

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

**VITOR HENRIQUE MANGRICH^{1,2*}, MARIA EDUARDA DE PAULA HOPPEN³,
GIOVANA ARISSA KANEHIRA³, DANIEL SCAPIN⁴, FELIPE BEIJAMINI⁵,
MAIARA GARCIA BLAGITZ^{2,5}, VANESSA SILVA RETUCI^{2,6}**

1 Introdução

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma doença contagiosa causada pelo vírus da leucemia bovina (VLB), da família Retroviridae e do gênero Deltaretrovirus. Em bovinos, se manifesta em diferentes formas clínicas, podendo ser assintomática, por linfocitose persistente e por linfossarcomas (FRIE et al., 2014). Dos animais infectados, aproximadamente 30% desenvolvem linfocitose persistente e de 1 a 5% dos animais progridem para a forma clínica, formação de linfossarcomas (BARROS FILHO et al., 2010).

Por se tratar de uma doença sem tratamento, as estratégias de controle se baseiam no diagnóstico, manejo sanitário mais rigoroso, seleção genética de animais resistentes e descarte criterioso de animais (MARAWAN, 2021). A identificação dos animais soropositivos, adoção de estratégias de controle e o diagnóstico precoce dos animais acometidos é de grande importância no controle populacional.

Assim, métodos para detecção do vírus são promissores, dentre os quais, a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), que se baseiam na detecção de anticorpos antivirais. E, recentemente, a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), uma ferramenta molecular de alta sensibilidade caracterizada por detectar a carga proviral (PVL) (PLUTA et al., 2024), e que se destaca como um método diagnóstico preciso, rápido e promissor (JULIARENA et al., 2007).

2 Objetivos:

Objetivo geral:

Realizar testes laboratoriais de ELISA e qPCR em amostras de sangue de novilhas da UFFS visando diagnóstico de leucose enzoótica bovina (LEB).

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

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

3 Graduanda, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza;

4 Mestre, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza;

5 Doutor(a), Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza;

6 Doutora, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza (orientadora).

Objetivos específicos:

Extrair o material genético de amostras de sangue; Realizar os testes de diagnóstico ELISA e qPCR, e correlacionar os resultados obtidos.

3 Metodologia

A execução do estudo foi devidamente aprovada pelo CEUA sob protocolo nº 3145230226. Por não prever coleta de amostras, alíquotas de sangue foram obtidas e doadas por subprojeto vinculado ao mesmo guarda-chuva. Inicialmente, as coletas ocorreram em diferentes propriedades comerciais leiteiras do município de Realeza - Paraná, com a formalização da ação via termo de consentimento. O manejo dos animais seguiu os protocolos de bem-estar animal.

Para as coletas realizou-se a assepsia do local com algodão e álcool 70%, seguida de venopunção da veia coccígea, utilizando agulhas e tubos estéreis com EDTA, sem anticoagulante e a vácuo. As amostras foram processadas no laboratório multiusuário da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU), e as alíquotas de cada uma acondicionadas em ultrafreezer para realização dos testes laboratoriais.

Inicialmente, o estudo previa a avaliação de 200 amostras coletadas em propriedades comerciais, entretanto, ao iniciar a rotina laboratorial, problema no equipamento Bioeasy Bio-2900 Vet inviabilizou a realização do hemograma, e por não haver possibilidade de conserto em tempo hábil, adequações foram necessárias, dentre as quais a redução no número de indivíduos, considerando a testagem nas novilhas da instituição.

Assim, os testes de diagnósticos foram considerados para oito novilhas mantidas na UFFS-Campus Realeza, as quais apresentavam as análises clínicas consolidadas. A testagem pelo método diagnóstico ELISA foi realizada pelo grupo de pesquisa utilizando protocolo estabelecido em subprojeto associado, com o Kit “Enzootic Bovine Leukosis Virus (BLV) gp51 Antibody Test” da Idexx, no equipamento Thermo Scientific Multiskan Sky e Thermo Scientific Wellwash Versa. Posteriormente, os resultados obtidos foram correlacionados com os oriundos da técnica qPCR.

Considerando os mesmos animais, as alíquotas das amostras foram processadas para realização da qPCR. A extração do material genético das amostras foi obtida no laboratório de biologia molecular do SUHVU utilizando o kit Biospin Virus DNA/RNA Extraction Kit (Bioflux). O equipamento adotado para as reações moleculares foi o termociclador PTC-200, MJ Research Chromo 4, seguindo o protocolo: incubação inicial e ativação da polimerase à 95

°C (15 minutos), desnaturação à 94 °C (60 segundos), anelamento à 60 °C (60 segundos), por 50 ciclos.

Para as reações moleculares foram utilizados oligonucleotídeos para diagnóstico de LEB, conforme sequência BLV.LTR.114 descrita por FONSECA JÚNIOR (2021).

Os resultados foram analisados considerando os pontos de corte padronizados pelos testes utilizados.

4 Resultados e Discussão

Avárias no equipamento para realização de hemograma inviabilizou a análise clínica para o número de amostras previsto para compor a população neste estudo. Assim, a realização da pesquisa considerou algumas adequações.

No rearranjo considerou-se utilizar amostras de sangue de oito novilhas mantidas UFFS - Campus Realeza, realizando testes laboratoriais qPCR e ELISA. Importante destacar que os métodos utilizados para o diagnóstico apresentam diferentes mecanismos de detecção, sendo o ELISA para presença de anticorpos e a qPCR para presença de partículas virais.

