

## ACHADOS CLÍNICOS E HISTÓRICO DE DOENÇAS EM VACAS COM LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA.

VITOR HENRIQUE MANGRICH<sup>1,2\*</sup>, RAFAEL LUAN PERIN<sup>3</sup>, DANIELA IEZ WESSLING<sup>4</sup>, MAIARA GARCIA BLAGITZ<sup>2,5</sup>, VANESSA SILVA RETUCI<sup>2,6</sup>

### 1 Introdução

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma doença contagiosa causada pelo vírus da leucemia bovina (VLB), pertencente à família Retroviridae e ao gênero Deltaretrovirus. Em bovinos, pode se manifestar de diferentes formas clínicas, como assintomática, linfocitose persistente e formação de linfossarcomas (FRIE et al., 2014).

Aproximadamente 30% dos animais infectados desenvolvem linfocitose persistente, e de 1 a 5% linfossarcomas. Neste cenário, frequentemente, os animais acometidos são descartados precocemente, por apresentarem problemas reprodutivos, perda de peso, queda na produção leiteira e imunodepressão (BARROS FILHO et al., 2010).

O processo de disseminação do vírus entre os animais se dá via horizontal, por meio de exposição ao sangue ou leite. Na bovinocultura de leite a prevalência desta doença é maior, em decorrência do manejo intensivo e de falhas na desinfecção de instrumentos utilizados em práticas como inseminação artificial, vacinação e descorna (GILET et al., 2007).

Diante da preocupação voltada à presença de tal acometimento, da importância de constatação de casos positivos no rebanho e ações para implementar estratégias de controle, faz-se necessária a identificação dos animais soropositivos em tempo abreviado. Dentre os métodos de diagnóstico para detecção do vírus está a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), considerando que a maioria dos animais infectados exibem produção de anticorpos contra o vírus. Atualmente, também é muito utilizado o teste sorológico de imunoabsorção enzimática (ELISA) e em destaque a técnica promissora de qPCR (reação em cadeia da polimerase) que confere rapidez no resultado e diagnóstico (JULIARENA et al., 2007).

O qPCR baseia-se na detecção da presença do genoma do vírus e é uma ferramenta

---

1Graduando, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, contato: [henriquemangrich@yahoo.com.br](mailto:henriquemangrich@yahoo.com.br);

2Grupo de Pesquisa: Saúde, diagnóstico e bem-estar animal na Fronteira Sul (SADBEM);

<sup>3</sup>Mestre, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza;

<sup>4</sup>Graduanda, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza;

<sup>5</sup>Doutora, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza;

<sup>6</sup>Doutora, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza.

molecular de alta sensibilidade caracterizada por detectar a carga proviral (PVL) (PLUTA et al., 2024).

A LEB é uma doença sem tratamento e as estratégias adotadas para controle são voltadas ao diagnóstico, descarte de animais positivos, manejo sanitário adequado, seleção genética de animais resistentes (MARAWAN, 2021).

## 2 Objetivos:

### Objetivo geral:

Associar resultados de exame físico com o diagnóstico laboratorial para de leucose enzoótica bovina (LEB).

### Objetivos específicos:

Realizar exame físico em vacas leiteiras negativas e positivas (com baixa e alta carga proviral) para LEB; Comparar a frequência de doenças entre animais positivos e negativos para LEB; Realizar qPCR e correlacionar com os resultados de ELISA e IDGA.

## 3 Metodologia

As amostras submetidas às avaliações laboratoriais serão obtidas por meio de protocolo descrito no projeto guarda-chuva intitulado: “Diagnóstico do Bem-estar no âmbito da Saúde Animal – Parte 2”, cadastrado na plataforma institucional.

Considerando a coleta realizada na proposta anterior, e conforme a Lei 11794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca), e a Resolução Normativa - CEUA nº 55, de 5 de outubro de 2022, onde prevê a utilização de sobras de amostras já coletadas para outros projetos, reforçando o princípio dos 3 R's da minimização do uso de animais e melhor aproveitamento do material obtido em pesquisas, a metodologia laboratorial proposta neste estudo de testagem e diagnóstico, contará com doação de alíquotas das amostras coletadas.

As amostras serão colhidas em propriedades comerciais produtoras de leite, devidamente incluídas por termo de consentimento assinado pelos proprietários. Na sequência será realizada anamnese, exame físico geral e específico para identificar manifestações clínicas associadas à saúde (FEITOSA, 2020). Para realização do qPCR será utilizado o Laboratório de Biologia Molecular da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU/UFFS) - *Campus Realeza*.

A extração do DNA será realizada com o kit Biospin DNA/RNA (Biocell) de acordo

com as recomendações do fabricante, e após a extração, as amostras serão submetidas a qPCR, em termociclador PTC-200, MJ Research Chromo 4, com incubação inicial e ativação da polimerase a 95 °C (15 minutos), desnaturação a 94 °C (60 segundos), anelamento a 60 °C (60 segundos), considerando 50 ciclos. A reação molecular será conforme protocolo descrito na literatura (JULIARENA et al, 2007), e utilizando-se de oligonucleotídeos, Gene Left: 5'- CCT CAA TTC CCT TTA AAC TA -3'; Gene Right: 5'- GTA CCG GGA AGA CTG GAT TA -3' e Sonda/Probe: 5'- 6-Fam-GAA CGC CTC CAG GCC CTT CA-BHQ-1 -3'. Para os resultados obtidos, as amostras serão classificadas em baixa carga proviral (<1000 cópias por reação) e alta carga proviral (>1000 cópias por reação), conforme previamente publicado (Farias et al., 2016; Ladera Gómez et al., 2024).

