

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FELIPE EDUARDO FIORIN

**FATORES DE RISCO, SOROPREVALÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DO LOCUS BOLA-
DRB3 COM A RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM
BOVINOS LEITEIROS**

LAGES

2024

FELIPE EDUARDO FIORIN

**FATORES DE RISCO, SOROPREVALÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DO LOCUS BOLA-
DRB3 COM A RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM
BOVINOS LEITEIROS**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Joandes Henrique Fontequê.

Co-orientador: Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa

LAGES

2024

INSERIR FICHA CATALOGRÁFICA

FELIPE EDUARDO FIORIN

**FATORES DE RISCO, SOROPREVALÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DO LOCUS BOLA-
DRB3 COM A RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM
BOVINOS LEITEIROS**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

BANCA EXAMINADORA

Membros:

Prof. Dr. Joandes Henrique Fontequê
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Dr. Guillermo Giovambattista
Universidad Nacional de La Plata/Argentina

Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti
Universidade Federal de Goiás/Goiânia-GO

Prof. Dr. Andre Thaler Neto
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Dra. Mariana da Silva Casa
Médica Veterinária Autônoma

Lages, 20 de dezembro de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por todas as bênçãos concedidas a mim, por me proteger e guiar.

Agradeço imensamente a minha família, meu pai Gilmar Fiorin e minha mãe Silvia Aline Kasteller Fiorin que sempre foram meus alicerces e minha fonte de inspiração para sempre ir em busca de meus objetivos; amo vocês e é por vocês. Meu irmão João Pedro Fiorin e cunhada Bruna Ferranti que nunca deixaram de me apoiar e incentivar. Ao meu finado avô Matheus Fiorin que sem dúvida, foi a pessoa que desde criança, me incentivou à vida no campo, criando amor pelos animais, me fazendo mais tarde, optar pela profissão. À minha avó Almerinda Nodari Fiorin, por ter sido minha segunda mãe, por toda a preocupação e acolhimento durante minha trajetória profissional. Hoje infelizmente não consegue ver aonde cheguei, mas saiba que está em meu coração. Obrigado por serem meu porto seguro.

A toda minha família, em especial aos meus tios Norival Fiorin e Ricardo Kerschbaumer e minhas tias Mirna Fiorin e Ivane Fiorin, os quais sempre estiveram presentes em minha vida, nunca medindo esforços para estarem a par de todo meu percurso, sempre me incentivando, me motivando. Meu muito obrigado!

Ao professor e amigo Dr. Joandes Henrique Fontequê, pelas oportunidades durante a pós-graduação. Agradeço a confiança depositada em mim, obrigado pelas orientações, pelos ensinamentos, pelas cobranças, por entender as minhas limitações em função de não conseguir ter dedicação exclusiva. Sem dúvida, mudou meu jeito de pensar, dentro e fora do meio acadêmico. Meu muito obrigado.

Ao professor Dr. Ubirajara da Costa Maciel por aceitar ser meu coorientador. Estendo meu agradecimento a toda sua equipe.

Aos professores que compõem o grupo, Prof. Dr. Luiz Claudio Miletti, Profa. Dra. Mere Erika Saito, Profa. Dra. Sandra Maria Ferraz e Prof. Dr. Guillermo Giovambattista da Universidade de La Plata. Este trabalho só foi possível pela ajuda de todos vocês.

À toda equipe do Laboratório de Patologia Clínica do CAV – UDESC e do Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores do CAV – UDESC.

Aos colegas de pesquisa, M.V. Jucemara Madel de Medeiros, M.V. Leonardo Deschamps, Msc. Anna Carolina Pontel de Almeida, Msc. Anthony Broering Ferreira, Dra. Graziela Vieira Fontequê e Dra. Gabriella Bassi das Neves por terem paciência e dedicação nos ensinamentos referentes às análises laboratoriais e moleculares, que diretamente, atuaram

e auxiliaram no processamento das amostras, e tornaram possível a realização deste trabalho. Meu muito obrigado.

Agradeço também a graduanda, e integrante do grupo de pesquisa Luísa Fontes Giachini, bolsista de iniciação científica, que diretamente esteve envolvida no desenvolver deste projeto, sempre muito dedicada e paciente.

Agradeço aos colegas e amigos que fizeram parte deste percurso. Ao colega M.V. Mestrando Gianluca Simão Nadal Ribeiro, Profa. Dra.. Ronise Tochetto, Prof. Dr. Felipe Comassetto e Dra. Mariana da Silva Casa.

Um agradecimento especial aos professores da graduação e pós-graduação que se tornaram amigos, e foram importantes durante esta caminhada, orientando, dando conselhos e formando laços de apoio. Em especial ao Prof. Dr. Celso Pilati, Profa. Dra. Verônica Flores da Cunha Scheeren e Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira.

Ao CAV/UDESC por ser minha segunda casa, desde a graduação, por proporcionar formação de qualidade. Orgulho em fazer parte dessa instituição. E a todos seus funcionários.

A todos os proprietários que disponibilizaram suas propriedades e seus animais, e permitiram que eu realizasse meu projeto, muito obrigado.

Agradecer também ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), pela oportunidade de estar seguindo a carreira acadêmica, na instituição que me formou. Sou muito grato.

A todos os animais, em especial aos bovinos e equinos, por despertar em mim a sede de conhecimento e amor pela minha profissão, que me faz ter cada dia mais certeza do caminho escolhido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) - CNPq/MCTI/FNDCT N°18/2021 – Range A – Grupos Emergentes – 404569/2021-8 – Termo de outorga: 404569/2021-8; pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

A Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC) pelo fornecimento dos dados referentes as propriedades leiteiras no estado de Santa Catarina (Termo de Cooperação Técnica N° 7921).

Obrigado!

RESUMO

FIORIN, F.E. 2024, p92. **Fatores de risco, soroprevalência e associação do locus BoLA-DRB3 com a resistência ao vírus da leucose enzoótica em bovinos leiteiros.** Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2024.

A leucose enzoótica bovina é uma doença infectocontagiosa de distribuição mundial, que repercute em grandes perdas econômicas em rebanhos bovinos devido à perda de produtividade, custos com médicos veterinários, morte de animais, e principalmente pelo descarte involuntário precoce. É uma doença que não possui tratamento, tampouco controle vacinal, logo, uma das possibilidades para realizar controle e prevenção é a seleção de animais resistentes ao BLV. O objetivo foi determinar a prevalência e os fatores de risco da leucose enzoótica bovina da raça holandesa no estado de Santa Catarina, e a possível resistência/susceptibilidade associando-se o locus BoLA-DRB3. Foram utilizados 447 bovinos da raça holandesa, fêmeas adultas, oriundas de 27 propriedades, abrangendo as seis mesorregiões do estado de Santa Catarina. A prevalência e soroprevalência foram determinadas pelas técnicas da PCR e ELISA, e realizados o exame físico, leucograma e questionário epidemiológico. Para a determinação da variabilidade do gene BoLA-DRB3, alelos de 181 animais foram amplificados utilizando a técnica de PCRSBT. Os fragmentos foram sequenciados e os dados brutos das sequências foram analisados por meio do software Assign 400ATF ver. 1.0.2.41 software. A análise estatística dos dados foi realizada pela análise de variância (ANOVA), para as variáveis clínicas e hematológicas. A análise univariada realizou-se para verificar a associação entre o status do rebanho para a LEB e os fatores de risco, utilizando o teste de qui-quadrado, seguido por análise de regressão logística ($P < 0,05$). Para as análises de medidas de variabilidade genética foi utilizado o software GENEPOP. A prevalência leucose enzoótica bovina foi de 52% (232/447) pelo ELISA e 29% (130/447) pela PCR. Obteve-se respectivamente pelo teste de ELISA e PCR, 42% (133/316) e 28% (96/316) na região Oeste; 82% (37/45) e 16% (12/45) na Serrana; 78% (22/28) e 46% (13/28) na Sul; 100% (10/10) e 60% (6/10) na Grande Florianópolis; 43% (12/28) e 36% (10/28) no Vale do Itajaí; 90% (18/20) e 30% (6/20) no Planalto Norte. Houve leucocitose em animais do grupo Positivos Leucocíticos Linfocíticos perante ambos os testes. Observou-se neutrofilia no grupo Positivos Leucocíticos Alinfocíticos para ambos os testes. Animais positivos apresentaram leucocitose com linfocitose na PCR 35% (45/130) e ELISA 32% (74/232). Animais acima de 4 anos tiveram maior prevalência de infecção pelo vírus. Propriedades onde havia número maior que 200 animais, que a reposição era realizada por meio de animais oriundos de outras propriedades, que reutilizavam seringas e agulhas, bem como mochação dos terneiros, possuíam banco de colostro e não possuíam histórico de doenças prévias ou testes confirmatórios, possuíam maior prevalência para o vírus da leucose bovina. Foram identificados 20 alelos, sendo dois descritos pela primeira vez na raça holandesa. O alelo 011:01 apresentou resistência ao vírus da LEB. A população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Conclui-se a prevalência da leucose em bovinos da raça holandesa no estado de Santa Catarina é de 52% pelo ELISA e 29% pela PCR, e que 35% dos animais apresentaram leucocitose com linfocitose. A raça holandesa, apesar de representar uma população grande, mantém baixa diversidade genética para o gene BoLA-DRB3, havendo associação de genes de resistência à infecção por BLV.

Palavras-chave: Vírus; Epidemiologia; Tolerância; Holandesa

ABSTRACT

FIORIN, F.E. 2024, p92. **Risk factors, seroprevalence and association of the BoLA-DRB3 locus with resistance to enzootic leukosis virus in dairy cattle.** Thesis (Doctorate in Animal Science) – Santa Catarina State University. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2024.

Enzootic bovine leukosis is an infectious disease with worldwide distribution, which results in major economic losses in cattle herds due to loss of productivity, veterinary costs, death of animals, and mainly due to early involuntary culling. It is a disease that has no treatment, nor vaccination control, therefore, one of the possibilities for control and prevention is the selection of animals resistant to BLV. The objective was to determine the prevalence and risk factors of enzootic bovine leukosis of the Holstein breed in the state of Santa Catarina, and the possible resistance/susceptibility associated with the BoLA-DRB3 locus. 447 Holstein cattle, adult females, from 27 properties, covering the six mesoregions of the state of Santa Catarina, were used. Prevalence and seroprevalence were determined using PCR and ELISA techniques, and a physical examination, leukogram and epidemiological questionnaire were carried out. To determine the variability of the BoLA-DRB3 gene, alleles from 181 animals were amplified using the PCRSBT technique. The fragments were sequenced and the raw sequence data were analyzed using Assign 400ATF ver. 1.0.2.41 software. Statistical analysis of data was performed using analysis of variance (ANOVA) for clinical and hematological variables. Univariate analysis was performed to verify the association between herd status for LEB and risk factors, using the chi-square test, followed by logistic regression analysis ($P < 0.05$). The GENETOP software was used to analyze genetic variability measurements. The prevalence of enzootic bovine leukosis was 52% (232/447) by ELISA and 29% (130/447) by PCR. It was obtained respectively by ELISA and PCR test, 42% (133/316) and 28% (96/316) in the West region; 82% (37/45) and 16% (12/45) in Serrana; 78% (22/28) and 46% (13/28) in the South; 100% (10/10) and 60% (6/10) in Greater Florianópolis; 43% (12/28) and 36% (10/28) in Vale do Itajaí; 90% (18/20) and 30% (6/20) in Planalto Norte. There was leukocytosis in animals in the Lymphocytic Leukocytic Positive group in both tests. Neutrophilia was observed in the A lymphocytic Leukocytic Positive group for both tests. Positive animals presented leukocytosis with lymphocytosis in PCR 35% (45/130) and ELISA 32% (74/232). Animals over 4 years old had a higher prevalence of virus infection. Properties where there were more than 200 animals, where the replacement was carried out using animals from other properties, which reused syringes and needles, as well as calves' chafing, had a colostrum bank and had no history of previous illnesses or confirmatory tests, had higher prevalence for bovine leukosis virus. 20 alleles were identified, two of which were described for the first time in the Holstein breed. The 011:01 allele showed resistance to the LEB virus. The population is in Hardy-Weinberg equilibrium. It is concluded that the prevalence of leukosis in Holstein cattle in the state of Santa Catarina is 52% by ELISA and 29% by PCR, and that 35% of the animals presented leukocytosis with lymphocytosis. The Holstein breed, despite representing a large population, maintains low genetic diversity for the BoLA-DRB3 gene, with an association of resistance genes to BLV infection.

Keywords: Virus. Leukosis; Epidemiology; Tolerance; Holstein

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição das mesorregiões do estado de Santa Catarina, Brasil, com o percentual de animais a serem coletados de acordo com os cálculos epidemiológicos.....	40
Figura 2 – Prevalência (%) e soroprevalência (%) do vírus da leucose bovina em 447 bovinos da raça holandesa, pelas técnicas de PCR e ELISA, no estado de Santa Catarina, Brasil.	465
Figura 3 - Prevalência e soroprevalência da leucose enzoótica bovina (BLV) em 447 bovinos da raça holandesa, pelas técnicas de PCR e ELISA, nas diferentes mesorregiões do estado de Santa Catarina, Brasil.	487

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mesorregiões, municípios, identificação da propriedade, número de vacas adultas presentes na propriedade, número de animais coletados, número de amostras positivas pelo teste da PCR e número de amostras positivas pelo teste de ELISA, respectivamente, de animais da raça holandesa no estado de Santa Catarina, Brasil.	476
Tabela 2 - Valores de média e desvios-padrão ($x \pm dp$) do leucograma, número total de leucócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos de 447 bovinos da raça holandesa positivos e negativos para leucose enzoótica bovina por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).	498
Tabela 3 - valores de média e desvios-padrão ($x \pm dp$) do leucograma, número total de leucócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos de 447 bovinos da raça holandesa positivos e negativos para leucose enzoótica bovina por meio do teste de ELISA.	498
Tabela 4 – Valores percentuais (%) do número de animais de cada categoria de acordo com os grupos negativos, positivos sem leucocitose, positivos leucocítico alinfocíticos e positivos leucocíticos linfocíticos de 447 bovinos da raça holandesa para leucose enzoótica bovina por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e por meio do teste de ELISA.....	509
Tabela 5 - Valores do exame físico (média \pm desvio padrão) de 447 bovinos da raça holandesa, negativos ou positivos para a infecção natural pelo vírus da leucose enzoótica bovina, determinados pela técnica de PCR.	50
Tabela 6 - Valores do exame físico (média \pm desvio padrão) de 447 bovinos da raça holandesa, categorizados como negativos ou positivos para infecção natural pelo vírus da leucose enzoótica bovina, determinados pela técnica de ELISA.	50
Tabela 7 – Número total e valores percentuais (%) de animais de acordo com a idade no dia da coleta, dentre os grupos positivos e negativos para leucose enzoótica bovina de 447 bovinos da raça holandesa por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) no estado de Santa Catarina, Brasil...51	
Tabela 8 - Número total e valores percentuais (%) de animais de acordo com a idade no dia da coleta, dentre os grupos positivos e negativos para leucose enzoótica bovina de 447 bovinos da raça holandesa por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) no estado de Santa Catarina, Brasil.....52	
Tabela 9 - Fatores de risco avaliada por meio de questionário epidemiológico e sua associação entre animais positivos e negativos para a infecção natural pelo vírus da leucose enzoótica bovina, por meio do teste de ELISA, em bovinos leiteiros da raça holandesa, no estado de Santa Catarina, Brasil.....53	
Tabela 10 - Frequência gênica dos alelos BoLA-DRB3 detectados por PCR-SBT em 181 animais da raça holandesa associados aos positivos e negativos para BLV por meio dos testes de ELISA e PCR, no estado de Santa Catarina, Brasil.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

VCM – Volume Corpuscular Médio
HCM – Hemoglobina Corpuscular Médio
CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
mM – milimolar
pmol – picomole
Mg – miligramas
mA – miliamper
V – Volts
Pb – pares de base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
ELISA – Ensaio Imunoenzimático
LEB – Leucose enzoótica bovina
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
ng – nanogramas
DNA – Ácido desoxirribonucleico
IgM – Imunoglobulinas
uL – microlitros
CBS – Dried Blood Spots
TNF – Fatores de necrose tumoral
MHC – Complexo de histocompatibilidade principal
LEB – Leucose enzoótica bovina
BLV – Vírus da leucose bovina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	17
1.1	OBJETIVOS GERAIS	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2	HIPÓTESE	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	Leucose Enzoótica Bovina	19
3.2	Pecuária leiteira e a importância da raça holandesa neste cenário	27
3.3	GENE BoLA-DRB3	29
4.4	REFERÊNCIAS	32
5	FATORES DE RISCO E PREVALÊNCIA DO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL	38
5.1	INTRODUÇÃO	39
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.2.1	Comitê de Ética	40
5.2.2	Obtenção das amostras e determinação do N amostral	40
5.2.3	Animais e colheita das amostras	42
5.2.4	Exame Físico	43
5.2.5	Leucograma, proteína total e fibrinogênio plasmático	43
5.2.6	Extração, purificação, quantificação e diluição de ácidos nucleicos	44
5.2.7	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	44
5.2.8	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	45
5.2.9	Questionário Epidemiológico	45
5.2.10	Análise Estatística	45
5.3	RESULTADOS	45
5.3.1	Prevalência e Soroprevalência	45
5.3.2	Leucograma	48
5.3.3	Exame Físico	50
5.3.4	Idade	52
5.3.5	Fatores de Risco	53
5.4	DISCUSSÃO	55

5.5 CONCLUSÃO	59
5.6 REFERÊNCIAS	60
6 ASSOCIAÇÃO DO LOCUS BOLA-DRB3 COM A RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS.....	63
6.1 INTRODUÇÃO	64
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	65
6.2.1 Comitê de Ética.....	65
6.2.2 Animais e obtenção das amostras.....	65
6.2.3 Extração de DNA	65
6.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	65
6.2.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	66
6.2.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	66
6.2.7 Genotipagem do gene BoLa-DRB3 por meio da técnica de PCR-SBT (Polymerase Chain Reaction – Sequence Based Typing).....	67
6.2.8 Análises estatísticas.....	67
6.2.8.1 Medidas de variabilidade genética	67
6.3 RESULTADOS.....	67
6.4 DISCUSSÃO.....	69
6.5 CONCLUSÃO	73
6.6 REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira representa grande importância socioeconômica no contexto nacional, onde segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil é o terceiro maior produtor de leite (LIMA et al., 2017). Santa Catarina por sua vez, detém o quinto lugar no ranking de produção nacional, com mais de 3 bilhões de litros ano (IBGE, 2022).

