

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA BRUCELOSE (*BRUCELLA ABORTUS*) EM PROPRIEDADES LEITEIRAS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, UTILIZANDO TESTE DE iELISA EM AMOSTRAS DE LEITE DE TANQUE DE EXPANSÃO.

Guilherme Borges Bond
Isabela Martinez Miranda
Mirelle Fabri Borges Albuquerque

Resumo

A Brucelose é uma zoonose de grande impacto econômico na pecuária leiteira. Atualmente, o PNCEBT permite a utilização de novos testes diagnósticos, complementares aos oficiais. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência da brucelose bovina em propriedades leiteiras do Paraná, utilizando o teste iELISA em amostras de leite de tanque de expansão em coletas consecutivas. Foram analisadas 888 amostras de tanque, sendo 13,41% reagentes para brucelose. Do total de 126 fazendas, 64,28% apresentaram resultados negativos em todas as coletas, 4,76% apresentaram resultados consistentemente positivos e 30,95% variaram entre resultados positivos e negativos. Os resultados revelam que a Brucelose ainda é presente em rebanhos leiteiros e apontam para a necessidade da inclusão de novos testes no PNCEBT. Estudos adicionais são necessários, utilizando testes individuais comprobatórios e analisando dados de escrituração sanitária e zootécnica para o refinamento da análise de eficácia do iELISA.

Palavras-chave: brucelose; tanque; ELISA; leite

Abstract

Brucellosis is a zoonosis of great economic impact in dairy farming. Currently, the Brazilian national control program allows for the use of new diagnostic tests, complementary to the official tests. The objective of this study was to determine the prevalence of bovine brucellosis in dairy farms in Paraná, using the iELISA test in consecutive bulk tank milk samples. There were 888 tank samples analyzed, 13.41% of which were positive for brucellosis. From a total of 126 farms, 64.95% had negative results in all collections, 4.76% had positive results and 30.95% varied between positive and negative results. These results reveal that Brucellosis is still present in dairy herds and suggest the need of adding new tests to the PNCEBT. Additional studies are necessary, considering official comprobatory tests and include health and production records to further refine the efficacy of the iELISA test.

Keywords: brucellosis, bulk tank, ELISA, milk

INTRODUÇÃO

A Brucelose é uma zoonose de grande importância em saúde pública, causada por bactérias do gênero *Brucella*, em especial pelas espécies *Brucella abortus* e *Brucella melitensis* nos ruminantes (MEGID et al., 2016). A infecção se dá por via oral através da ingestão, pelo bovino, de água e alimentos contaminados por resíduos de parto. O principal sítio de ação das bactérias é o

sistema reprodutivo, sendo o aborto o principal sinal clínico em animais portadores (CONSTABLE, 2020)

O impacto econômico da brucelose em rebanhos bovinos é bastante significativo, principalmente em países em desenvolvimento (MCDERMOTT et al., 2013). No Brasil, estima-se um prejuízo de R\$ 420,00 por vaca leiteira infectada acima de 24 meses, sendo o prejuízo total da brucelose bovina estimado em R\$ 892 milhões (SANTOS et al., 2013).

O potencial zoonótico da brucelose confere a esta doença uma importância *sui generis* no âmbito da saúde pública. Em virtude da ausência de uma vacina efetiva contra a brucelose em seres humanos, a doença deve ser controlada na população animal (SELEEM et al., 2010), que deve funcionar como uma barreira contra a disseminação da doença na população humana. Com este intuito, foi instituído, em 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) no Brasil (BRASIL, 2017a), visando a identificação e abate de animais positivos com o objetivo de erradicar a doença. Neste programa, os rebanhos podem obter status de propriedade livre de brucelose e tuberculose. O Paraná ocupa a terceira posição entre os estados com maior número de propriedades certificadas (BRASIL, 2020).

O rápido diagnóstico da brucelose é crucial para a identificação e eliminação de animais positivos. O PNCEBT preconiza os seguintes testes como padrão no diagnóstico sorológico da brucelose a nível nacional: Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), do Teste do 2 - Mercaptoetanol (2-ME), do Teste do Anel em Leite (TAL), do Teste de Polarização Fluorescente (FPA) e do Teste de Fixação do Complemento (CFT) (BRASIL, 2017b). Porém, a legislação permite que unidades federativas adotem testes diagnósticos complementares como forma adicional de controle da doença, com o intuito de permitir um controle mais rígido por parte dos Serviços Veterinários Estaduais.

O avanço das técnicas de diagnóstico médico veterinário permitiu o surgimento de novos testes para a detecção da *Brucella abortus*, incluindo o teste ELISA para a detecção de anticorpos anti-Brucella em amostras de leite. Este teste se adapta muito bem à realidade da pecuária leiteira brasileira, que

dispõe da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL) que dispõe de laboratórios credenciados com a capacidade de centralizar as análises e permitir estudos epidemiológicos mais amplos e potencializar o controle desta doença no território brasileiro.