No teste de ELISA os dados obtidos para cada amostra foram analisados considerando a equação $A/N(\%) = 100 \times [amostra A(450)/CN\bar{x}]$, onde A/N (%): Porcentagem da relação Amostra/Negativo, A(450): absorbância da amostra e $CN\bar{x}$: média aritmética do controle negativo. O ponto de corte no diagnóstico considera valores menores que 40,0, amostra positiva, e igual ou maiores, para amostra negativa. Das amostras analisadas, a novilha número 9 apresentou valor abaixo do indicado, isto é, 6,30, e diagnóstico LEB positivo. Os valores obtidos para as demais foram superiores, indicando diagnóstico negativo (tabela 1).

Tabela 1. Valores obtidos nas análises pelo teste de ELISA

Método de testagem	Novilhas*								Controles	
	1	2	4	5	6	7	8	9	+	-
ELISA	47,00	91,95	91,88	90,86	91,87	91,66	86,46	6,30	7,216 6,907	96,80 103,2

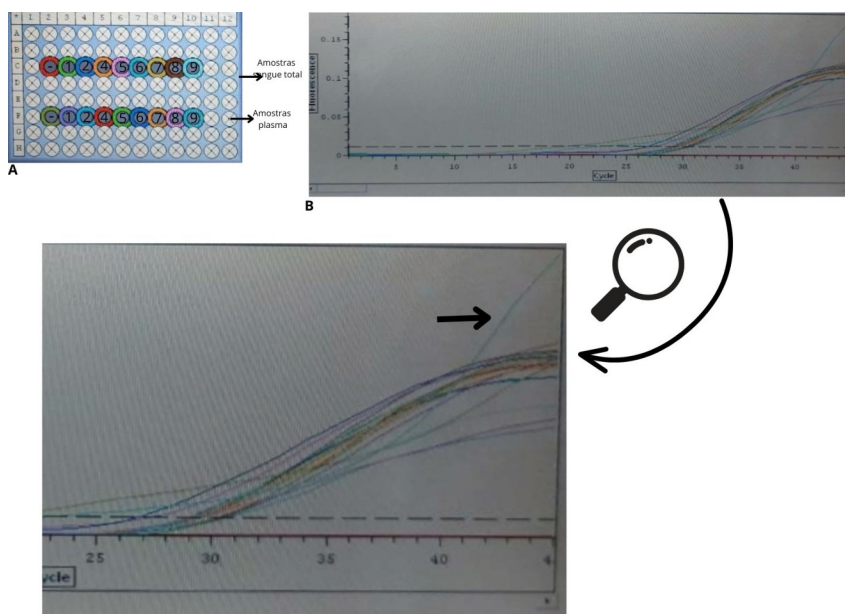
* os valores apresentados resultam da equação $A/N(\%) = 100 \times [amostra A(450)/CN\bar{x}]$, e valores menores que 40,0 indicam amostra positiva e igual ou maiores, amostra negativa.

Para o método de testagem qPCR, a figura 1A apresenta o croqui de aplicação das amostras na placa inserida no termociclador, sendo na sequência superior o material obtido das

amostras de sangue total e na sequência inferior, após centrifugação, material obtido a partir do plasma e fração leucoplaquetária. Na distribuição das amostras, da esquerda para a direita, a primeira inclusão para o controle negativo, seguido das amostras 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. No estudo não foi considerada a novilha 3, ausente no momento das coletas, em virtude de óbito.

No gráfico da figura 1B, observa-se curvas exponenciais da resposta do controle endógeno (oligonucleotídeo marcador de β -actina) em todas as amostras, exceto para o controle negativo, indicando que o processo de extração do material genético foi bem sucedido e que há presença de material genético bovino. Quanto ao oligonucleotídeo utilizado para diagnóstico de LEB, a amplificação foi constatada apenas na amostra 9, reproduzindo o mesmo indicativo obtido pelo teste de ELISA.

Figura 1. Teste qPCR utilizando material genético extraído de sangue de novilhas da UFFS - Campus Realeza. A. distribuição das amostras na placa para termociclagem; B - gráfico de amplificação das sequências de DNA endógeno e do DNA da sequência viral.



Os métodos de testagem utilizados replicaram o diagnóstico e corroboram com dados obtidos por Polat (2017). Apesar das técnicas responderem, é importante destacar que a reprodução dos resultados deve ser avaliada considerando o momento da coleta, o estágio da infecção e características inerentes de cada método diagnóstico. Segundo PLUTA et al. (2024) o aprimoramento de métodos para rotinas de diagnóstico é necessário, reduzindo discrepâncias em amostras com baixa carga viral, e otimizando a detecção de animais em fases iniciais ou assintomáticas da infecção.

5 Conclusão

Os dois métodos no diagnóstico de LEB mostraram-se promissores na investigação das oito novilhas da UFFS, corroborando o resultado positivo apenas para o animal 9.

Quanto à aplicabilidade do teste qPCR em rotinas de diagnóstico, novas investigações serão necessárias para validação rigorosa do método molecular e para garantir que o diagnóstico da leucose enzoótica bovina seja confiável e reprodutível.

Assim, propõe-se ampliar o número de animais, realizar coletas em diferentes estágios e executar o refinamento dos protocolos.

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.

FONSECA JÚNIOR, Antônio Augusto, et al. Evaluation of three different genomic regions for detection of bovine leukemia virus by real-time PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 52, n. 4, p. 2483–2488, 2021. DOI: 10.1007/s42770-021-00613-0.

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.

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.

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.

POLAT, Meripet; TAKESHIMA, Shin-nosuke; AIDA, Yoko. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology Journal**, London, v. 14, art. 209, 2017.

Palavras-chave: diagnóstico molecular, ELISA, qPCR.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2025-0244

Financiamento