Devido as difíceis condições ambientais, nutricionais e sanitárias, bem como a baixa rusticidade de raças leiteiras especializadas, a produção leiteira em regiões tropicais torna-se um constante desafio (SANTOS et al., 2011). Dentre as raças especializadas, a mais difundida e amplamente utilizada no Brasil é a raça holandesa, raça essa capaz de produzir leite de excelente qualidade, aliado a um grande volume diário se os animais forem expostos a condições de criação adequadas.

No entanto, como mencionado, esses animais são sensíveis aos desafios expostos ao meio em que vivem, conferindo predisposição à manifestação de doenças, devido a quedas do seu sistema imune (PORTER, 1978).

Na raça holandesa, e em especial ao estado de Santa Catarina, trabalhos sobre a prevalência e resistência às enfermidades são incipientes, demonstrando a necessidade de estudos que comprovem o potencial de uso de linhagens dessa raça em programas de melhoramento genético com intuito de reduzir custos de perda de produtividade e descarte involuntário de animais, causados por enfermidades, aliado a manter a qualidade dos produtos oriundos dessa produção no que tange à saúde pública.

O conhecimento acerca de genes relacionados à imunidade e tolerância ou resistência à enfermidades dentro de raças específicas permite uma visão mais ampla e moderna dos mecanismos que podem levar indivíduos ou grupos raciais a desenvolverem características de interesse.

A resistência às doenças, principalmente em raças caracterizadas como sensíveis, é uma característica desejável e com potencial para ser explorada com o objetivo de aumentar a produtividade e o retorno econômico, sendo uma possível ferramenta profilática, evitando o descarte prematuro de animais desejados no rebanho.

O gene BoLA-DRB3, do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) dos bovinos, tem elevada associação com várias enfermidades que acometem a espécie. Ainda assim, a raça, estado reprodutivo, manejo e ambiente também são fatores a serem

considerados na resistência à enfermidades, e devem estar associados às informações genéticas (SHARIF et al., 1998).

Sendo assim, este estudo propõe detectar a prevalência e os fatores de risco da leucose enzoótica bovina no estado de Santa Catarina, e associar a resistência ou susceptibilidade à leucose enzoótica bovina associados ao gene BoLA-DRB3.

O conhecimento científico gerado será de grande importância para o estabelecimento de novos programas de melhoramento, para a formação de populações geneticamente resistentes, visto que há indícios que o vírus da leucose bovina tem grande impacto no que tange a saúde pública no Brasil e no mundo, além de não haver vacina ou tratamento para a enfermidade.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Determinar a prevalência da leucose enzoótica bovina em bovinos leiteiros da raça holandesa no estado de Santa Catarina, além dos fatores de risco para a propagação da doença nas propriedades, e a possível resistência destes animais à enfermidade associando-se o locus BoLA-DRB3.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a prevalência e os fatores de risco de leucose enzoótica bovina por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) em bovinos da raça holandesa.
- Correlacionar os dados do exame físico, leucograma e questionário epidemiológico dos animais positivos e negativos à infecção por leucose enzoótica bovina.
- Identificar alelos de resistência ou susceptibilidade do locus BoLA-DRB3 a leucose enzoótica bovina em animais da raça holandesa.

2 HIPÓTESE

Acredita-se que os bovinos da raça holandesa tenham alta prevalência de leucose enzoótica bovina em Santa Catarina, porém, alguns animais podem apresentar alelos do gene BoLA-DRB3 de resistência à infecção.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leucose Enzoótica Bovina

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB), também conhecida como Leucemia Bovina Linfomatosa ou Linfoma Maligno de bovinos, é causada por um vírus pertencente à família Retroviridae, gênero Deltaretrovírus, mais especificamente o Vírus da Leucose Bovina (BLV) (MA et al., 2021). Tendo caráter infeccioso, esse retrovírus acomete inicialmente o sistema de defesa, especialmente linfócitos B culminando com uma doença linfoproliferativa crônica em bovinos (ALMEIDA et al., 2021).

O BLV é um vírus tipo C contendo RNA considerado um dos cinco mais importantes patógenos para bovinos (MA et al., 2021) e foi descrito pela primeira vez em 1871 na Lituânia, onde já se acreditava tratar-se de uma doença infectocontagiosa porque se espalhou rapidamente por meio dos rebanhos (WOOLUMS, 2023). As importações de animais da região do mar Báltico carregaram o vírus para os Estados Unidos no fim do século XIX, onde em 1969, Miller isolou o vírus de linfócitos cultivados infectados. Na China, o primeiro relato ocorreu em 1974 (LONG et al., 2004). No pós-guerra, ocorreu a disseminação do vírus para o restante do mundo e desde então o BLV tem sido extensivamente investigado (JUNIOR et al., 2001).

A introdução do BLV em rebanhos brasileiros está atribuída à importação de bovinos do hemisfério norte, por pecuaristas de gado de elite das regiões Sudeste e Sul. Uma vez estabelecida nessas regiões, se disseminou para as regiões Norte e Nordeste por meio do trânsito e comercialização de animais, principalmente, pela ausência na época, de uma política sanitária visando combater a disseminação da doença em território nacional (CARNEIRO et al., 2003).

A infecção natural não se limita aos bovinos domésticos (*Bos taurus*, *Bos indicus*), ocorrendo também em búfalos (*Bubalus bubalis*) e capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Outras espécies como ovelhas (*Ovis aries*) podem ser infectados experimentalmente (KUCZEWSKI et al., 2020), porém o processo da doença clínica difere de bovinos, pois desenvolvem tumores mais precocemente e com maior frequência após exposição. Outras espécies podem gerar resposta imune após desafio experimental como veados, coelhos, ratos, porquinhos-da-índia, gatos, cães, macacos rhesus, chimpanzés, antílopes, porcos e cabras (OIE, 2018).

Pesquisas apontam que o linfoma é responsável por 13,5% das condenações de carcaças bovinas no abate nos EUA; já as perdas econômicas associadas ao BLV na indústria de laticínios são estimadas em US\$ 285 milhões (BENITEZ et al., 2019).

A infecção com BLV em bovinos prejudica as respostas do sistema imunológico, reduzindo a longevidade, deixando os animais mais suscetíveis ao desenvolvimento de doenças infecciosas devido à imunossupressão causada pelo vírus (KAKINUMA et al., 2014).

A leucose enzoótica bovina é uma doença de notificação obrigatória de acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e já foi notificada no Canadá, Estados Unidos, Alemanha, Portugal, Argentina, Chile e Brasil (OIE, 2009).

Rebanhos bovinos infectados são encontrados em todo o mundo. Nos Estados Unidos, 38% dos rebanhos de corte, 84% dos rebanhos leiteiros, e 100% dos rebanhos leiteiros em grande escala estão infectados (WOOLUMS, 2023), apesar da existência de vários programas de controle do BLV exercidos pelas propriedades (KUCZEWSKI et al., 2020). Linfócitos infectados pelo BLV também são encontrados em 83% dos produtos lácteos nos EUA. Situação semelhante é observada na Rússia, onde um terço do gado leiteiro está infectado (BARLLET et al., 2014).

Na China a prevalência de infecção é levemente menor, atingindo cerca de 10,0% do rebanho do país. No Japão, a soroprevalência de indivíduos e grupos foi de 28,6%; já na Coreia, a taxa de prevalência geral foi maior que 50%, enquanto 86,8% dos rebanhos leiteiros estavam infectados (RODRÍGUEZ et al, 2011).

No Brasil, a prevalência é variada nos Estados, com 56,34% no Paraná (BARROS FILHO et al., 2010), 24,1% em Pernambuco (BATISTA FILHO et al., 2019) e 11,2% em São Paulo (CARILLO et al, 2019).

Com relação à epidemiologia da leucose enzoótica bovina em Santa Catarina, após pesquisas de prevalência no município de Mafra, obteve-se que 7,6% do rebanho era positivo (LUDERS, 2001), o que demonstra a carência de mais estudos no Estado sobre esta doença infectocontagiosa. RODAKIEWICZ et al., (2018) encontraram em bovinos leiteiros das raças holandesa, Jersey e suas cruzas, em quatro mesorregiões do Estado de Santa Catarina, soroprevalência de 68% por meio do teste de IDGA e 80,5% pela técnica da PCR em animais previamente detectados como soropositivos.

Estes dados também são importantes para que sejam avaliados os fatores de risco, presentes ou ausentes em cada local, que determinam prevalências maiores ou menores de acordo com o manejo empregado (KOBAYASHI et al., 2014).

A disseminação do vírus depende muito de características do próprio rebanho e estratégias de manejo. Rebanhos criados em sistema de confinamento podem diminuir o risco de introdução de BLV, por meio de agentes externos, e, portanto, minimizando o risco de transmissão e novas infecções interpopulacional (NEKOU EI et al., 2015). Por outro lado, o contato direto entre animais e suas secreções, bem como o compartilhamento de materiais e equipamentos tende a ser maior, podendo predispor a aumento significativo de animais positivos em rebanhos onde a carga proviral é grande (KOBAYASHI et al., 2015).

A introdução de sistemas automatizados de criação de bezerras, principalmente para utilização de substitutos do leite, em rebanhos com alta densidade populacional, pode aumentar o risco de disseminação (SUN et al., 2015).

O aumento da idade média dos animais dentro de um rebanho está associado a aumento na prevalência (ŞEVIK et al., 2015), destacando que bovino leiteiro mais velho geralmente tem taxa de infecção mais alta do que jovens (ERSKINE et al., 2012b). A maior prevalência entre animais mais velhos pode ser devido ao maior tempo de exposição ao agente dentro do rebanho (MA et al., 2021).

A ausência de exames na compra de animais para reposição também é documentada como possível causa de disseminação entre rebanhos (ALMEIDA et al., 2021).

O contato intergeracional, como a exposição de novilhas a vacas mais velhas em rebanhos leiteiros (SARGEANT et al., 1997) ou entre bezerros e bovinos adultos em rebanhos de corte, tem impacto sobre o aumento da prevalência de BLV dentro do rebanho (KOBAYASHI et al., 2014).

As regiões geográficas possuem diferentes prevalências dentro do rebanho em alguns estudos (NEKOU EI et al., 2015), mas em outros não (SCOTT et al., 2006). Na China, maiores prevalências são observadas entre latitudes de 30 a 40° e longitudes entre 100 a 110°, logo, regiões com menor altitude, detém proporções maiores de animais infectados (MA et al., 2021). Perante a divergência de resultados, nenhuma compreensão clara sobre o papel da localização geográfica sobre a prevalência é contundente (KUCZEWSKI et al., 2020).

O meio mais comum de disseminação do BLV é a transmissão horizontal por contato direto com fluido biológico contaminado com linfócitos infectados. Procedimentos iatrogênicos que transferem sangue entre bovinos contribuem para a disseminação da infecção (BENÍTEZ et al., 2019). A transferência de sangue entre bovinos é reconhecida como um dos principais fatores de risco para a propagação, onde pequenos volumes de sangue contêm quantidades suficientes de linfócitos infectados para transmitir o vírus. A reutilização de agulhas (RAMÍREZ VÁSQUEZ et al., 2016), principalmente para administração de ocitocina

no momento da ordenha (RODRÍGUEZ et al., 2011), equipamentos de brincagem e tatuagem, bem como compartilhamento de instrumentais cirúrgicos entre animais, sem a devida desinfecção, principalmente em processos de descornas ou orquiectomias são fontes de contaminação para o rebanho (ERSKINE et al., 2012a).

O reaproveitamento de luvas para palpação retal geralmente está associado a aumento na prevalência dentro das propriedades leiteiras, uma vez que a manipulação causa lesões na mucosa retal, transferindo sangue de um animal para outro (ERSKINE et al., 2012).

A maior intensificação da produção, associada à presença de ordenha mecânica favorece a transmissão da doença, uma vez que deficiências no manejo, especialmente na saúde e desinfecção do úbere, bem como desinfecção e manutenção dos equipamentos de ordenha podem facilitar a transmissão do vírus (JAWORSKI et al., 2016).

Além disso, o DNA proviral é identificado em secreções nasais, saliva, sêmen e esmegma, entretanto, a transmissão natural por meio dessas secreções não é claramente demonstrada (WOOLUMS, 2023). No entanto, a carga proviral dos animais hospedeiros está diretamente atrelada à capacidade de transmissão do agente, uma vez que animais com menos de 100 cópias provirais/50 ng de DNA genômico no sangue são incapazes de transmitir BLV (BENITEZ et al., 2019), enquanto animais com carga proviral mais alta (100–500 cópias provirais/50 ng de DNA genômico no sangue) são capazes de infectar outros animais (MEKATA et al., 2018). Portanto a transmissão do BLV durante a reprodução é possível, embora possa não ser causado pelo sêmen, e sim devido à microabrasões no pênis, que carrega sangue para vulva e vagina (KUCZEWSKI et al., 2020).

Insetos hemagófgos como moscas e mosquitos tem real importância sobre a transmissão do BLV, onde mosquitos do gênero *Anopheles spp.* assumem maior papel nesse contexto (MA et al., 2021).

A transmissão vertical também é relatada e dentre as formas, a transmissão via barreira transplacentária possui elevada importância (ANDOH et al., 2020).

Embora a transmissão de vacas soropositivas para bezerros via colostro ou leite tem sido vastamente relatado (BENITEZ et al., 2019), quantificar o risco de transmissão por essas vias continua sendo uma lacuna de conhecimento. Isso se deve ao colostro materno possuir anticorpos que sugerem ter efeito protetor ao neonato, anticorpos estes, que podem ser detectados entre o 3º e 9º mês de idade dos bezerros (KOBAYASHI et al., 2010). Outra teoria, carente de confirmação, é que colostro ou leite submetidos ao congelamento acabam tendo cargas provirais inativadas, diminuindo seus impactos de transmissão após o descongelamento (RUIZ et al., 2018).

Apesar de o BLV ser um vírus RNA, o mesmo, após entrar nos hospedeiros, integra o material genético, sendo capaz de originar um provírus DNA, combinando-se com o genoma de seu hospedeiro, estabelecendo uma infecção persistente ao longo de toda a vida, principalmente em linfócitos B e T (GOOF, 2013).

O período médio de incubação do vírus até o aparecimento dos primeiros sinais clínicos é de quatro anos. Como a maioria das infecções são assintomáticas, muitas vezes é dada pouca importância pelos pecuaristas, visto que não trás impactos palpáveis e visíveis na rotina das propriedades na maioria dos casos (MA et al., 2021). Porém, vale salientar, que a perpetuação da doença nos rebanhos, tem impacto direto sobre a produção (KUCZEWSKI et al., 2020), levando a diminuição de até 3% na produção de leite, e acarreta em descartes ou condenações prematuras de animais, causando impactos econômicos importantes (ALMEIDA et al., 2021).

Bezerros neonatos infectados com BLV por via vertical, apresentam concentrações mais baixas de IgM e linfócitos T no sangue (MEIROM; BRENNER, 1997). Isso deve-se basicamente à imunossupressão gerada na mãe, que acarreta em produção de colostro de pior qualidade, levando o bezerro a tornar-se mais susceptível a infecções secundárias. Porém, a leucose enzoótica bovina não é relatada como afecção causadora de mortalidade neonatal, e sim, predisponente para causas secundárias (RODRÍGUEZ et al., 2011).