O objetivo do presente estudo é determinar a prevalência da brucelose bovina em propriedades leiteiras do estado do Paraná, utilizando o teste ELISA em amostras de leite de tanque de expansão. Mais especificamente, o estudo visa: (1) Calcular a prevalência de brucelose em tanques de expansão de propriedades leiteiras das regiões oeste e centro-oriental do Paraná; (2) Avaliar a consistência dos resultados do teste de antígeno no leite nas propriedades por meio de coletas subsequentes.

MATERIAL E MÉTODO

As propriedades participantes no presente estudo foram recrutadas no ano de 2021, nas regiões oeste e centro-oriental do estado do Paraná, Brasil, a partir da lista de cliente de uma empresa local de laticínios. Os produtores eram contactados pela empresa e se voluntariaram a participar do estudo. Foram incluídas no estudo propriedades que atendiam aos seguintes critérios de inclusão: possuir um tanque de expansão na fazenda, participar de coletas de leite periódicas de acordo com as normas da IN 77/2018 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2018).

A coleta de amostras ocorreu entre os meses de julho e dezembro de 2021. As amostras eram coletadas em tanques de expansão por profissionais treinados pelo Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná - PARLPR da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), de acordo com as normas de coleta estabelecidas pelo programa (PARLPR, 2015). A frequência de coleta em cada propriedade variou de acordo com a disponibilidade dos técnicos habilitados a realizar o procedimento.

As amostras coletadas foram enviadas ao Laboratório de Sanidade Animal da APCBRH, onde passaram por teste ELISA pelo método de imunoensaio enzimático indireto (iELISA), utilizando o kit de reagentes químicos para teste de anticorpo contra *Brucella abortus* em leite IDEXX Brucellosis Milk

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA BRUCELOSE (BRUCELLA ABORTUS) EM PROPRIEDADES LEITEIRAS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, UTILIZANDO TESTE DE iELISA EM AMOSTRAS DE LEITE DE TANQUE DE EXPANSÃO

X2 (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, Estados Unidos da América).

Para a interpretação dos resultados, foi utilizado a referência para amostras de *pool* de até 125 vacas em incubação longa, que classifica como positivas as amostras com proporção de anticorpos maior que 60%.

Os dados de localização de propriedades e resultados de teste diagnóstico foram analisados por estatística descritiva, utilizando-se média e desvio padrão como medidas de tendência central pelo software R (R CORE TEAM, 2022).

RESULTADOS E DISCUSSÕES OU REVISÃO DE LITERATURA

Um total de 140 propriedades foram selecionadas a participar do estudo. Após a análise inicial dos dados, 14 fazendas foram excluídas por inconsistências nos registros, perfazendo-se um total de 126 fazendas analisadas. Destas, 40 (31,7%) fazendas estavam localizadas na região centro-oriental e 86 (68,3%) na região oeste do estado do Paraná, totalizando 18 municípios diferentes (tabela 1).

Tabela 1 Número de propriedades submetidas a testes diagnósticos de anticorpos contra *Brucella abortus* no estado do Paraná em 2021

REGIÃO	MUNICÍPIO	Nº DE PROPRIEDADES
CENTRO-ORIENTAL	Palmeira	13
	Ponta grossa	3
	Teixeira Soares	24
OESTE	Assis Chateaubriand	3
	Braganey	5
	Brasilândia do Sul	1
	Cascavel	3
	Corbélia	14
	Lindoeste	1
	Maripá	4
	Nova Santa Rosa	10
	Ouro Verde do Oeste	3
	Santa Tereza do Oeste	7
São Pedro do Iguaçu		3
Terra Roxa		1

Toledo	28
Tupãssi	1
Vera Cruz do Oeste	2

O número total de amostras coletadas de tanque de expansão foi 888, perfazendo uma média de 7,04 ($\pm 3,07$) amostras por propriedade. O intervalo médio de coletas por propriedade foi de 16,03 ($\pm 10,49$) dias.

Somente 119 amostras analisadas (13,41%) foram reagentes ao teste de ELISA. Estudos epidemiológicos utilizando amostras coletivas de propriedades leiteiras são escassos. Dois estudos semelhantes realizados no estado de Minas Gerais, relataram prevalências superiores: 23,2% utilizando o iELISA (OLIVEIRA, 2014) e 17,25% utilizando o TAL (RESENDE FILHO, 2014).

Na análise da consistência de resultados em coletas subsequentes nas mesmas propriedades, a maioria das fazendas (64,28%, n=81) apresentou resultados consistentemente negativos em todas as coletas. Propriedades com resultados consistentemente positivos representaram 4,76% (n=6) e o restante, 30,95% (n=39) variou entre resultados positivos e negativos em coletas subsequentes.