Os dados serão tabulados e as médias dos dados não paramétricos serão comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, e dados quantitativos, analisados para normalidade pelo teste de Ryan-Joiner no Minitab® Statistical Software versão 22.1, e se possuírem distribuição normal, analisados pela Análise de Variância Unifatorial e pós-teste de Tukey. Em caso de não normalidade, os dados serão analisados de forma não paramétrica. Para todos os testes, significância  $p < 0,05$ .

#### 4 Resultados e Discussão

O estudo em pauta é subprojeto vinculado ao projeto guarda-chuva “Diagnóstico do Bem-estar no âmbito da Saúde Animal – Parte 2”, ao qual está associado o subprojeto “Atividade fagocítica de neutrófilos em bovinos com diferentes cargas proviral do vírus da leucemia bovina”, proposta responsável pela coleta e doação das amostras.

Inicialmente, o subprojeto associado foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), em 01 de outubro de 2024, registro nº 2324011024 (ID 000869), sob a responsabilidade de professora membro do grupo de pesquisa, com metodologia prevendo a coleta e disponibilização das amostras. Porém, após submissão ao comitê de ética, adequações foram solicitadas, e mesmo sanando as pendências solicitadas, sequencialmente surgiram outras, o que resultou no impedimento da execução dos trabalhos e atrasos na obtenção de resultados.

Neste cenário, para cumprir as determinações do comitê de ética e a legislação, os membros participantes nos subprojetos associados dedicaram-se à capacitação em “Princípios éticos e manejo de animais em pesquisa”, exigência estabelecida pelo Conselho Nacional de

Controle da Experimentação Animal (CONCEA). A partir da apresentação da certificação de conclusão do curso ao CEUA, em acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), a execução do subprojeto foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul (CEUA/UFFS), em na reunião ocorrida no 25/06/2025, com parecer publicizado em 10 de julho de 2025.

Portanto, considerando os impedimentos ocorridos, e a recente aprovação do CEUA para execução da pesquisa, registra-se o encaminhamento das ações, e de fato, o início da execução metodológica. Ressalta-se que as ações independentes da aprovação em CEUA foram executadas, dentre as quais, revisão bibliográfica, definição dos oligonucleotídeos, orçamento e aquisição de consumíveis, articulações para uso do espaço laboratorial, levantamento de propriedades da região, possíveis participantes e com probabilidade de incidência de casos de LEB.

## 5 Conclusão

As atividades que não dependiam de aprovação em comitê de ética, como revisão bibliográfica, orçamento, aquisição de consumíveis, levantamento de propriedades, reuniões da equipe, capacitação em “Princípios éticos e manejo de animais em pesquisa” (estabelecida pelo CONCEA), foram realizadas. Atualmente, de posse do parecer emitido pelo CEUA aprovando a execução dos trabalhos pela equipe de pesquisa para fins científico ou ensino, e em acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), as ações propostas estão em execução pelo acadêmico de iniciação científica, reconduzido para mais um ano de trabalho e em acordo com o prazo estabelecido no subprojeto PES-2024-0459, Edital nº 154/GR/UFFS/2024, que concede fomento à pesquisa científica e está vinculado ao subprojeto em pauta.

## Referências Bibliográficas

BARROS FILHO, I. R. de et al. Soroprevalência de anticorpos para o vírus da leucose enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 511–515, 2010.

FARIAS, M. V. N. et al. Toll-like receptors, IFN- and IL-12 expression in bovine leukemia virus-infected animals with low or high proviral load. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 107, p. 190–195, 2016.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. 4. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2020.

FRIE, M. C.; COUSSENS, P. M. Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 163, n. 3–4, p. 103–114, 2014.

GILLET, N. et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 1–13, 2007.

JULIARENA, M. A.; GUTIÉRREZ, S. E.; CERIANI, M. C. Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 68, n. 11, p. 1220–1225, nov. 2007.

LADERA GÓMEZ, M. E. et al. Altered apoptosis and proliferation in milk cells and PBMC from BLV-infected bovines with different proviral loads: Possible role of the BCL-2 family proteins, TNF-alpha, and receptors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 268, 2024.

MARAWAN, M. A. et al. Bovine leukemia virus: Current epidemiological circumstances and future prospects. **Viruses**, Basel, v. 13, n. 11, p. 2167, 2021.

PLUTA, A. et al. Inter-laboratory comparison of eleven quantitative or digital PCR assays for detection of proviral bovine leukemia virus in blood samples. **BMC Veterinary Research**, Londres, v. 20, n. 1, p. 381, 2024.

**Palavras-chave:** Comorbidades; Diagnóstico molecular; Sinais clínicos.

**Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2024-0462**

**Financiamento**