Aumento de transtornos reprodutivos é relatado em animais sororreativos ao BLV, sendo capaz de gerar bezerros natimortos, repetição de estros, retenção de envoltórios fetais e metrites. Estudos recentes demonstraram que animais positivos levam em média 48 dias a mais para gerar uma nova concepção, comparado com animais negativos (ALMEIDA et al., 2021).

As manifestações clínicas da fase tumoral dependem da localização das proliferações tumorais, incluindo distúrbios digestivos, inapetência, letargia, perda de peso, linfonodos aumentados e manifestações neurológicas. Linfonodos superficiais podem estar aumentados, principalmente os pré-escapulares, pré-crurais, mamários, mandibulares e viscerais, podendo ser palpados sob a pele e pelo exame retal (OIE, 2021). Nessa fase, são comuns as manifestações clínicas de exoftalmia e paresia de membros, podendo o animal permanecer em decúbito permanente (SILVA et al., 2008).

O vírus codifica pelo menos duas proteínas reguladoras: Tax e Rex. Tax é a proteína oncogênica, responsável pela replicação e manifestação de linfomas (SAGATA et al., 1984). Estes linfomas são mais frequentemente encontrados em animais entre quatro e oito anos de idade, podendo induzir a ruptura do baço, levando o animal a óbito (POLAT; TAKESHIMA;

AIDA, 2017). Os órgãos mais afetados são o abomaso, aurícula direita do coração (sinais clínicos de insuficiência cardíaca congestiva), baço, intestino, fígado, rim, omaso, pulmão e útero (OIE, 2021).

A leucocitose (leucócitos superior a $15 \times 10^3/\mu\text{L}$) e linfocitose persistente (linfócitos superior a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$) é um achado comum, sendo considerada quando há presença de dois ou mais hemogramas com a contagem acima dos valores de referência (BRENNER; AVIDAR; LAHAV, 2007).

Bovinos infectados, na sua maioria, permanecem assintomáticos por toda a vida e atuam como portadores do vírus (FRIE; COUSSENS, 2015). Em torno de 30 a 40% dos animais apresentam linfocitose persistente, enquanto menos de 5% evoluem para a apresentação clínica da doença, apresentando linfomas (linfomas de células B) (BENITEZ et al, 2019).

Diferentes métodos de detecção e diagnóstico possuem diferente sensibilidade e especificidade a patógenos, portanto os métodos de detecção são geralmente uma das principais fontes de heterogeneidade nos resultados dentro de um mesmo rebanho. O diagnóstico da leucose enzoótica nos rebanhos é imprescindível para que seja possível a adoção de medidas profiláticas e de controle (CAMARGOS et al., 2003).

Embora células sanguíneas possam ser essenciais para o diagnóstico da infecção pelo BLV por meio de técnicas moleculares, alguns animais não produzem níveis adequados do vírus para pesquisa e diagnósticos confirmatórios; portanto, o teste de propagação do vírus é um método importante que proporciona maior valor diagnóstico (KHUJAJAIR et al., 2021). A eficiência do BLV em infectar diferentes tipos celulares *in vitro* foram previamente demonstrados, além disso, a propagação viral pode ser uma forma útil de examinar mais detalhadamente as propriedades biológicas do vírus (KOHARA; YOKOMIZO, 2007).

Métodos sorológicos indiretos, como a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são rotineiramente aplicados para BLV. O IDGA mostra-se importante ferramenta de detecção de anticorpos contra a proteína gp 51 da partícula viral, possuindo especificidade pelo fato do vírus ser estável genomicamente, sendo um teste viável e muito acessível (RADOSTITS et al., 2002), sendo adotado como exame oficial por órgãos de defesa de vários países para o diagnóstico (PEREIRA, 2013).

Nos últimos 10 anos, o método de detecção amplamente utilizado na maioria dos estudos é o teste de ELISA. É um método simples, rápido, sensível e específico (MA et al, 2021). A soroconversão ocorre normalmente entre a 3ª e 14ª semanas após a exposição, porém, alguns estudos relataram um período de tempo ainda menor, variando de 2 a 4

semanas após exposição ao vírus (BENITEZ et al., 2019). Ambos os testes, IDGA e ELISA, são métodos aprovados pela OIE (Organização Mundial de Saúde Animal - OIE, 2018).

No entanto, outros métodos podem ser utilizados para o diagnóstico da afecção, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ou a nested-PCR (MA et al., 2021), sendo capaz de detectar o DNA proviral apenas sete dias após a infecção (KLINTEVALL et al., 1994). Porém, essa tecnologia é mais exigente, requerendo aprendizado e custos elevados. Possui maior sensibilidade e é mais adequado para testes qualitativos de laboratório e pesquisa epidemiológica molecular (MA et al., 2021).

A concordância comparando os resultados entre ELISA e PCR normalmente é elevada, porém trabalhos divergem sobre resultados que apresentem maior especificidade e capacidade de detecção. Resultados de estudos sorológicos/PCR comparativos para a detecção de BLV revelaram que mais animais positivos podem ser detectados por PCR do que por ELISA (SAUSHKIN et al., 2019). Por outro lado, outros trabalhos citam o inverso, com maior prevalência sendo detectada pela técnica de ELISA (NAGY et al., 2003).

É relatado, que animais infectados podem exibir periodicamente ou permanentemente títulos baixos de anticorpos contra BLV, como por exemplo, no período pré e pós-parto (OIE, 2018). Além disso, alguns portadores PCR positivo, podem apresentar títulos de anticorpos anti-BLV indetectáveis por meses e anos (SAUSHKIN et al., 2019).

No caso do monitoramento do BLV, a PCR é considerada um método adicional para diagnóstico em bovinos soronegativos, especialmente bezerros, que podem não possuir resposta imune mensurável ao vírus (MARTIN et al., 2001).

Nos últimos anos, a tecnologia de Dried Blood Spots (DBS) para amostragem de sangue na prática médica tem crescido rapidamente, embora em diagnósticos veterinários o DBS não seja amplamente difundido (SAUSHKIN et al., 2019).

A leucose bovina não possui tratamento, portanto, várias abordagens estratégias eficazes para o seu controle são reportadas. Uma vez identificado o rebanho positivo, as três estratégias de controle comumente usadas, separadamente ou em combinação são: abate de bovinos com teste positivo; segregação física de animais positivos e negativos em locais separados; e implementação de boas práticas de manejo para reduzir a capacidade de transmissão do BLV (KUCZEWSKY et al., 2020).

Considerando que seria possível abater animais positivos em rebanhos de baixa prevalência, não é economicamente viável em rebanhos de média ou alta prevalência. Nesses rebanhos, abordagens alternativas para controlar o vírus podem ser implementadas (RODRÍGUEZ et al., 2011).

Outra ferramenta, quando o abate de todos os animais positivos não é uma opção viável, seria por meio do abate estratégico de bovinos de alto risco, ou seja, aqueles que detêm alta carga proviral, sendo esses, os maiores disseminadores do vírus dentro do rebanho (KUCZEWSKI et al, 2020).

A correlação entre a carga proviral de bovinos infectados com BLV sobre a dinâmica de transmissão recebeu recentemente maior importância. As descobertas são consideradas importantes para o controle nas propriedades, especialmente naquelas em que a prevalência no início de um programa de controle é elevada, podendo assim constituir uma alternativa ou um complemento às estratégias adotadas (BENITEZ et al., 2019).

Uma titulação de anticorpos baseada em ELISA tem potencial como solução barata e alternativa, visto que os títulos de anticorpos p24 (antígeno BLV) são diretamente correlacionados com a carga proviral (GUTIÉRREZ et al., 2012). Sobre outra perspectiva, bovinos com linfocitose persistente normalmente apresentam maior carga proviral do que aqueles com contagem normal de linfócitos (BENÍTEZ et al., 2019).

O BLV pode também ter implicações para a saúde pública. O vírus está intimamente relacionado ao vírus da leucemia de células T humanas, e a capacidade de infectar humanos é um assunto de grande preocupação e discussão (BUEHRING et al., 2015).

Estudos afirmam que o vírus da leucose bovina pode se replicar em células humanas e pode estar associado a outras doenças, incluindo câncer de mama (BUEHRING et al., 2014). Recentemente, foi relatada a presença de DNA de BLV em tecido mamário humano, indicando possível potencial zoonótico; no entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa constatação (KHUDHAIR et al., 2021). Estudos prévios, já demonstravam a sensibilidade de células humanas ao BLV, quando realizado estudos *in vitro* (MA et al., 2021).

Na década de 70, Burridge concluiu em seu artigo de revisão, que “Não há evidências epidemiológicas ou sorológicas de estudos em humanos que indiquem que o BLV possa infectar o homem”, pelo fato de não conseguir detectar anticorpos contra BLV em soro humano (SUHANDYNATA et al, 2020).

No entanto, com o advento do imunotransferência, 100 vezes mais sensível que as técnicas utilizadas na década de 1970, permitiu-se detectar presença de anticorpos reativos. Foram detectadas proteínas do capsídeo p24 do vírus em amostras de soro de 39% de 257 voluntários humanos selecionados. Porém, não foi possível determinar se os anticorpos eram oriundos de uma resposta à infecção ou simplesmente ao BLV inativado pelo calor após consumo de produtos alimentícios (WOLLUMS, 2023).

Em bovinos, o DNA do BLV e a proteína p24 foram detectados no tecido mamário, enquanto apenas o DNA foi detectado em linfócitos. Técnicas *in situ* (ou seja, IS-PCR, PCR hibridização *in situ* e IHC) permitiram a confirmação de que o vírus foi localizado nas células epiteliais mamárias em humanos (FANG et al., 2014).

A presença de DNA e proteína do BLV em humanos não é surpreendente, pois muitos vírus, incluindo os de caráter oncogênico, são conhecidos por cruzarem espécies naturalmente, processo esse, que representa uma ameaça mais grave para a saúde humana (WOLLUMS, 2023).

Genes provirais do BLV foram amplificados a partir de amostras de tumor mamário e amostras de controle de tecido saudável de mulheres, revelando 95,9% (47/49) e 59% (23/39) de positividade, respectivamente, sendo a maior correlação de BLV e câncer de mama humano encontrado no mundo até o momento, na população de Minas Gerais (DELARMELINA et al., 2020).

3.2 Pecuária leiteira e a importância da raça holandesa neste cenário

A pecuária leiteira representa grande importância socioeconômica para o país. Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil é o terceiro maior produtor de leite, com 34 bilhões de litros por ano, com produção em 98% dos municípios, sendo a maior parte deste volume diluído em pequenas e médias propriedades, empregando cerca de 4 milhões de pessoas (LIMA et al., 2017).

Destes 34 bilhões de litros, o estado de Santa Catarina possui o maior volume de produção formal, ou seja, submetido à inspeção para venda. Entretanto, em produção por estado, Minas Gerais continua sendo o maior produtor, correspondendo aproximadamente 24% de todo volume nacional (EMBRABA, 2022).

O estado de Santa Catarina compreende apenas 1,13% do território brasileiro, com pouco mais de 95 mil km², no entanto, representa o quinto maior produtor de leite no âmbito nacional, com mais de 3 bilhões de litros por ano. Cerca de 75% do leite produzido no estado, provém da Mesorregião Oeste, onde cerca de 87% das propriedades possuem área inferior a 50 hectares, sendo que a mão obra familiar é a base da produção (EPAGRI, 2021).

A produção leiteira em ecossistemas tropicais como o Brasil é um desafio contínuo devido as difíceis condições ambientais, nutricionais e sanitárias, aliadas a baixa rusticidade das raças especializadas (SANTOS, 2015).

De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça holandesa (ABCBRH, 2021) a raça Holstein-Friesian possui grande destaque, sendo reconhecida por sua capacidade de produção, com médias de 26 a 29 litros/dia, possuindo alta qualidade do leite produzido. Devido a essas características a raça se faz presente em 70% das propriedades produtoras de leite no Brasil (ABCBRH, 2021).

Não há um entendimento sobre a origem da raça holandesa, onde ao que tudo indica, foi domesticada há mais de 2.000 anos na Holanda setentrional, na Frísia (Países Baixos) e também na Frísia Oriental (Alemanha). Prescott (1930) sugere que o bovino originou-se da Lombardia (ROUSE, 1971).

Devido à construção de sistemas de irrigação e um programa de resgate de terras, desde o século XV, houve aumento da possibilidade de produção de forragens, onde o bovino se multiplicou aceleradamente. Sabe-se que vários mercados de bovinos foram estabelecidos entre 1200 e 1500 d.C. Em 1.624 foram introduzidos 12.000 bovinos da Dinamarca, na região holandesa, porém devido as tragédias nas regiões baixas, houve implicação direta na proliferação desses animais, onde milhares de bovinos acabavam morrendo, chegando a diminuição de cerca dois terços dos rebanhos (ROUSE, 1971).

Berkhey, em suas escritas, menciona a importação de grande número de bovinos brancos e pretos, podendo supor que o gado moderno dos Países Baixos teve início na Segunda metade do século XVIII. Buscando melhorar a produtividade leiteira, houve incremento nas importações da Inglaterra, Europa continental, América do Norte, Índia e África do Sul (ROUSE, 1971).

Na Segunda metade do século XIX começou um vasto trabalho de melhoramento genético. Nos Estados Unidos, foi realizada a importação de muitos animais da Holanda. Em 1872 publicou-se o primeiro Herd-Book. O Herd-Book de 1885 era dedicado ao gado "Holstein – Friesian", mas em 1978, o nome foi reduzido para apenas "Holstein" (APCGH, 2023).

O nome Holstein, hoje é o mais utilizado quando se refere à raça internacionalmente, sendo que as linhagens norte-americanas dominam a maioria das linhagens Friesian da Europa, as mesmas que lhe deram origem (PORTER, 1978).

Não é estabelecida uma data precisa de introdução da raça holandesa no Brasil. Paulino Cavalcanti (1935) cita que "segundo os dados históricos, referentes à nossa colonização, presume-se que o gado holandês foi trazido nos anos de 1530 a 1535", e até o início da década de 1980, o Brasil era considerado o detentor do maior rebanho mundial de Holandês Vermelho Branco (PORTER, 1978).

A raça holandesa é a raça mais conhecida e difundida, devido à sua capacidade de produzir grandes volumes de leite. Os animais são dóceis, possuindo grande porte, com pelagem preta e branca ou vermelho e branco. Além da sua alta produtividade, possuem boa longevidade dentro do rebanho, garantindo melhor retorno econômico dentro das fazendas (PORTER, 1978).

No entanto, são animais muito sensíveis ao calor e a parasitas como carrapatos, tendo comprometimento da sua resposta imune quando expostos a desafios. Por este motivo, expressam melhor seu potencial produtivo em sistemas de confinamento, que tenham conforto térmico e instalações apropriadas (PORTER, 1978).

Os produtores de animais da raça holandesa devem continuar se preocupando com características de saúde e resistência, que afetam diretamente a taxa de descarte e a lucratividade das fazendas leiteiras. É evidente que para dar retorno econômico, exige-se que a vaca permaneça por um tempo satisfatório no rebanho, sem possuir complicações que possam impedir ou minimizar sua produção (PORTER, 1978).

Em se tratando do BLV, os bovinos da raça holandesa apresentam maior risco de infecção em comparação com outras raças, como pardos suíços (ŞEVIK et al., 2015). A importação de Holsteins da América do Norte aumentou a ocorrência de BLV em outros países, sugerindo impacto direto da raça sobre a prevalência de BLV (SUH et al., 2005).

3.3 GENE BoLA-DRB3

O gene BoLA-DRB3, do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) dos bovinos, possui associação com diversas enfermidades que acometem a espécie. Ainda assim, a raça, o manejo e ambiente são fatores que devem ser considerados na resistência à enfermidades, devendo estar associados às informações genéticas (SHARIF et al., 1998).

Genes que codificam receptores para a resposta imune, são representados pelo complexo de histocompatibilidade principal (CHP) - Major Histocompatibility Complex (MHC) – sendo fundamental a maioria dos animais vertebrados, configurando um importante elemento genético de resistência a diversas doenças (LO; AIDA, 2022).

Existem três grupos de antígenos do complexo de histocompatibilidade: moléculas de Classe I, Classe II e Classe III. As moléculas de Classe I estão expressas nas células nucleadas, tendo função carrear peptídeos aos linfócitos T CD8+, os quais são capazes de neutralizar células neoplásicas e células infectadas por vírus. Já as moléculas de Classe II são codificadas por genes distintos, dando origem às cadeias α e β . Essas moléculas carregam

peptídeos derivados de patógenos extracelulares para as células T CD4+, estimulando ação de macrófagos e células B, gerando resposta inflamatória e produção de anticorpos (ALTMANN; TROWSDALE, 1989).

As moléculas de Classe III estão associadas da mesma forma ao sistema imune, em componentes do sistema de complemento e fatores de necrose tumoral (TNF) (ALTMANN; TROWSDALE, 1989).

A cristalografia por raios-X é capaz de determinar estruturas das moléculas das Classes I e II, sendo assim, são determinados os sítios de ligação de peptídeos e sua interação com os receptores de antígenos das células T CD4+ (BJORKMAN et al., 1987).