Os testes AAT e TAL são indicados no PNCEBT como testes de triagem diagnóstica, sendo o TAL o único teste oficial para diagnóstico em amostras coletivas pelo PNCEBT (BRASIL, 2017b). Porém, estes testes possuem uma série de limitações e necessitam de outros testes confirmatórios para o diagnóstico; condições como a mastite e a contaminação da amostra com colostro podem alterar a interpretação do TAL e o AAT é sujeito a reações falso negativo devido ao efeito prozona (NIELSEN, 2002).

O método iELISA, utilizado no presente estudo, já vem sendo utilizado como teste de triagem em diversos países, tendo sido prescrito pela OIE para testagem de leite para comércio internacional devido à sua alta sensibilidade (OIE, 2000). No estudo de VANZINI et al. (2001), o iELISA já se mostrou superior ao TAL, com maior sensibilidade (98,1% do iELISA versus 72,2% do TAL) e especificidade equivalente (88,1%), o que indicaria que este teste é promissor quando utilizado como teste de triagem. A alta sensibilidade do teste poderia explicar a variação de resultados em amostras subsequentes visto que o *pool* de

leite no tanque de expansão varia frequentemente com o descarte de animais, secagem de vacas e a entrada de novos animais em lactação na mesma propriedade.

Outro fator pertinente para explicar tal variação é a utilização de vacinas com cepas vivas atenuadas, como a B19, que podem induzir imunidade duradoura e interferir no resultado de testes diagnósticos (ALTON, 1988). Em estudo realizado por PACHECO et al. (2007) foi identificada a excreção da estirpe vacinal B19 na urina e no leite de fêmeas bovinas com até 9 anos de idade, mesmo tendo sido vacinadas na idade recomendada. KERBY et al. (1997) observaram baixa especificidade em testes de ELISA em rebanhos com animais vacinados, o que elevaria o número de falso-positivos.

CONCLUSÃO OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo epidemiológico a descrever a prevalência de anticorpos contra *Brucella abortus* através da aplicação do teste de iElisa em amostras de tanques de leite no Estado do Paraná.

O número de fazendas consistentemente positivas (4,76%), somadas às propriedades com resultados inconsistentes (30,95%) demandam atenção, pois mostram que a Brucelose ainda é uma doença presente e de grande importância no contexto da saúde única. Também apontam para a necessidade da constante revisão do PNCEBT, considerando a inclusão de novos testes que venham a aprimorar o diagnóstico da doença.

Novos estudos se fazem necessários para o aprimoramento da análise de prevalência, utilizando testes individuais comprobatórios como o 2 – Mercaptoetanol ou fixação de complemento nas mesmas propriedades. Ademais, estudos que elucidem as causas da variação de resultados em propriedades inconsistentes, analisando dados de escrituração sanitária e zootécnica são necessários para o refinamento da análise de eficácia do iELISA como um potencial teste diagnóstico a ser introduzido no PNCEBT.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa e ao Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná – PARLPR pelo compartilhamento dos dados do Laboratório de Sanidade Animal utilizados neste estudo.

REFERÊNCIAS

ALTON, G.G et al. **Techniques for the brucellosis laboratory.** Institut National de la recherche Agronomique (INRA), 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diagnóstico Situacional do PNCEBT. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 77, de 26 de novembro 2018. 2018

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 10, de 03 de março 2017. 2017a

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 34, de 08 de setembro 2017. 2017b

CONSTABLE, P. D. **Clínica Veterinária - Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos e Caprinos.** Rio fde Janeiro: Grupo GEN, 2020.

KERBY, P. J. et al. Field evaluation of an indirect ELISA for detection of brucellosis in lowland Bolivia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 29, n. 2, p. 65-72, 1997.

MCDERMOTT J, GRACE D, ZINSSTAG J. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. **Rev Sci Tech**; 32(1):249-61. 2013.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.** Rio de Janeiro: Roca, p. 799-821, 2016.

NIELSEN, Klaus. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 447-459, 2002.

OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines – Bovine Brucellosis. OIE, Paris, p. 328-345, 2000

OLIVEIRA, M.A. de. **Diagnosis of brucellosis in milk using collective milk samples.** 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014. DOI <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2014.529>

PACHECO, WA et al. Excretion of *Brucella abortus* vaccine B19 strain during a reproductive cycle in dairy cows. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 594-601, 2012.

PARLPR. Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná – **Manual de campo para coleta de amostras de leite cru refrigerado.** Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa. 2015

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2022

RESENDE FILHO, N.J. **Mapping Bovine Brucellosis with the Milk Ring Test (MRT) in farms in the municipalities of Unaí and Buritis, in the state of Minas Gerais, Brazil.** 2014. 45 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Animais Domésticos; Nutrição e Alimentação Animal; Pastagens e Forragicul) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

SANTOS, RL, MARTINS, TM, BORGES, AM, PAIXÃO, TA. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** 33(6). 2013.

SELEEM, MN, BOYLE, SM, SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, 140, (3–4). 2010.

VANZINI, V. R. et al. Comparison of an indirect ELISA with the Brucella milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. **Veterinary Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 55-60, 2001.