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.5, p.913–921, 1990.
- 1756 JOLLIFFE, I.T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent
1757 developments. **Philosophical transactions of the royal society A:
1758 Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v.374, n.2065,
1759 p.20150202, 2016.
- 1760 JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6.ed. São Paulo:
1761 Manole, 2000. 1415p.
- 1762 JONES, S.L.; COX, J.C.; SHEPHERD, J.M. et al. Removal of false-positive
1763 reactions from plasma in an enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma.
1764 **Journal of Immunology Methods**, v.155, n.2, p.233-240, 1992.
- 1765 LIU, S.; GUO, S.; WANG, C. et al. A novel fusion protein-based indirect enzyme-
1766 linked immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis.
1767 **Tuberculosis**, v.87, n.3, p.212–217, 2007.
- 1768 LYASHCHENKO, K.P.; POLLOCK, J.M.; COLANGELI, R. et al. Diversity of
1769 antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis.
1770 **Infection and Immunity**, v66, n.11, p.5344–5449, 1998.
- 1771 MONAGHAN, ML, DOHERTY, M.L, JD COLLINS. et al. 1994. The tuberculin test.
1772 **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2, p.111-124, 1994.
- 1773 MENZIES, D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion,
1774 and reversion. **American journal of respiratory and critical care medicine**,
1775 v.159, n.1, p.15–21, 1999.

- 1776 MUCHERINO, A.; PAPAJORGJI, P.J.; PARDALOS, P.M. K-nearest neighbor
1777 classification. In: **Data mining in agriculture**. Springer: New York, p. 83-106,
1778 2009.
- 1779 NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.G. et al. Pathogenesis of
1780 Mycobacterium bovis infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n.1-2,
1781 p. 41-52, 1994.
- 1782 NOBLE, W.S. What is a support vector machine? **Nature biotechnology**, v.24,
1783 n.12, p. 1565-1567, 2006.
- 1784 PALOMINO, J.C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From basic**
1785 **science to patient care**. 1.ed. Bourcillier Kamps, 2007. 687p.
- 1786 PEDREGOSA, F.; VAROQUAUX, G.; GRAMFORT, A. et al., **Journal of**
1787 **Machine Learning Research**, v.12, p.2825-2830, 2011.
- 1788 RINNAN, Å.; BERG, F.V.D.; ENGELSEN, S.B. Review of the most common pre-
1789 processing techniques for near-infrared spectra. **TrAC Trends in Analytical**
1790 **Chemistry**, v.28, n.10, p.1201-1222, 2009.
- 1791 SAKUDO, A.; SUGANUMA, Y.; SAKIMA, R.; et al. Diagnosis of HIV-1
1792 infection by near-infrared spectroscopy: Analysis using molecular clones of
1793 various HIV-1 subtypes. **Clinica Chimica Acta**, v.413, n 3–4, p.467-472,
1794 2012.
- 1795 SALAZAR, F.H.P. **Ocorrência de tuberculose causada por Mycobacterium**
1796 **bovis em bovinos abatidos e frigoríficos no estado de Mato Grosso**. 2005.
1797 68 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade
1798 Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2005.
- 1799 SOUZA, I.I.F.; RODRIGUES, R.A.; JORGE, K.S.G. et al. ELISA using a
1800 recombinant chimera of ESAT-6/MPB70/MPB83 for Mycobacterium bovis
1801 diagnosis in naturally infected cattle. **Journal of Veterinary Medicine Science**,
1802 v.81, n.1, p.9-14, 2009.