Os genes do MHC bovino, diferentemente dos humanos, estão localizados no autossomo 23 (BTA23), sendo denominado de antígeno linfocitário bovino – bovine lymphocyte antigen – BoLA (Behl et al., 2012). Na molécula de Classe I do gene BoLA existem dois locus, o BoLA-A e o BoLA-B (BENSAID et al., 1991). Os genes da Classe II são os mais estudados, sendo denominadas por IIa e IIb (STAFUZZA et al., 2013). A sub-região IIa possui dois conjuntos de genes, DR e DQ (DAVIES et al., 1994).

Algumas técnicas são utilizadas para caracterizar a região da Classe II do MHC bovino, dentre elas: técnicas sorológicas (DAVIES et al., 1994), sondas de hibridização, análise de polimorfismos por fragmentos de restrição (GROENEN et al., 1989), reação em cadeia da polimerase seguida por análise de polimorfismos por fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (MAILLARD et al., 1999) e sequenciamento genômico (SIGURDARDOTTIR et al., 1991).

A sub-região IIa do MHC dos bovinos compreende os genes DRA e DRB, sendo que o gene DRA codifica a cadeia α da molécula DR (ZHOU et al., 2007). Os genes que codificam a cadeia β , são bastante polimórficos. O segundo éxon, que codifica a parte variável do sítio de ligação concentra grande parte dos polimorfismos (BURKE; STONE; MUGGLI-COCKETT, 1991). Em bovinos, são descritos três locus da família DRB: o DRB1; o DRB2 e o DRB3, sendo esse altamente expresso e polimórfico (BEHL et al., 2012).

Marcadores moleculares são utilizados para determinar e quantificar a variabilidade genética, sendo utilizados, entre outros para resistência a enfermidades (COUSSENS; NOBBIS, 2002).

Em bovinos, o gene DRB3 é associado à tolerância a enfermidades, dentre elas a neosporose (SCHWAB et al., 2009) e mastite (IBRAHIM et al., 2012). Há uma íntima associação do antígeno linfocitário bovino DRB3.2, com várias enfermidades que acometem a espécie (DUANGJINDA et al., 2013).

A associação dos alelos BoLA-DRB3 com a resistência à leucose enzoótica bovina é muito descrita. Baltian et al., (2016) verificaram que no bovino Holandês, na província de La Pampa, o alelo DRB3.2*22 está associado à susceptibilidade a manifestação clínica causada pelo BLV, enquanto o alelo BoLA 3.2*11 estaria associado a resistência. Daous et al., (2021) verificaram que a resistência está atrelada à carga viral do vírus da leucose bovina (BLV).

Resistência e tolerância estão atreladas a adaptação do hospedeiro aos impactos ambientais e sua interação com as doenças mediadas por estes fatores. A resistência às doenças está ligada às variações genéticas do hospedeiro, levando à variabilidade de respostas do sistema imune (BISHOP, 2012).

A resistência é descrita como a habilidade do hospedeiro em ter algum grau de controle sobre o ciclo de vida do parasita (MULDER; RASHIDI, 2017). Ainda é descrita como o inverso da intensidade da infecção, ou seja, quanto menor a intensidade, mais resistente o hospedeiro (RABERG et al., 2009).

A tolerância é descrita como a redução ou não do desempenho em função da carga de patógenos presentes (BISHOP, 2012), sendo que animais tolerantes devem manter seu desempenho independente da carga de patógenos (MULDER; RASHIDI, 2017).

4.4 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, I.C. et al. Seroprevalence and Influence of Bovine Leukemia Virus on the Incidence of Mastitis in Dairy Herds. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, n. 1, p. 1783, 2021.
- ALTMANN, D. M.; TROWSDALE, J. Major histocompatibility complex structure and function. **Current Opinion in Immunology**, v. 2, n. 1, p. 93-98, 1989.
- ANDOH, K. et al. The chemokines CCL2 and CXCL10 produced by bovine endometrial epithelial cells induce migration of bovine B lymphocytes, contributing to transuterine transmission of BLV infection. **Veterinary Microbiology**, v. 242, n. 108598, 2020.
- BALTIAN, L. R. et al. Polimorfismos del exón 2 del gen BoLA-DRB3 asociados con resistencia/susceptibilidad a leucosis en ganado Holstein de La Pampa. **Ciência Veterinária**, v. 18, p. 9-27, 2016.
- BARLLET, P.C. et al. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 3, p. 1591-1597, 2014.
- BARROS FILHO, I.R. Seroprevalence de anticorpos para o vírus da Leucose Enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 511-515, 2010.
- BATISTA FILHO, L.C.F. et al. Performance assessment of imported ELISA in the serodiagnosis of the enzootic bovine leukosis in herds of Pernambuco state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 6, n. 1, p. 1-4, 2019.
- BEHL, J. D. et al. Characterization of genetic polymorphism of the bovine lymphocyte antigen DRB3.2 locus in Kankrej cattle (*Bos indicus*). **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 2997-3001, 2012.
- BENITEZ, O.J. et al. Lack of Bovine leukemia virus transmission during natural breeding of cattle. **Theriogenology**, v. 126, n. 1, p. 187-190, 2019.
- BENSAID, A. et al. Identification of expressed bovine class I MHC genes at two loci and demonstration of physical linkage. **Immunogenetics**, v. 33, n. 4, p. 247-254, 1991.
- BISHOP, S. C. A consideration of resistance and tolerance for ruminant nematode infections. **Frontiers in Genetics**, v. 3, p. 168, 2012.
- BJORKMAN, P. J. et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. **Nature**, v. 329, n. 6139, p. 506-512, 1987.
- BUEHRING, G.C et al. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 772, 2014.
- BUEHRING, G.C. et al. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: a case-control study. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2015.

- BURKE, M. G. et al. Nucleotide sequence and Northern analysis of a bovine major histocompatibility class II DR β -like cDNA. **Animal Genetics**, v. 22, n. 4, p. 343-352, 1991.
- CAMARGOS, M. F. et al. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine Leukemia Virus. **Virus Genes**, v. 34, n. 3, p. 343-350, 2013.
- CARILLO, H.A.M. et al. Prevalence of bovine brucellosis, paratuberculosis, enzootic leucosis, and antigen-reactive agents to bovine viral diarrhea virus in animals up to one year old. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 40, n.1, p. 485-490, 2019.
- CARNEIRO, P. A. M. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no estado do Amazonas, Brasil; **Acta Amazônica**, v. 33, n. 1, p. 111-125, 2003.
- COUSSENS, P. M.; NOBIS, W. Bioinformatics and high throughput approach to create genomic resources for the study of bovine immunobiology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 86, n. 3-4, p. 229-244, 2002.
- DAOUS, H. E. et al. Relationship between Allelic Heterozygosity in BoLA-DRB3 and Proviral Loads in Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 647, 2021.
- DAVIES, C. J. et al. Polymorphism of Bovine MHC Class II Genes. Joint Report of the Fifth International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) Workshop, Interlaken, Switzerland, 1 August 1992. **European journal of immunogenetics: Official Journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, v. 21, n. 4, p. 259-289, 1994.
- DELARMELINA, E. et al. High positivity values for bovine leukemia virus in human breast cancer cases from Minas Gerais, Brazil. **PLoS One**, v. 15, n. 10, p. e0239745, 2020.
- DUANGJINDA, M. et al. Association of BoLA-DRB3 alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 314-320, 2013.
- EMBRAPA. Gado de Leite. Coronel Pacheco, MG, novembro de 2022, 55 p.
- ERSKINE, R.J. et al. Herd level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms. **Journal of Dairy Research**, v. 79, n. 1, p. 445-450, 2012.
- FANG, F. et al. Interlaboratory and between-specimen comparisons of diagnostic tests for leptospirosis in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 1, p. 734-47, 2014.
- FRIE M.C. & COUSSENS P.M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, n.3-4, p.103-114, 2015.
- GOFF, S. P. 2013. **Retroviridae. Pages 1424-1473 in Fields Virology**. 6th ed.
- GROENEN, M. A. M. et al. Cloning of the bovine major histocompatibility complex class II genes. **Animal Genetics**, v. 20, n. 4, p. 267-278, 1989.

GUTIÉRREZ, G. et al. Natural progression of bovine leukemia virus infection in argentinean dairy cattle. **Veterinary Microbiol**, v. 151, n. 3-4, p. 255–263, 2011.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2022.

IBRAHIM, E. A. et al. Sequence-based typing-study on the relationship between subclinical mastitis and BoLA-DRB3.2 allelic polymorphism in Egyptian cows. **Global Veterinaria**, v. 9, p. 8-22, 2012.

IBRAHIM, E. A. et al. Sequence-based typing-study on the relationship between subclinical mastitis and BoLA-DRB3.2 allelic polymorphism in Egyptian cows. **Global Veterinaria**, v. 9, p. 8-22, 2012.

JAWORSKI, J.P. et al. Relationship between the level of bovine leukemia virus antibody and provirus in blood and milk of cows from a naturally infected herd. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5629-5634, 2016.

KAKINUMA, S. et al. Bovine Leukemia virus titer and leukocyte population associated with mastitis in periparturient dairy cows. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 12, n. 3, p. 239-244, 2014.

KHUDHAIR, Y.I. et al. Isolation of Bovine leukemia virus from cows with persistent lymphocytosis in Iraq. **Veterinary and Animal Science**, v.14, n. 100201, p. 1-9, 2021.

KLINTEVALL, K. et al. Bovine leukaemia virus: € rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. **Veterinary Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 191-204, 1994.

KOBAYASHI, S. et al. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 1, p.1-6, 2010.

KOHARA, J., & YOKOMIZO, Y. In vitro and in vivo effects of recombinant bovine interferon- τ on bovine leukemia virus. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 1, p. 15-19, 2007.

KUCZEWSKI, A. et al. Invited review: Bovine leukemia vírus -Transmission, control, and eradication. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n.1 p. 6358-6375, 2020.

LIMA, L. P. et al. A indústria de laticínios no Brasil – um estudo exploratório. B. CEPPA, Curitiba, v. 35, n. 1, jan./jun. 2017.

LONG, T. et al. Research progress on the pathogen and transmission pathway of epidemic bovine leukemia, **Animal Medicine Progress**, v. 6, n. 1, p. 65-68, 2004.

LUDERS, M. A. Prevalência de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina em fêmeas com mais de dois anos no Rebanho de bovinos leiteiros no Município de Mafra-SC. Lages, 2001, 30p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agroveterinária / Sanidade Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

- MA, B.Y. et al. Prevalence of bovine leukemia in 1983–2019 in China: A systematic review and meta-analysis. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, n. 104681, p. 1-14, 2021.
- MAILLARD, J. C. et al. Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles. **Animal Genetics**, v. 30, n. 3, p. 200-203, 1999.
- MARTIN, D. et al. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of Bovine leukaemia virus. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 48, n. 1, p. 97-106, 2001.
- MEIROM, R., MOOS, S., & BRENNER, J. Bovine leukemia virus-gp51 antigen expression is associated with CD5 and IgM markers on infected lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 59, n. 1-2, p. 113-119, 1997.
- MEKATA, H. et al. Cattle with a low bovine leukemia virus proviral load are rarely an infectious source. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 3, p. 157-163, 2018.
- MULDER, H. A.; RASHIDI, H. Selection on resilience improves disease resistance and tolerance to infections. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 8, p. 3346-3358, 2017.
- NAGY, D.W. et al. Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukosis virus in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 1, p. 983–985, 2003.
- NEKOU EI, O. et al. Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 133, p. 1-9, 2016.
- OIE. World Organization for Animal Health. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, 2018.
- PEREIRA, A. L. M. **Soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina Revisão de Literatura**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, 2013.
- POLAT, M.; TAKESHIMA, S.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2017.
- PORTER, V. **Cattle: A Handbook to the Breeds of the World**. London: Cristopher Helm. 1978. 400p.
- RABERG, L; GRAHAM, A. L.; READ, A.F. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1513, p. 37-49, 2009.
- RADOSTITS, et al. **Clínica Veterinária**. 9ª ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2002, p. 940-951.
- RAMÍREZ VÁSQUEZ, N. F. et al. Seroprevalence and risk factors of several bovine viral diseases in dairy farms of San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. **CES Medicina Veterinária y Zootecnia**, v. 11, n. 1, p. 15-25, 2016.

RODRÍGUEZ, S.M. et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. **Viruses**, v. 3, n. 7, p. 1210-1248, 2011.

ROUSE, J.E. **World Cattle**. University of Oklahoma Press, 1971. v.1. 485p.

RUIZ, V. et al. Bovine leukemia virus infection in neonatal calves. Risk factors and control measures. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, n.267, p. 1-7, 2018.

SAGATA, N. et al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 3, p. 677-681, 1984.

SANTOS, H. P. et al. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados á Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos da bacia leiteira do estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 351-358, 2011.

SANTOS, S. et al. Características anatomofisiológicas de adaptação de bovinos leiteiros ao ambiente tropical. **Agrotec - Agropecuária Técnica**, v. 36, n. 0100-7467, [s.d.], 2015.

SARGEANT, J.M. et al. Evaluation of a bulk-milk ELISA test for the classification of herd-level bovine leukemia virus status, **Prev. Vet. Med.** v. 31, n. 3-4, p. 223-230, 1997.

SAUSHKIN, N. Y. et al. Strip-dried blood sampling: applicability for bovine leukemia virus detection with ELISA and real-time PCR. **Journal of Virological Methods**. v. 263, n. 1, p. 101-104, 2019.

SCHWAB, A. E. et al. Association of BoLA DRB3 and DQA1 alleles with susceptibility to Neospora caninum and reproductive outcome in Quebec Holstein cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 136-140, 2009

SCOTT, H.M. et al. Seroprevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, Neospora caninum, Bovine leukemia virus, and Bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 981-991, 2006.

ŞEVIK, M. et al. An 8-year longitudinal sero epidemiological study of bovine leukaemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Turkey and analysis of risk factors associated with BLV seropositivity. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 715-720, 2015.

SHARIF, S. et al. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v. 29, n. 3, p. 185-193, 1998.

SIGURDARDOTTIR, S. et al. Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. **Animal Genetics**, v. 22, n. 3, p. 199-209, 1991.

SILVA, R. C. et al.; Ocorrência de leucose enzoótica bovina na forma de linfossarcomas no distrito federal: Relato de caso. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 75, n. 4, p. 507-512, 2008.

SPINOLA, T.R. et al. Correlação entre a atipia linfocitária e o perfil imunológico de vacas leiteiras infectadas pelo vírus da leucemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 293-300, 2013.

STAFUZZA, N. B. et al. A high resolution radiation hybrid map of the river buffalo major histocompatibility complex and comparison with BoLA. **Animal Genetics**, v. 44, p. 369-376, 2013.

SUHANDYNATA, R.T. et al. Longitudinal monitoring of SARS CoV-2 IgM and IgG seropositivity to detect COVID-19. **J. Appl. Lab. Med.** v. 5, n. 1, p. 908-920, 2020.

SUH, G. H. et al. Establishment of a bovine leukaemia virus-free dairy herd in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 6, n. 1, p. 227-230, 2005.

SUN, W. et al. *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* and bovine leukemia virus seroprevalence and associated risk factors in commercial dairy and beef cattle in northern and northeastern China. **Biomed Res. Int.** 2015:315173. <https://doi.org/10.1155/2015/315173>.

ZHOU, H. et al. Identification of allelic variation at the bovine DRA locus by polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1943-1946, 2007.

WOOLUMS, A. R. Serology in bovine infectious disease diagnosis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 39, n. 1, p. 141-155, 2023.

5 FATORES DE RISCO E PREVALÊNCIA DO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL

Resumo

A leucose enzoótica bovina é uma enfermidade cosmopolita, que causa significativas perdas econômicas em populações. Torna-se importante o entendimento acerca da prevalência do vírus em rebanhos leiteiros do estado, visando estudos para controle e prevenção da doença. Foram utilizadas amostras de sangue de 447 bovinos da raça holandesa, das seis mesorregiões do estado, sendo submetidas ao leucograma e a técnicas de PCR e ELISA. A prevalência foi de 29% (130/447) na PCR e 52% (232/447) no ELISA. Obteve-se respectivamente pelo teste de ELISA e PCR, 42% (133/316) e 28% (96/316) na região Oeste; 82% (37/45) e 16% (12/45) na Serrana; 78% (22/28) e 46% (13/28) na Sul; 100% (10/10) e 60% (6/10) na Grande Florianópolis; 43% (12/28) e 36% (10/28) no Vale do Itajaí; 90% (18/20) e 30% (6/20) no Planalto Norte. Houve leucocitose em animais do grupo Positivos Leucocíticos Linfocíticos perante ambos os testes. Observou-se neutrofilia no grupo Positivos Leucocíticos Alinfocíticos para ambos os testes. Animais positivos apresentaram leucocitose com linfocitose na PCR 35% (45/130) e ELISA 32% (74/232). Não houve alterações clínicas compatíveis com a doença. Animais acima de 4 anos tiveram maior prevalência. Propriedades com mais de 200 animais, com reposição de animais oriundos de outras propriedades, que reutilizavam seringas e agulhas, faziam mochação dos terneiros, possuíam banco de colostro e não possuíam histórico de doenças prévias ou testes confirmatórios, possuíram maior prevalência. Conclui-se a prevalência da leucose em bovinos da raça holandesa no estado de Santa Catarina é de 52% pelo ELISA e 29% pela PCR.

Palavras-chave: Vírus. Leiteiro. Mesorregiões. Linfossarcoma.

5.1 INTRODUÇÃO

O vírus da leucose bovina (BLV) é um membro do gênero Deltaretrovirus, família Retroviridae, e apresenta similaridades com o vírus T linfotrópico humano tipo 1 e 2 (AXEL, 2017). O BLV é o agente causador da leucose enzoótica bovina, doença de distribuição mundial tendo prevalência altamente variável entre os rebanhos, sendo maior em bovino leiteiro. Dos animais infectados, cerca de 30% podem desenvolver linfocitose persistente (LP) e apenas 2 a 5% poderão desenvolver manifestações clínicas de linfossarcomas (LEUZZI JR. et al., 2001).

A transmissão do BLV pode ocorrer por contato direto com animais infectados por meio de secreções e excreções, parto (transmissão vertical), insetos hematófagos (mecânica), transfusões sanguíneas, uso comunitário de agulhas e seringas em vacinações ou administração de medicamentos (horizontal), dentre outros (MATSUMURA et al., 2010).

Atualmente não existe nenhuma vacina ou tratamento eficaz contra o BLV, tornando assim necessário ser tomadas medidas de prevenção e controle, evitando a disseminação em massa dentro dos rebanhos, como o controle de insetos, uso de luvas individuais na palpação retal, desinfecção de equipamentos para procedimentos cirúrgicos, utilização de agulhas e seringas individuais, evitar o ingresso de animais infectados no rebanho e realizar um controle efetivo dos animais com diagnóstico positivo (SANTOS et al., 2011).

No cenário ideal, os animais devem ser separados totalmente em lotes infectados e livres do BLV, pois a eliminação dos animais positivos muitas vezes torna-se uma prática inviável financeiramente, principalmente para pequenos produtores ou para rebanhos com alta prevalência (LEUZZI JR. et al., 2001).

Em bovinos leiteiros, por razões econômicas, os programas de melhoramento genético dão ênfase à seleção para as características relacionadas à produção por acreditar-se que vacas com maximização de sua produção podem proporcionar maior rentabilidade à atividade leiteira (SILVA et al., 2015). Desta forma, torna-se imprescindível a importância da raça holandesa no contexto nacional, visto suas características, sendo de aptidão exclusiva para produção leiteira, sendo a raça predominante em sistemas com maior volume de animais e intensivos no Brasil (NEIVA, 2000).

O conhecimento da prevalência e resposta dos bovinos da raça holandesa frente à infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina tem sua importância para o entendimento do status sanitário desses rebanhos, uma vez que portadores assintomáticos são fonte de infecção para outros animais (FRIE; COUSSENS, 2015).

Ressalta-se a importância deste esclarecimento, visto que permitiria incorporar medidas de controle e prevenção dentro dos rebanhos, diminuindo os impactos econômicos causados pelo BLV, que podem chegar à faixa de 10% da produção (LEUZZI JR. et al., 2001).

Dados referentes à sanidade animal são fundamentais para atender às exigências de comercialização de produtos animais. Sendo assim, levantamentos epidemiológicos baseados em técnicas moleculares associadas a técnicas sorológicas fornecem dados mais precisos e confiáveis (FIDELIS JUNIOR et al., 2019).

Trabalhos que objetivaram demonstrar a prevalência do BLV no estado de Santa Catarina são escassos, apenas dois artigos são descritos, sendo o primeiro de caráter local, compreendendo apenas o município de Mafra, mesorregião Planalto Norte (LUDERS, 2011), onde se avaliou animais da raça holandesa e suas cruzas, e o segundo abrangendo quatro mesorregiões do estado, sendo elas: Serrana, Oeste, Sul e Planalto Norte (RODAKIEWICZ, 2018), abrangendo animais das raças holandesa, Jersey e mestiças leiteiras. Contudo, nenhum trabalho teve como foco apenas bovinos da raça holandesa.

Este estudo objetiva apresentar o primeiro levantamento de dados epidemiológicos da infecção pelo vírus da leucose enzoótica em bovinos da raça holandesa, no estado de Santa Catarina, Brasil, por meio de PCR e ELISA e comparar variáveis do exame físico, leucograma e fatores de risco relacionados a epidemiologia dentro das propriedades entre animais negativos e naturalmente infectados.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob protocolo número CEUA N° 3779240422 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) CAAE 60325722.6.0000.0118.

5.2.2 Obtenção das amostras e determinação do N amostral

Para a determinação da prevalência do vírus da leucose enzoótica bovina (BLV) e da soroprevalência na população de bovinos leiteiros da raça holandesa no estado de Santa Catarina, Brasil, foram utilizadas as seguintes fórmulas de acordo com a OPAS (1979):

$$n_0 = \frac{1,96^2[p(1 - p)]}{(d)^2}$$

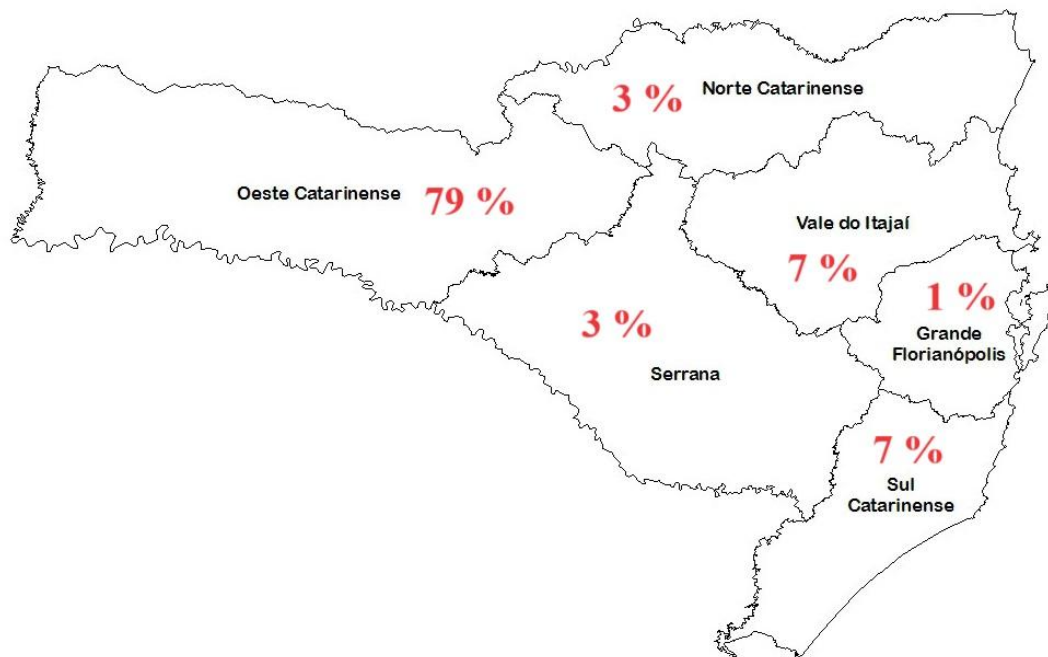
Onde n_0 é o número de amostras; “p” a prevalência esperada e “d” a margem de erro. Admitindo-se a prevalência estimada de 50% de amostras positivas, um intervalo de confiança de 95% e uma margem de erro de 5%, foi utilizado o cálculo para população infinita obtendo-se o valor de 400 animais. Para uma melhor representatividade, foram colhidas amostras de 447 animais.

O número total de bovinos leiteiros em Santa Catarina é de 2.970.000 cabeças, sendo que em cada uma das seis mesorregiões do estado o número de animais foi determinado a partir de dados consultados no IBGE Censo Agropecuário (<https://sidra.ibge.gov.br>). A partir dos cálculos obteve-se os valores percentuais e número de animais em cada uma das seis mesorregiões: Oeste 79% (n=316), Vale do Itajaí 7% (n=28), Sul 7% (n=28), Planalto Norte 3% (n=12), Serrana 3% (n=12) e Grande Florianópolis 1% (n=4) (Figura 1).

As propriedades foram selecionadas aleatoriamente, e as informações gentilmente cedidas pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC) para o contato com os proprietários.

Figura 1 - Distribuição das mesorregiões do estado de Santa Catarina, Brasil, com o percentual de animais a serem coletados para a determinação da prevalência e soroprevalência de leucose enzoótica bovina de acordo com os cálculos epidemiológicos.

MESORREGIÕES DE SANTA CATARINA



Fonte: elaborado pelo próprio autor, com base no IBGE.

5.2.3 Animais e colheita das amostras

As amostras foram colhidas entre setembro de 2022 e fevereiro de 2023. Foram colhidas amostras de sangue de 447 bovinos da raça holandesa, registradas na Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça holandesa (HO) ou que possuíam pelo menos cinco gerações conhecidas em sua genealogia, sendo fêmeas em lactação, acima de dois anos de idade, oriundas de 27 propriedades produtoras de leite, tendo como critério de seleção ter acima de 100 vacas em lactação, e que aceitaram participar do projeto de pesquisa. As propriedades foram selecionadas aleatoriamente nas seis mesorregiões do estado de Santa Catarina, sendo Oeste: nos municípios de Tangará (latitude 27°06'17" sul e longitude 51°14'50" oeste), Ouro (latitude 27°19'49" sul e longitude 51°35'53" oeste), Luzerna (latitude 27°07'58" sul e longitude 51°28'02" oeste), Água Doce (latitude 26°59'52" sul e longitude 51°33'22" oeste), Ibicaré (latitude 27°05'31" sul e longitude 51°21'54" oeste), Herval D'Oeste (latitude 27°11'37" sul e longitude 51°29'41" oeste), Treze Tílias (latitude 26°59'44" sul e longitude 51°24'49" oeste), Capinzal (latitude 27°20'37" sul e longitude 51°36'43" oeste), Concórdia (latitude 27°14'3" sul e longitude 52°1'43" oeste) e Fraiburgo (latitude 27°1'36" sul e longitude 50°55'19" oeste) (n=316); Serrana: Campos Novos (latitude 27°24'7" sul e longitude 51°13'33" oeste) (n=45); Planalto Norte: Major Vieira (latitude 26°22'04" sul e longitude 50°19'41" oeste) e Papanduva (latitude 26°22'13" sul e longitude 50°08'40" oeste)

(n=20); Grande Florianópolis: Governador Celso Ramos (latitude 27°18'53" sul e longitude 48°33'33" oeste) (n=10); Vale do Itajaí: Ituporanga (latitude 27°25'30" sul e longitude 49°36'4" oeste) e Rio do Oeste (latitude 27°11' 33,76" sul e longitude 49°47'48,36" oeste (n=28); Sul: Lauro Muller (latitude 28°23'45" sul e longitude 49°23'46" oeste) e Braço do Norte (latitude 28°17'1" sul e longitude 49°9'31" oeste) (n=28). A colheita foi realizada por venopunção da veia jugular externa, sendo utilizados tubos de coleta à vácuo com e sem anticoagulante EDTA a 10% para realização do leucograma, concentração de proteína total e fibrinogênio plasmático. As amostras de sangue em EDTA foram congeladas a -20 C° até a extração do DNA e realização da PCR. O soro foi separado e congelado até a realização da sorologia por meio da técnica de ELISA.

5.2.4 Exame Físico

O exame físico foi empregado para a verificação de sinais clínicos compatíveis com a doença clínica, onde aferiu-se a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal, movimentos ruminais (MR), inspeção da coloração das mucosas e palpação de linfonodos (pré-escapular, pré-crural e mandibulares) (FEITOSA, 2004).

5.2.5 Leucograma, proteína total e fibrinogênio plasmático

Para as contagens de leucócitos totais, utilizou-se contador automático de células (SDH3 Labtest). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio da análise microscópica de esfregaços sanguíneos corados com corantes do tipo Romanowsky (Panótico Rápido) (JAIN, 1993). A concentração da proteína total plasmática foi determinada por refratometria (ATAGO) e a concentração do fibrinogênio plasmático pelo método de precipitação pelo calor seguida por leitura em refratômetro (JAIN, 1993).

Os animais foram subdivididos em três grupos de acordo com os resultados dos testes de ELISA e PCR e dos leucogramas. Grupo negativo: animais negativos para a BLV sem alterações hematológicas; Grupo Positivos sem Leucocitose: positivos para vírus da leucose bovina sem alterações hematológicas; Grupo Positivos Leucocíticos Alinfocíticos: positivos sem linfocitose; Grupo Positivos Leucocíticos Linfocíticos: contagem total de leucócitos superior a $15 \times 10^3/\mu\text{L}$ e de linfócitos superior a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Brenner, Avidar e Lahav 2007).

5.2.6 Extração, purificação, quantificação e diluição de ácidos nucleicos.

Os ácidos nucleicos foram extraídos com o kit comercial para extração de DNA genômico ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega®), conforme instruções do fabricante. Após extração e purificação, o DNA obtido foi eluído em 100µL de água nuclease free comercial, e quantificado por espectrofotometria com Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific®). As amostras foram diluídas para que todas apresentassem na concentração padrão de 30ng/µL de DNA em alíquota com 20µL totais. Para tanto, a fórmula de diluição foi utilizada $C1.V1=C2.V2$ ($C1$ é a concentração inicial da amostra mensurada, $V1$ o volume em microlitros a ser retirado da amostra inicial, $C2$ a concentração pretendida de 30ng/µL e $V2$ o volume de água livre de nuclease em microlitros a ser adicionada na alíquota para que o volume total fosse de 20µL).

5.2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A infecção por BLV pode ser confirmada por meio da detecção do gene *env* do provírus, que possui 440 pares de base e está localizado na posição 5029-5468 do genoma viral. A reação de PCR foi calculada por meio de fator de diluição para amostras com concentração de DNA entre 20 e 50µL, e era composta por 1X Green GoTaq Flexi Buffer, 25mM de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), mix de nucleotídeos (adenina, citosina, guanina e timina) 2mM cada, 8,5 pmol de primers OBLV1A (5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATACA-3') e OBLV6A (5'-CCAACATATAGCACAGTCTGGGAAGGC-3'), 3µL de template de DNA e água livre de nuclease para completar o volume final da reação de 25µL, adicionada em microtubos do tipo Eppendorf de 200µL.

A amplificação foi conduzida em termociclador (Veriti 96 well Thermal Cycler - Applied Biosystems by Thermofisher®) conforme protocolo da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), e as amostras passaram por um ciclo de cinco minutos a 94°C, cinco ciclos a 94°C por quarenta e cinco segundos, 60°C por sessenta segundos e 72°C por noventa segundos, trinta e cinco ciclos de 94°C por quarenta e cinco segundos, 59°C por sessenta segundos e 72°C por noventa segundos. A última etapa da PCR foi um ciclo de 72°C por sete minutos, seguido de holding de 4°C.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese com 100V e 400mA por 50 minutos, em gel de agarose 1,5%. Foram utilizados 9µL de amostra marcadas com 1µL de GelRed® nucleic acid gel stain 2X (Uniscience). O marcador molecular utilizado foi 100pb

DNA Ladder corado com 6X Blue/Orange Loading Dye (Promega®). O gel foi visualizado em transiluminador L-Pix EX (Loccus®).

5.2.8 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O teste de ELISA foi realizado utilizando o kit comercial ELISA CHEKIT-Leucose (IDEXX®), seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. As leituras da microplaca foram realizadas em um leitor Thermo® Multiskan, equipado com um filtro de 450 nm.

5.2.9 Questionário Epidemiológico

Para a obtenção dos fatores de risco foi aplicado um questionário epidemiológico aos proprietários, envolvendo informações sobre os animais e a propriedade.