- 1803 SOUZA, I.I.; MELO, E.S.; RAMOS, C.A.N. et al. Screening of recombinant
1804 proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine
1805 tuberculosis. **Springerplus**, v.1, n.1, p.1-6, 2012.
- 1806 THEERTHAGIRI, P. Predictive analysis of cardiovascular disease using gradient
1807 boosting-based learning and recursive feature elimination technique. **Intelligent**
1808 **Systems with Applications**, v. 16, p. 200121, 2022.
- 1809 WATERS, W.R.; PALMER, M.V.; THACKER, T.C. et al. Early antibody responses
1810 to experimental Mycobacterium bovis infection of cattle. **Clinical and Vaccine**
1811 **Immunology**, v.13, n.6, p.648–654, 2006.
- 1812 WATERS, W.R.; VORDERMEIER, H.M.; RHODES, S. et al. Potential for rapid
1813 antibody detection to identify tuberculous cattle with non-reactive tuberculin skin
1814 test results. **BMC Veterinary Research**, v.13, p.1-7, 2017.
- 1815 WONG, T.T. Performance evaluation of classification algorithms by k-fold and
1816 leave-one-out cross validation. **Pattern Recognition**, v. 48, n. 9, p. 2839-2846,
1817 2015.
- 1818 WOOD, P.R.; ORNER, L.A.; ROTHEL, J.S. et al. Field comparison of the
1819 interferon gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of
1820 bovine tuberculosis. **Australian Veterinary Journal**, v.68, n.9, p.286-290, 1991.
- 1821 WU, W.; MALLETT, Y.; WALCZAK, B. et al. Comparison of regularized
1822 discriminant analysis linear discriminant analysis and quadratic discriminant
1823 analysis applied to NIR data. **Analytica Chimica Acta**, v.329, n.3, p.257-265,
1824 1996.

1825 **6. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

1826 Neste estudo evidenciou-se o grande impacto que as doenças brucelose
1827 e tuberculose bovina ocasionam e, com isso, a técnica de espectroscopia
1828 associada ao aprendizado de máquina mostra-se útil e prática, colaborando para
1829 bons resultados para o diagnóstico de brucelose. Ademais, para *Brucella*
1830 *abortus*, a metodologia empregada foi capaz de identificar amostras positivas e
1831 negativas, com acurácia global de 92,5%, com sensibilidade e especificidade
1832 acima de 90%. Para *Mycobacterium bovis*, utilizando antígeno P27, foi possível
1833 identificar amostras positivas e negativas, com acurácia total de 96,3%, com
1834 sensibilidade e especificidade acima de 90%.

1835 Tal técnica foi capaz de fornecer resultados com tempo médio de 5
1836 minutos e exige menos processamento de amostras, o que possibilita a redução
1837 de custos laboratoriais e mais qualidade da amostragem. Contudo, esta
1838 ferramenta, embora possa ser automatizada e sem risco biológico, requer
1839 material complexo e pessoas com experiência em bioinformática.

1840 Diante do exposto, portanto, a espectroscopia associada ao aprendizado
1841 de máquina se mostra uma ferramenta promissora. É importante destacar que
1842 para diagnóstico de *B. abortus*, tal ferramenta apresentou bons resultados
1843 colaborando assim como uma alternativa de diagnóstico. Entretanto, para *M.*
1844 *bovis*, o mesmo não pode ser dito, haja vista que para apenas um antígeno
1845 (P27), foi obtido bons resultados. Assim, serão necessários mais ajustes e
1846 estudos.

1847 **7. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TÉCNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO**

1848 Os resultados alcançados com a presente pesquisa apresentam grande
1849 relevância social e econômica, pois, podem contribuir em um futuro próximo com
1850 o diagnóstico preciso e rápido das enfermidades brucelose e tuberculose. O
1851 diagnóstico mais preciso, por sua vez, permitirá um controle mais efetivo das
1852 enfermidades, reduzindo as barreiras econômicas importas aos produtos em
1853 decorrência da ocorrência das doenças no rebanho brasileiro.

1854 Ademais, o método desenvolvido e avaliado como ferramenta de
1855 diagnóstico, pode também ser explorado como ferramenta para diagnóstico de
1856 outras enfermidades animais. Inclusive com grande potencial para exploração

1857 industrial, por meio da produção de equipamentos portáteis para diagnóstico
1858 sorológico de doenças.

1859 Especificamente relacionado ao diagnóstico de tuberculose e brucelose,
1860 a metodologia aqui apresentada, com um pouco mais de ajustes, permitirá
1861 reduzir o tempo médio de diagnóstico de 72 horas para alguns minutos, e 48
1862 horas para alguns minutos, respectivamente.