5.2.10 Análise Estatística

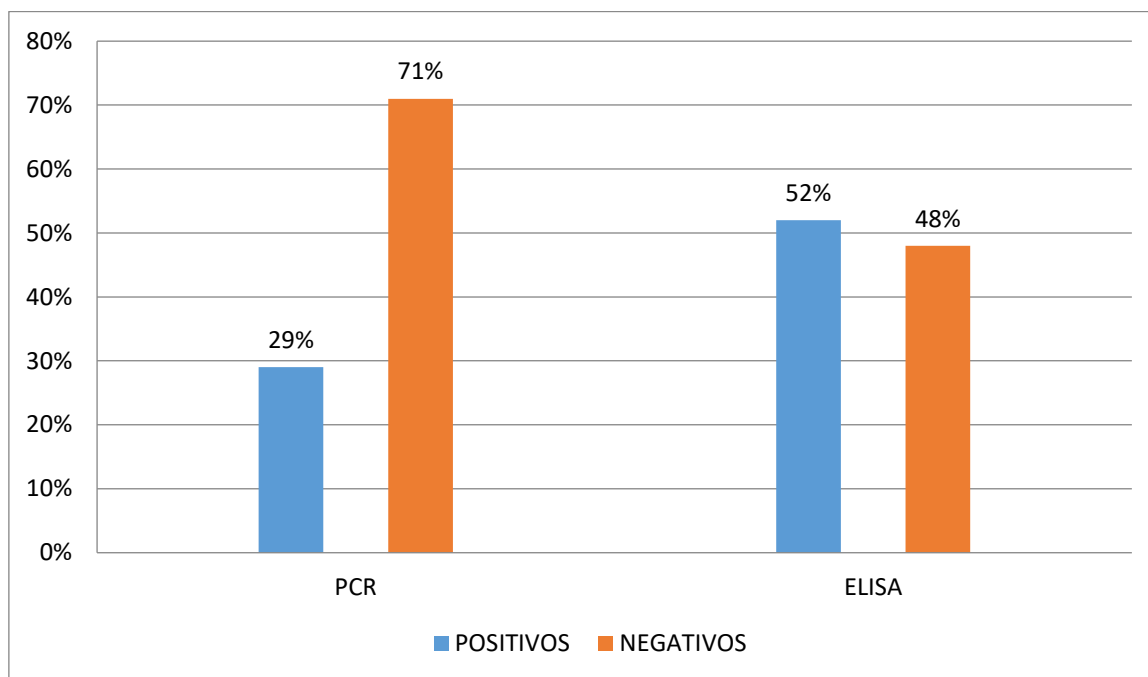
A análise estatística dos dados foi realizada pela análise de variância (ANOVA), para as variáveis clínicas e hematológicas. A análise univariada foi realizada para verificar a associação entre o status do rebanho para a LEB e os fatores de risco, utilizando o teste de qui-quadrado, seguido por análise de regressão logística ($P < 0,05$).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Prevalência e Soroprevalência

A prevalência de infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina foi de 29% (130/447) pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a soroprevalência de 52% (232/447) pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (Figura 2).

Figura 2 – Prevalência (%) e soroprevalência (%) do vírus da leucose enzoótica bovina em 447 bovinos da raça holandesa, pelas técnicas de PCR e ELISA, no estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Divisão das mesorregiões, município, identificação da propriedade, número de vacas adultas presentes na propriedade, número de animais coletados, número de amostras positivas pelo teste da PCR e número de amostras positivas pelo teste de ELISA, respectivamente (Tabela 1).

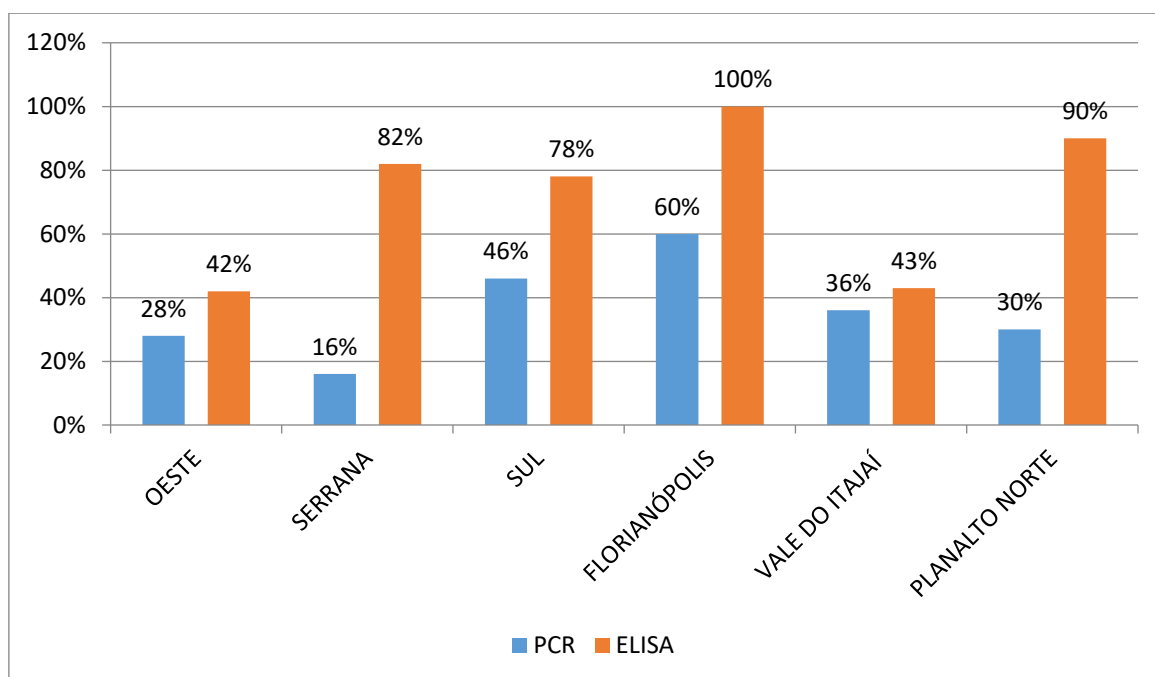
Tabela 1 - Mesorregiões, municípios, identificação da propriedade, número de vacas adultas presentes na propriedade, número de animais coletados, número de amostras positivas pelo teste da PCR e ELISA, respectivamente, de 477 bovinos da raça holandesa no estado de Santa Catarina, Brasil.

Mesorregião	Municípios	Identificação da propriedade	Nº total de animais	Nº de animais coletados (447)	Positivos PCR	Positivos ELISA
Oeste	Tangará	1	198	20	7	13
		10	153	20	14	20
	Ouro	2	102	10	4	7
		8	180	20	7	8
	Luzerna	3	196	20	0	0
		4	147	20	0	8
	Água Doce	6	171	10	0	1
		11	122	20	1	2
		13	170	20	2	2
		20	112	15	1	0
	Ibicaré	7	168	20	11	15
		9	99	15	5	8
	Herval D'Oeste	12	114	19	9	15
	Treze Tilias	15	107	20	0	1
		16	185	20	10	12
Serrana	Capinzal	19	101	15	1	3
	Concórdia	21	126	17	13	13
	Fraiburgo	22	98	15	3	5
	Campos Novos	5	98	10	4	10
		14	345	35	3	27
	Major Vieira	17	102	10	3	9
	Papanduva	18	107	10	3	9
	Ituporanga	23	106	15	4	0
	Vale do Itajaí	24	116	13	6	12
		25	101	10	6	10
Grande Florianópolis	Gov. Celso Ramos	26	112	15	9	13
	Lauro Muller	27	95	13	4	9
	Braço do Norte					

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A prevalência e soroprevalência de acordo com a mesorregião, foi na região Oeste 28% (88/316) e 42% (133/316); região Serrana 16% (7/45) e 82% (37/45); na região Sul 46% (13/28) e 78% (22/28); região da Grande Florianópolis 60% (6/10) e 100% (10/10); Vale do Itajaí 36% (10/28) e 43% (12/28); e no Planalto Norte, 30% (6/20) e 90% (18/20) pelas técnicas de PCR e ELISA, respectivamente(Figura 3).

Figura 3 - Prevalência e soroprevalência da leucose enzoótica bovina (BLV) em 447 bovinos da raça holandesa, pelas técnicas de PCR e ELISA, nas diferentes mesorregiões do estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborado pelo próprio autor

5.3.2 Leucograma

O leucograma em animais submetidos ao teste da PCR e ELISA, houve diferença no número de leucócitos totais, sendo maior em animais Positivos Leucocítos Linfocíticos, porém, animais negativos pelo teste da PCR apresentaram contagem de leucócitos da mesma forma aumentados, tendo como referência a espécie bovina (JAIN, 1993).

A contagem de segmentados foi maior que os valores de referência para a espécie em todos os grupos (neutrofilia), havendo diferença, sendo maior em animais Positivos Leucocítos Alinfocíticos perante ambos os testes. Leucocitose com Linfocitose foi observada em animais positivos, havendo diferença nos animais negativos, em ambos os testes. A contagem de monócitos apresentou diferença entre os grupos, porém, manteve-se dentro dos valores de referência em ambos os testes (JAIN, 1993) (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Valores de média e desvios-padrão ($x \pm dp$) do leucograma, número total de leucócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos de 447 bovinos da raça holandesa positivos e negativos para leucose enzoótica bovina por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Variáveis	Negativos (n=317)	Positivos Sem Leucocitose (n=72)	Positivos Leucocíticos Alinfocíticos (n=13)	Positivos Leucocíticos Linfocíticos (n=45)
Leucócitos ($x10^3/\mu\text{L}$)	12,47 \pm 5,88 ^b	10,71 \pm 2,53 ^b	16,96 \pm 2,07 ^c	25,63 \pm 9,65 ^a
Bastonetes ($x10^3/\mu\text{L}$)	0,00 \pm 0,01 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a
Segmentados ($x10^3/\mu\text{L}$)	5,03 \pm 2,06 ^b	4,54 \pm 1,75 ^b	8,52 \pm 2,46 ^a	4,83 \pm 1,75 ^b
Linfócitos ($x10^3/\mu\text{L}$)	6,44 \pm 5,61 ^b	5,42 \pm 2,02 ^b	6,95 \pm 2,59 ^b	19,59 \pm 9,42 ^a
Monócitos ($x10^3/\mu\text{L}$)	0,37 \pm 0,28 ^b	0,32 \pm 0,24 ^b	0,57 \pm 0,51 ^{bc}	0,62 \pm 0,47 ^{ac}
Eosinófilos ($x10^3/\mu\text{L}$)	0,50 \pm 0,59 ^a	0,39 \pm 0,39 ^a	0,82 \pm 0,88 ^a	0,52 \pm 0,47 ^a
Basófilos ($x10^3/\mu\text{L}$)	0,05 \pm 0,10 ^a	0,04 \pm 0,08 ^a	0,09 \pm 0,13 ^a	0,06 \pm 0,22 ^a

Para letras iguais entre grupos não há diferença significativa com $P < 0,05$.

Teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Jamovi.

The jamovi project (2022). jamovi. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

Tabela 3 - Valores de média e desvios-padrão ($x \pm dp$) do leucograma, número total de leucócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos de 447 bovinos da raça holandesa positivos e negativos para leucose enzoótica bovina por meio do teste de ELISA.

Variáveis	Negativos (n=217)	Positivos Sem Leucocitose (n=134)	Positivos Leucocíticos Alinfocíticos (n=27)	Positivos Leucocíticos Linfocíticos (n=74)
Leucócitos ($x10^3/\mu\text{L}$)	11,08 \pm 3,16 ^c	10,91 \pm 2,43 ^c	16,82 \pm 1,65 ^b	25,30 \pm 10,44 ^a
Bastonetes ($x10^3/\mu\text{L}$)	0,00 \pm 0,01 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a
Segmentados ($x10^3/\mu\text{L}$)	5,00 \pm 2,04 ^a	4,71 \pm 1,66 ^a	8,10 \pm 2,93 ^b	4,66 \pm 1,74 ^a
Linfócitos ($x10^3/\mu\text{L}$)	5,14 \pm 2,27 ^c	5,28 \pm 2,07 ^c	7,33 \pm 2,23 ^b	19,49 \pm 10,26 ^a
Monócitos ($x10^3/\mu\text{L}$)	0,37 \pm 0,29 ^b	0,32 \pm 0,23 ^b	0,46 \pm 0,32 ^{ab}	0,57 \pm 0,43 ^a
Eosinófilos ($x10^3/\mu\text{L}$)	0,49 \pm 0,53 ^a	0,45 \pm 0,58 ^a	0,76 \pm 0,85 ^a	0,52 \pm 0,51 ^a
Basófilos ($x10^3/\mu\text{L}$)	0,05 \pm 0,09 ^a	0,05 \pm 0,09 ^a	0,06 \pm 0,10 ^a	0,06 \pm 0,20 ^a

Para letras iguais entre grupos não há diferença significativa com $P < 0,05$.

Teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Jamovi.

The jamovi project (2022). jamovi. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

Percentual de animais de cada teste PCR e ELISA, negativos e positivos, onde dentro dos animais positivos, para cada teste, observa-se o percentual de acordo com o grupo de avaliação hematológica: positivos sem leucocitose, positivos com leucocitose alinfocíticos, e positivos com leucocitose e linfocitose (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores percentuais (%) do número de animais de acordo com os grupos negativos, positivos sem leucocitose, positivos leucocítico alinfocíticos e positivos leucocíticos linfocíticos de 447 bovinos da raça holandesa para leucose enzootica bovina por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e por meio do teste de ELISA no estado de Santa Catarina, Brasil.

Testes	Negativos (%)	Positivos (%)	Positivos Sem Leucocitose (%)	Positivos Leucocíticos Alinfocíticos (%)	Positivos Leucocíticos Linfocíticos (%)
PCR	71% (317/447)	29% (130/447)	55% (72/130)	10% (13/130)	35% (45/130)
ELISA	49% (217/447)	52% (230/447)	58% (133/230)	11% (25/230)	31% (72/230)

5.3.3 Exame Físico

Houve diferença na temperatura em animais avaliados pela técnica da PCR, sendo maior em animais Positivos Leucocíticos Linfocíticos (Tabela 5). O mesmo comportamento de diferença na temperatura foi observado em animais avaliados pela técnica de ELISA, porém nestes, sendo maior em animais Positivos sem Linfocitose (Tabela 6). Mesmo havendo diferença entre os grupos, todos os resultados apresentaram-se dentro dos valores de referência para a espécie bovina (ROBINSON, 1999).

Tabela 5 - Valores do exame físico (média±desvio padrão) de 447 bovinos da raça holandesa, negativos ou positivos para a infecção natural pelo vírus da leucose enzoótica bovina, determinados pela técnica de PCR.

Variáveis	Negativos (n=317)	Positivos Sem Leucocitose (n=72)	Positivos Leucocíticos Alinfocíticos (n=13)	Positivos Leucocíticos Linfocíticos (n=45)
Frequência Cardíaca (bat/min)	91,12±13,80 ^a	90,83±13,19 ^a	87,69±14,47 ^a	90,20±11,38 ^a
Frequência Respiratória (mov/min)	60,78±22,99 ^a	65,81±22,00 ^a	61,85±22,63 ^a	61,29±19,17 ^a
Movimentos Ruminais (mov/2min)	2,27±0,73 ^a	2,22±0,77 ^a	2,08±1,04 ^a	2,13±0,66 ^a
Temperatura (°C)	38,86±2,10 ^b	39,17±0,55 ^{bc}	39,18±0,60 ^{bc}	39,29±0,59 ^{ac}

Para letras iguais entre grupos não há diferença significativa com $P < 0,05$.

Teste de Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas seguido do Teste de comparações múltipla Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

Jamovi.

The jamovi project (2022). jamovi. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

Tabela 6 - Valores do exame físico (média±desvio padrão) de 447 bovinos da raça holandesa, categorizados como negativos ou positivos para infecção natural pelo vírus da leucose enzoótica bovina, determinados pela técnica de ELISA.

Variáveis	Negativos (n=217)	Positivos Sem Leucocitose (n=133)	Positivos Leucocíticos Alinfocíticos (n=25)	Positivos Leucocíticos Linfocíticos (n=72)
Frequência Cardíaca (bat/min)	90,06±13,07 ^a	91,50±13,05 ^a	92,52±15,27 ^a	92,22±11,57 ^a
Frequência Respiratória (mov/min)	60,69±22,89 ^a	61,78±21,74 ^a	63,08±25,25 ^a	63,88±21,73 ^a
Movimentos Ruminais (mov/2min)	2,26±0,75 ^a	2,28±0,74 ^a	2,08±0,76 ^a	2,18±0,72 ^a
Temperatura (°C)	38,93±0,63 ^b	39,12±0,67 ^{ac}	39,02±0,50 ^{bcd}	38,74±4,27 ^{ad}

Para letras iguais entre grupos não há diferença significativa com $P < 0,05$.

Teste de Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas seguido do Teste de comparações múltipla Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

Jamovi.

The jamovi project (2022). jamovi. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

5.3.4 Idade

A idade no dia da coleta foi correlacionada com a prevalência de infecção natural pelo vírus da leucose bovina, onde entre os animais submetidos ao teste de PCR, não houve diferença entre os grupos (Tabela 7). Nos animais avaliados pela técnica de ELISA, o grupo com idade acima de 4 anos possuiu maior prevalência de infecção pelo BLV (Tabela 8).

Tabela 7 – Número total e valores percentuais (%) de animais de acordo com a idade no dia da coleta, dentre os grupos positivos e negativos para leucose enzoótica bovina de 447 bovinos da raça holandesa por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) no estado de Santa Catarina, Brasil.

Grupos/Idades		PCR		
		Negativo	Positivo	Total
Primíparas (2 anos)	FO	26	6	32
	Fe	22.7	9.31	32.0
	%	81.3	18.8	100.0
Secundíparas (3 anos)	FO	46	16	52
	Fe	44.0	18.03	52.0
	%	74.2	25.8	100.0
Múltíparas (≥4 anos)	FO	245	108	353
	Fe	250.3	102.66	353.0
	%	69.4 %	30.6	100.0
Total	FO	317	130	447
	Fe	317.0	130.0	447.0
	%	70.9	29.1	100.0

Teste Qui Quadrado (P=0.306). Jamovi.

The jamovi project (2022). jamovi. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

Tabela 8 - Número total e valores percentuais (%) de animais de acordo com a idade no dia da coleta, dentre os grupos positivos e negativos para leucose enzoótica bovina de 447 bovinos da raça holandesa por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) no estado de Santa Catarina, Brasil.

Grupos/Idades		ELISA		
		Negativo	Positivo	Total
Primíparas (2 anos)	FO	17	15	32
	Fe	15.4	16.6	32.0
	%	53.1%	46.9%	100.0%
Secundíparas (3 anos)	FO	41	21	62
	Fe	29.8	32.2	62.0
	%	66.1%	33.9%	100.0%
Multíparas (≥4 anos)	FO	157	196	353
	Fe	169.8	183.2	353.0
	%	44.5%	55.5%	100.0%
Total	FO	215	232	447
	Fe	215.0	232.0	447.0
	%	48.1%	51.9%	100.0%

Teste Qui-quadrado (P=0.006). Jamovi.

The jamovi project (2022). jamovi. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

5.3.5 Fatores de Risco

As variáveis dos fatores de risco estão representados na Tabela 9. Com relação ao número de animais presentes na propriedade, maior positividade foi evidenciada quando a mesma possuía acima de 200 animais. Com relação ao método de reposição, propriedades que realizavam sua reposição com animais oriundos de plantéis externos, possuíram maior positividade ao vírus da LEB, em relação às que faziam reposição com animais do próprio rebanho.

Analizando haver presença de histórico de BLV, bem como da realização de testes diagnósticos prévios, maior positividade foi encontrada em rebanhos que não possuíam histórico ou diagnóstico algum.

Propriedades que reaproveitavam seringas e agulhas, sem realização de descarte ou higienização, apresentaram elevada positividade em relação aos locais que o descarte ou higienização eram realizados. Da mesma forma, onde era realizada a mochação de bezerros, maior positividade foi encontrada.

Onde existia banco de colostro, houve um maior número de animais positivos. Quando analisado histórico da presença de doenças prévias nos rebanhos, maior positividade foi evidenciada em rebanhos sem histórico de doenças.

Tabela 9 - Fatores de risco avaliada por meio de questionário epidemiológico e sua associação entre animais positivos e negativos para a infecção natural pelo vírus da leucose enzoótica bovina, por meio do teste de ELISA, em bovinos leiteiros da raça holandesa, no estado de Santa Catarina, Brasil.

	Infecção por VBL				
Variáveis	Positivo		Negativo		p
	N	%	N	%	
Número de animais na propriedade					0,0085
50-100 (Ref)	36	8,1	12	2,7	
101-200	89	19,9	95	21,3	
>200	107	23,9	108	24,2	
Método de reposição					0.0054
Do próprio rebanho	101	22,6	120	26,8	
Do próprio rebanho e compra de outros	131	29,3	95	21,3	
Histórico de LEB					0.0176
Presente	10	2,2	24	5,4	
Ausente	222	49,7	191	42,7	
Higienização/descarte de agulhas e seringas entre a vermifugação dos animais					0.0291
Presente	39	8,7	21	4,7	
Ausente	193	43,2	194	43,4	
Transferência de embriões					0.0028
Presente	83	18,6	105	23,5	
Ausente	149	33,3	110	24,6	
Banco de leite/colostró					0.0195
Presente	143	32	107	23,9	
Ausente	89	19,9	108	24,2	
Mochação em bezerros					0,034
Presente	162	36,2	169	37,8	
Ausente	70	15,7	46	10,3	
Histórico de testes diagnósticos para LEB					0,012
Presente	11	2,5	24	5,4	
Ausente	221	49,4	191	42,7	
Doenças prévias					<0,001
Problemas respiratórios	9	2	4	0,9	
Problemas reprodutivos	13	2,9	2	0,4	
Vários problemas concomitantes (Ref)	0	0	15	3,4	
Outro	5	1,1	10	2,2	
Não possui histórico de outras doenças	205	45,9	184	41,2	

Teste Qui Quadrado (p<0,05).

5.4 DISCUSSÃO

De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de prevalência e soroprevalência do vírus da leucose enzoótica bovina (BLV), utilizando duas técnicas de diagnóstico como a PCR e o ELISA, na raça holandesa, no estado de Santa Catarina, Brasil. Na literatura consultada, existem apenas dois artigos avaliando a prevalência no estado de Santa Catarina em bovinos leiteiros, porém, um deles sendo de cunho local, abrangendo apenas o município de Mafra, compondo animais da raça holandesa e suas cruzas (LUDERS, 2001); e o segundo abrangendo apenas quatro das seis mesorregiões, incluindo no estudo animais das raças holandesa, Jersey, e mestiças leiteiras (RODAKIEWICZ et al., 2018).

Os dados epidemiológicos encontrados para esta população revelaram grande divergência entre os dados obtidos em estudos anteriores. A prevalência no estado, por meio de sorologia pela técnica de ELISA compreendeu 52% (232/447), muito acima do encontrado por Luders (2001), onde a prevalência de infecção no município de Mafra, utilizando sorologia por meio do teste IDGA foi de 7,9%. Levando em consideração que o município de Mafra localiza-se na Mesorregião do Planalto Norte, grande divergência entre os estudos também foi observada, onde encontramos prevalência nesta mesorregião, de 90% (18/20) de animais infectados, por meio da técnica de ELISA. Devido à ausência de informações sobre as características relacionadas aos animais e a própria propriedade no estudo prévio realizado em Mafra, se torna impossível definir ou apontar alguma possível causa para essa discrepância entre resultados.

Rodakiewicz (2018) observaram pela técnica de Imunodifusão em Ágar Gel (IGDA) em animais de quatro mesorregiões do estado (Serrana, Sul, Oeste e Planalto Norte) com prevalência de 42%, estando próximo aos 52% (232/447) observados neste trabalho. Vale ressaltar que o modelo de teste sorológico utilizado em ambos os trabalhos mencionados foi outro, sendo o IDGA. Brenner, Moss e Moalem (1994) apontaram maior sensibilidade para detecção de anticorpos por meio do teste de ELISA, comparado ao teste de IDGA, podendo ser um fator a ter contribuído nessa diferença significativa entre os resultados obtidos.

Nosso trabalho utilizou a técnica de ELISA, teste esse empregado em grande escala nos últimos 10 anos, para diagnóstico e adoção de medidas de controle dentro das propriedades, sendo indicado pela OIE. Por sua vez, Pereira (2013) apontou que o IDGA é o teste padrão para diagnóstico de BLV. O ELISA detecta anticorpos circulantes, ou seja, detecta a infecção crônica, pressupondo-se que o animal teve contato com o agente em algum

momento, e mantendo titulações mínimas detectáveis, podendo ser diagnosticado por toda a sua vida (GUTIÉRREZ et al., 2012).

Por outro lado, comparando os resultados com o trabalho anteriormente mencionado, houve similaridade entre os resultados encontrados pela técnica molecular da PCR, muito próximo dos 29% (130/447) encontrados em nosso trabalho, onde Rodakiewicz et al., (2018) encontraram prevalência de 80% por esta técnica, em animais previamente detectados como soropositivos, gerando um resultado aproximado de 33% de positividade avaliando a população como um todo. Testes moleculares, como a PCR, identificam a presença do agente, pressupondo infecção ativa (FIDELIS JUNIOR et al., 2019).

Comparando os resultados encontrados nas diferentes mesorregiões, entre os estudos consultados, no estado de Santa Catarina, nenhum deles teve concordância com o encontrado em nosso trabalho. Outro ponto importante a ser mencionado, é que resultados maiores de prevalência podem ser encontrados por testes moleculares (PCR), comparado às técnicas sorológicas como o ELISA (LEE et al., 2016), indo ao desencontro do observado no estudo em questão.

Maior prevalência observada por PCR, em relação aos testes sorológicos, pode estar atribuída a soroconversão tardia, não sendo possível detectar titulações mensuráveis por sorologia em animais com pouco tempo de exposição ao vírus (LEE et al., 2016). Por outro lado, resultados maiores encontrados por técnicas sorológicas como o ELISA, podem indicar que as titulações se apresentam elevadas, aumentando a detecção e confiabilidade, pressupondo-se infecção crônica. Outro ponto importante, comparando resultados sorológicos maiores que em testes moleculares como a PCR, é que animais com uma carga de DNA proviral baixa, muitas vezes acabam sendo imperceptíveis de serem detectados pelas técnicas moleculares (KLINTEVALL et al., 1994).

Os métodos de análises moleculares (PCR) e sorológicos (ELISA) normalmente apresentam elevada concordância (MC HUGH, 2012), porém, quando há divergências, a complementaridade entre os testes é de suma importância, principalmente para detectar a presença do agente em animais imunossuprimidos ou com títulos baixos de anticorpos (OIE, 2018; Fidelis Junior 2019).

Animais positivos para o BLV, comumente apresentam linfocitose (BIRGEL JUNIOR et al., 2006), corroborando com os achados encontrados perante a avaliação do leucograma, onde 32% (74/232) e 35% (45/130) de animais apresentaram leucocitose com linfocitose, em animais positivos pelas técnicas de ELISA e PCR, respectivamente, concordando com a descrição de que aproximadamente 30% dos animais infectados, apresentarão linfocitose

durante a avaliação hematológica (SPINOLA et al., 2013). A linfocitose pode estar associada à uma resposta a excitação ou a presença de uma leucemia linfocítica. Em bovinos infectados pelo BLV, a presença de linfocitose é um achado comum, sendo considerada quando há contagem de linfócitos superior a 7.500 células/ μ L (HIRSH; LEITE, 2016).

A presença de leucocitose associada à neutrofilia, ou apenas a neutrofilia, como encontrado tanto em animais negativos, como positivos no presente estudo, pode ser indicativo de processo inflamatório, podendo ser observada em alguns casos, como uma resposta à excitação, quando não associada a alterações na contagem de bastonetes. Porém, como o fibrinogênio permaneceu dentro dos valores de referência para a espécie, à teoria de processo inflamatório não se confirma. Essa neutrofilia encontrada pode ser justificada nos bovinos em questão, devido a excitação pelo manejo no momento da coleta, gerando certo estresse nos animais (WEISER, 2006).

A diferença de temperatura retal encontrada entre os grupos, mesmo que permanecendo dentro dos valores de referência para a espécie holandesa (ROBINSON, 1999) não foi passível de correlação entre a presença ou ausência do vírus da leucose bovina, visto que as coletas foram realizadas entre as estações de primavera e verão (setembro à março), havendo assim, aumento da temperatura ambiente nesse período, impactando diretamente na elevação de temperatura corporal. O estresse calórico em bovinos leiteiros aumenta à medida que a relação umidade relativa e temperatura ambiente ultrapassa a zona de conforto térmico, dificultando a dissipação de calor, que por fim acaba elevando a temperatura corporal (FERREIRA et al., 2006).

Animais acima de 48 meses de idade possuíram maior sororreatividade ao agente etiológico. Mesmo sabendo que a contaminação pelo vírus da leucose bovina pode acontecer em qualquer fase de desenvolvimento do indivíduo, inclusive na fase embrionária ou logo após o nascimento (RAMALHO et al., 2020), a diferença encontrada na idade dos animais positivos por meio do teste de ELISA foi de acordo com as literaturas consultadas (JULIANO et al., 2014; WOA, 2021). O teste sorológico de ELISA detecta anticorpos circulantes, ou seja, pressupõe-se que o animal teve contato com o agente etiológico em algum momento da sua vida ou que possui infecção crônica, como é o caso do BLV, aumentando a positividade em testes sorológicos com o aumento da idade dos animais (FIDELIS JUNIOR et al., 2019).

Trabalhos demonstram que as regiões geográficas possuem diferentes prevalências para o vírus da LEB (NEKOUËI et al., 2015). Nosso trabalho demonstrou maior positividade na mesorregião da Grande Florianópolis, chegando a 100% por meio de teste sorológico (ELISA) e 60% por meio de teste molecular (PCR). Esses resultados são discrepantes dos

encontrados por Rodakiewicz et al. (2018), uma vez que a região de maior prevalência no estado de Santa Catarina por meio de teste sorológico (IDGA) foi a Serrana (68,3%) e a maior prevalência por meio da PCR foi na mesorregião do Planalto Norte (100%). Cabe aqui ressaltar, que no trabalho mencionado, a mesorregião da Grande Florianópolis não foi incluída, não havendo como comparar os resultados obtidos.

Como observado por meio do questionário epidemiológico, propriedades que possuíam mais que 200 animais no rebanho, tenderam a ter maior positividade. Vale ressaltar que essas propriedades maiores, possuíam sistemas de criação de confinamento (free-stal / compost-barn), aumentando o contato direto entre os animais, elevando as infecções interpopulacionais, concordando com os achados de Nekouei et al. (2015). Da mesma forma, essas propriedades na sua grande maioria, não adotavam medidas de descarte ou higienização de seringas e agulhas, compartilhando as mesmas entre os animais, sendo um fator predisponente para a disseminação do vírus dentro do rebanho (KOBAYASHI et al., 2015).

Quando o método de reposição era por meio de bovinos oriundos de outras granjas ou fazendas, maior positividade foi encontrada. Como essa reposição era realizada sem prévia investigação da presença do agente nestes animais, ou seja, sem a realização de testes diagnósticos prévios, grande chance de introdução de animais positivos, sem a consciência dos produtores, pode estar envolvida na disseminação do vírus (SUNN et al., 2015).

A mochação dos bezerros (as) nas propriedades esteve diretamente envolvida com maior prevalência do vírus dentro do rebanho. Formas de transmissão iatrogênicas, como a utilização de utensílios para a realização desses procedimentos, que transferem sangue entre os bovinos, contribuem diretamente para a disseminação da infecção (BENÍTEZ et al., 2019). O banco de colostro é uma ferramenta muito eficaz para evitar disseminação de patógenos na fase neonatal. Estudos mostram que a utilização de colostro de vacas positivas para o BLV, possui correlação com a disseminação para os bezerros (NUNES et al., 2024). Nossa pesquisa demonstrou que locais onde havia banco de colostro, possuiu maior positividade. Na sua grande maioria, esse colostro era por meio de colostro em pó comercial, onde o mesmo passa por processos de esterilização, desta forma, não sendo possível a realização de correlação entre animais positivos e negativos, utilizando este produto.

Quando analisamos a presença de doenças prévias, bem como sinais clínicos compatíveis com a presença da doença clínica, e a realização prévia de testes diagnósticos, maior positividade foi encontrada em propriedades que não possuíam histórico algum. Provavelmente, isso se deve ao fato da presença do agente, na maioria dos casos, se

manifestar na forma subclínica, onde apenas 2 a 5% dos animais tende a manifestar algum grau de sinais clínicos compatíveis (LEUZZI JUNIOR et al., 2001; BENITEZ et al, 2019)

5.5 CONCLUSÃO

A prevalência da leucose enzoótica bovina foi de 29% na PCR e 52% no ELISA em bovinos da raça holandesa no estado de Santa Catarina, Brasil sendo a mesorregião com maior prevalência a Grande Florianópolis (60% PCR; ELISA, 100%). Leucocitose com linfocitose foi observada em 35% dos animais positivos para ELISA. Os animais não apresentam sinais clínicos que possam ser relacionados com a presença do vírus. Maior proporção de animais positivos foi correlacionada com o aumento da idade dos indivíduos. O vírus da leucose enzoótica bovina está presente no estado de Santa Catarina devendo ser adotadas medidas de prevenção e controle para evitar a disseminação entre os animais dos rebanhos.

5.6 REFERÊNCIAS

- AXEL, V.C. Enzootic bovine leukosis and the risk to human health. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 15, p. 763–770, 2017.
- BENITEZ, O.J. et al. Lack of Bovine leukemia virus transmission during natural breeding of cattle. **Theriogenology**, v. 126, n. 1, p. 187-190, 2019.
- BIRGEL JUNIOR, H. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em animais da raça simental, criados no estado de São Paulo; **Ars Veterinária**, Jaboticabal, SP, v. 22, n. 2, p. 122- 129, 2006.
- BRENNER, J.; MOSS, S.; MOALEM, U. Acomparative study of the Elisa and AGID techniques for the detection of bovine leukosis virus antibodies in bovine serum and milk. **Israel Journal Veterinary Medicine**, v. 49, n. 4, p. 165-167, 1994.
- FEITOSA, F.L.F. **Semiologia Veterinária**. 3ª ed. Ed. Roca, São Paulo, 2014.
- FERREIRA, F. et al. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 732-738, 2006.
- FIDELIS JUNIOR, O.L. et al. Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. **Brazilian Journal Veterinary Parasitol**, v. 28, n. 2, p. 203-209, 2019.
- FRIE M.C. & COUSSENS P.M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, n. 3-4, p. 103-114, 2015.
- GUTIÉRREZ, G. et al. Natural progression of bovine leukemia virus infection in argentinean dairy cattle. **Veterinary Microbiol**, v. 151, n. 3-4, p. 255–263, 2012.
- HIRSH, C., LEITE, R.C. Leucose enzoótica bovina. in: MAGID, J., RIBEIRO, M.G., PAES, A.C., **Doenças Infecciosas em animais de Produção e de companhia**. 1 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.
- JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.
- JULIANO, R. S. et al. Soroepidemiologia da leucemia bovina (LB) em bovinos curraleiros dos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, p. 289-295, 2014.
- KLINTEVALL, K. et al. Bovine leukaemia virus: € rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. **Veterinary Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 191-204, 1994.

- LEE, E.J. et al. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle, *Infect. Infection, Genetics and Evolution*, v. 41, n. 1, p. 245–254, 2016.
- LEUZZI JR, L. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n.2, p. 211-221, 2001.
- LUDERS, M. A. Prevalência de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina em fêmeas com mais de dois anos no Rebanho de bovinos leiteiros no Município de Mafra-SC. Lages, 2001, 30p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agroveterinária / Sanidade Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.
- MATSUMURA, K. et al. Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan. **Virus Research**, v. 155, n. 1, p. 343-348, 2011.
- MCHUGH, M. L. Interrater reliability: the kappa statistic. **Biochemia Medica (Zagreb)**, v. 22, n. 3, p. 276-282, 2012.
- NEIVA, Rogério Santoro. **Produção de bovinos leiteiros**, 2ª ed. ED. UFLA/FAEPE, Lavras, MG, 2000.
- NEKOU EI, O. et al. Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 133, p. 1-9, 2016.
- OIE. World Organization for Animal Health. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, 2018.
- OPAS (Organización Panamericana de la Salud). **Bioestadística: procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo**. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, n.18, 1979.
- PEREIRA, A. L. M. **Soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina Revisão de Literatura**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, 2013.
- RAMALHO, et al. **Seroprevalence of enzootic bovine leukosis (EBL): a systematic review and meta-analysis**. RSD (2020) 9:e43591211228. doi: 10.33448/rsd-v9i12.11228
- ROBINSON, E.N. Termorregulação. In: CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap.51, p.427-435.
- RODAKIEWICZ, S.M. et al. Heterogeneity determination of bovine leukemia virus genome in Santa Catarina state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1-7, 2018.
- SANTOS, H. P. et al. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados á Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos da bacia leiteira do estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 351-358, 2011.
- SILVA, R.P.A. et al. Correlações genéticas entre algumas características de tipo e intervalo de partos em vacas da raça holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Vetinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 166-172, 2015.

SPINOLA, T.R. et al. Correlação entre a atipia linfocitária e o perfil imunológico de vacas leiteiras infectadas pelo vírus da leucemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 293-300, 2013.

WEISER, G. **Interpretação da resposta leucocitária nas doenças**. In: THRALL, M. A. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. 1 ed. São Paulo: Roca, 2006. cap.12, p. 136-140.

WOAH. Bovine Enzootic Leukosis. In: (Ed.). **Terrestrial Animal Health Code**. 29th Edition, v.1, 2021. chap. 3.4.9, p.800.

6 ASSOCIAÇÃO DO LOCUS BOLA-DRB3 COM A RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS

Resumo

A leucose enzoótica bovina é uma doença infecciosa causada pelo vírus da leucose bovina, causador de linfossarcomas em bovinos e presente em tecidos mamários cancerígenos humanos. A raça holandesa é reconhecida por sua elevada capacidade de produção, sendo a raça leiteira de maior importância no cenário nacional. Conhecer a variabilidade do gene BoLA-DRB3.2 dentro desta população é uma ferramenta importante para avaliar a resistência ou susceptibilidade desta raça ao agente. Esse aspecto denota importância no sentido de selecionar linhagens resistentes, minimizando perdas econômicas, bem como implicando diretamente na saúde pública. Para a determinação da variabilidade do gene BoLA-DRB3 e a sua associação com a resistência ou susceptibilidade ao BLV em bovinos da raça holandesa, alelos de 181 animais foram amplificados utilizando a técnica de PCRSBT. Foram utilizados 89 animais positivos e 92 negativos para ELISA e PCR. Os fragmentos foram sequenciados e os dados brutos das sequências foram analisados por meio do software Assign 400ATF ver. 1.0.2.41 software. A raça holandesa obteve 20 alelos identificados, sendo que dois (DRB3*20:01:01 e DRB3* 044:01) ainda não descritos previamente na raça. O alelo BoLA DRB3.2 011:01 apresentou associação com a resistência à infecção natural pelo vírus da leucose enzoótica bovina (BLV). Análises estatísticas demonstraram que esta população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Conclui-se que a raça holandesa, apesar de representar uma população grande, mantém baixa diversidade genética para o BoLA-DRB3, havendo associação de alelos de resistência à infecção pelo BLV.

Palavras-chave: Genotipagem; Resistência; Raça Holandesa.

6.1 INTRODUÇÃO

As raças leiteiras, principalmente se referindo a holandesa, que possui maior distribuição nacional, possuem inegável importância sob o ponto de vista de sustentabilidade e segurança alimentar. A variabilidade genética que estes animais apresentam são importantes diante dos desafios ambientais e nutricionais, para a melhoria de características produtivas importantes e para o atendimento de demandas dos consumidores (PORTER, 1978).

Há um entendimento que a variabilidade genética leva a maiores chances de resistência a diversas enfermidades dos rebanhos (SPRINGBETT et al., 2003). Entre as enfermidades mais prevalentes nos rebanhos bovinos leiteiros, a leucose enzoótica bovina, causada pelo vírus da Leucose bovina (BLV), é uma doença causadora de enormes prejuízos econômicos decorrentes da alta morbidade, perda de potencial produtivo, morte ou descarte involuntário de animais, além de ter um controle difícil de ser estabelecido (ALMEIDA et al., 2021).

Os prejuízos causados pelo BLV exigem novas alternativas para o controle desta enfermidade, sendo uma das mais promissoras, a seleção de animais com genótipos de resistência à doença clínica (SCHROOTEN et al., 2005). Uma vez identificados esses animais, se tornam importantes fontes de material genético para o melhoramento de rebanhos susceptíveis ao vírus. Sob este aspecto, vários estudos comprovaram a importância do locus BoLADRB-3.2 com a resistência à diversas enfermidades (KULBERG et al., 2007; RUPP et al., 2007).

O complexo de histocompatibilidade principal (MHC) caracteriza-se por ter relação entre genes que desempenham papel na resistência/susceptibilidade à doenças infecciosas, além de atuar sobre a resposta imune dos animais (PENN, 2002). O locus BoLA DRB3.2 tem sido associado à resistência a diversas doenças infecciosas, incluindo mastite (POKORSKA et al., 2018), febre aftosa (LEI et al., 2012), anaplasmoses e babesiose (CASA et al., 2023) e leucose enzoótica bovina (LO et al., 2021).

A raça holandesa é de interesse perante a vários fatores, tanto pelo volume, quanto pela qualidade do leite produzido. No entanto, são animais muito sensíveis ao calor e a parasitas como carrapatos, tendo comprometimento da sua resposta imune quando expostos a desafios. Por este motivo, expressam melhor seu potencial produtivo em sistemas de confinamento, que tenham conforto térmico e instalações apropriadas (PORTER, 1978). Sendo assim, a presença de alelos de resistência à leucose enzoótica bovina na raça holandesa,

associados ao potencial produtivo evidencia sua importância como fonte de material genético para outros rebanhos.

Desse modo é possível incrementar a resistência dos animais ao vírus, reduzindo assim custos com médicos veterinários, prejuízos com perdas de animais tanto por morte ou descarte, custos com testes de rotina para controle do agente nas propriedades, assegurando a produção sustentável a partir da utilização desta raça.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob protocolo número CEUA Nº 3779240422.

6.2.2 Animais e obtenção das amostras

Foram utilizadas amostras de DNA de 181 bovinos da raça holandesa, oriundas de propriedades localizadas nas seis mesorregiões do estado de Santa Catarina, escolhidas de forma aleatória, a partir dos resultados previamente obtidos, compondo de 89 amostras positivas para o BLV e 92 amostras negativas. As amostras positivas priorizaram animais que tiveram teste positivo tanto pela técnica da PCR quanto pelo ELISA. Da mesma forma, amostras negativas, para serem incluídas no estudo, obrigatoriamente, foram negativas perante ambas as técnicas de diagnóstico. Propriedades em que se obteve 100% de negatividade para o BLV, não foram incluídas.

6.2.3 Extração de DNA

O DNA das amostras foi extraído por meio de kit comercial ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (PROMEGA®), de acordo com as instruções do fabricante.

6.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A infecção por BLV pode ser confirmada por meio da detecção do gene *env* do provírus, que possui 440 pares de base e está localizado na posição 5029-5468 do genoma viral. A reação de PCR foi calculada por meio de fator de diluição para amostras com concentração de DNA entre 20 e 50µL, e era composta por 1X Green GoTaq Flexi Buffer, 25mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), mix de nucleotídeos (adenina, citosina, guanina e

timina) 2mM cada, 8,5 pmol de primers OBLV1A (5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATACA-3') e OBLV6A (5'-CCAACATATAGCACAGTCTGGGAAGGC-3'), 3µL de template de DNA e água livre de nuclease para completar o volume final da reação de 25µL, adicionada em microtubos do tipo Eppendorf de 200µL.

A amplificação foi conduzida em termociclador (Veriti 96 well Thermal Cycler - Applied Biosystems by Thermofisher®) conforme protocolo da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), e as amostras passaram por um ciclo de cinco minutos a 94°C, cinco ciclos a 94°C por quarenta e cinco segundos, 60°C por sessenta segundos e 72°C por noventa segundos, trinta e cinco ciclos de 94°C por quarenta e cinco segundos, 59°C por sessenta segundos e 72°C por noventa segundos. A última etapa da PCR foi um ciclo de 72°C por sete minutos, seguido de holding de 4°C.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese com 100V e 400mA por 50 minutos, em gel de agarose 1,5%. Foram utilizados 9µL de amostra marcadas com 1µL de GelRed® nucleic acid gel stain 2X (Uniscience). O marcador molecular utilizado foi 100pb DNA Ladder corado com 6X Blue/Orange Loading Dye (Promega®). O gel foi visualizado em transiluminador L-Pix EX (Loccus®).

6.2.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O teste de ELISA foi realizado utilizando o kit comercial ELISA CHEKIT-Leucose (IDEXX®), seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. As leituras da microplaca foram realizadas em um leitor Thermo® Multiskan, equipado com um filtro de 450 nm.

6.2.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do gene BoLA-DRB3 se deu por meio de PCR em etapa única, com os primers HLO30 (5'-ATC CTC TCT CTG CAG CAC ATT TCC-3') e HLO32 (5'-TCG CCG CTG CAC AGT GAA ACT CTC-3') (DUANGJINDA et al., 2013). As condições de reação foram: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 1,5% acrescido do corante Unisafe Dye 20.000x (Uniscience). Na primeira lacuna do gel foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb como padrão para determinar o tamanho das bandas das amostras. As condições da fonte elétrica foram de 100 Volts e

400mA por 40min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta. O fragmento obtido possui tamanho de 284pb do éxon 2 do gene BoLA-DRB3.

6.2.7 Genotipagem do gene BoLa-DRB3 por meio da técnica de PCR-SBT (Polymerase Chain Reaction – Sequence Based Typing)

Os alelos BoLA-DRB3 foram genotipados utilizando a técnica de PCR-SBT (TAKESHIMA et al., 2011), usando os primers HLO30 (5'-ATC CTC TCT CTG CAG CAC ATT TCC-3') e HLO32 (5'-TCG CCG CTG CAC AGT GAA ACT CTC-3'). Os fragmentos foram sequenciados utilizando o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle 137 Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA), pelo método de Sanger. Os dados brutos das sequências foram analisados por meio do software Assign 400ATF ver. 1.0.2.41 software (Conexio Genomics, Fremantle, Australia).

6.2.8 Análises estatísticas

6.2.8.1 Medidas de variabilidade genética

As frequências alélicas e o número de alelos foram obtidos por meio de contagem direta. A heterozigosidade observada (H_o) e a heterozigosidade esperada (H_e) para o locus BoLA- DRB3 foi estimada (Nei, 1978), utilizando o software ARLEQUIN 3.5 para análise de genética de populações. Potenciais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram estimados pela estatística FIS para cada raça utilizando o teste exato incluído no software GENEPOP 4.0.

6.3 RESULTADOS

Um total de 20 alelos foram identificados na população estudada (Tabela 10). O alelo mais frequente observado foi o DRB3*001:01 (27,6% - 100/362), seguido dos alelos DRB3*015:01 (20,7% - 75/362), DRB3*010:01 (14% - 51/362), DRB3*011:01 (10,7% - 39/362) e DRB3*014:01:01 (8% - 29/362).

Os alelos DRB3*20:01:01 (1/362) e DRB3* 044:01 (1/362) encontrados em nosso grupo de estudo, não foram previamente encontrados em outras populações da raça holandesa dentro da literatura consultada. Por meio do teste Exato de Fischer identificou-se que o alelo DRB3*011:01 (39/362) possui associação entre animais positivos e negativos para leucose

enzoótica bovina ($p=0,036$), por meio da PCR e ELISA, havendo associação gênica com resistência para a infecção natural pelo vírus.

Tabela 10 - Frequência gênica dos alelos BoLA-DRB3 detectados por PCR-SBT em 181 animais da raça holandesa associados aos positivos e negativos para BLV por meio dos testes de ELISA e PCR, no estado de Santa Catarina, Brasil.

Alelo BoLA-DRB3	<i>Ho</i>		<i>He</i>		<i>P Value</i>	O.R.
	BLV + (178)	BLV – (184)	BLV +	BLV -		
<i>BoLA-DRB3*001:01</i>	47	53	49	51	0,610	0,887
<i>BoLA-DRB3*015:01</i>	41	34	37	38	0,285	1,32
<i>BoLA-DRB3*010:01</i>	30	21	25	26	0,137	1,57
<i>BoLA-DRB3*011:01</i>	13	26	19	20	0,036	0,479
<i>BoLA-DRB3*014:01:01</i>	11	18	14	15	0,207	0,632
<i>BoLA-DRB3*012:01</i>	14	7	10	11	0,098	0,463
<i>BoLA-DRB3*027:03</i>	9	9	9	9	0,942	0,966
<i>BoLA-DRB3*009:02</i>	2	4	3	3	0,434	1,96
<i>BoLA-DRB3*007:01</i>	2	3	2	3	0,608	1,46
<i>BoLA-DRB3*009:01</i>	1	3	2	2	0,331	2,93
<i>BoLA-DRB3*025:01:02</i>	1	2	1	2	0,582	1,95
<i>BoLA-DRB3*002:01</i>	2	0	1	1	0,149	0,191
<i>BoLA-DRB3*037:01</i>	2	0	1	1	0,149	0,191
<i>BoLA-DRB3*016:01</i>	1	0	0,4	0,5	0,309	0,321
<i>BoLA-DRB3*020:01:01</i>	1	0	0,4	0,5	0,309	0,321
<i>BoLA-DRB3*024:06</i>	1	0	0,4	0,5	0,309	0,321
<i>BoLA-DRB3*003:01</i>	0	1	0,4	0,5	0,325	2,92
<i>BoLA-DRB3*013:01</i>	0	1	0,4	0,5	0,325	0,343
<i>BoLA-DRB3*031:01</i>	0	1	0,4	0,5	0,325	0,343
<i>BoLA-DRB3*044:01</i>	0	1	0,4	0,5	0,325	0,343

Teste Exato de Fischer $P=0,137$. Jamovi.

The jamovi project (2022). jamovi. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

O pequeno número de alelos encontrados na raça holandesa, comparados a outros estudos resultou também em baixa diversidade genética, representado pelos valores de h_o e h_e

menores que 0,90 ($h_o = 0.823$ / $h_e = 0.839$). O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (WHE) mostrou que a raça holandesa não apresenta desvio da proporção teórica ($p = 0,018$), indicando que não há forças de seleção atuando de modo que possa mudar a frequência de alelos presentes.

Para testar se há a ocorrência de possível seleção por balanceamento na raça holandesa, foi realizado o teste de neutralidade exato de Slatkin, sendo que valores de p abaixo de 0,025 para este teste são esperados se a amostra estiver sob seleção por balanceamento, o que não se confirmou para a raça holandesa ($p = 0,111$).

O valor de FIS positivo indica duas hipóteses; que há excesso de animais homozigotos na população ou que há um número muito reduzido de heterozigotos, não sendo esse dado significativo na raça holandesa da população estudada ($FIS = 0,018$; $p = 0,111$).

6.4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho de associação dos alelos BoLA-DRB3 com a infecção natural por Leucose Enzoótica Bovina em bovinos da raça holandesa no Brasil. A variabilidade genética é um dos principais fatores utilizados em programas de melhoramento genético. Cada raça reúne características próprias que lhes conferem vantagens em seus ambientes de criação, maximizando seu potencial de produção (SPRINGBETT et al., 2003).

A distribuição das frequências alélicas BoLA DRB3 no éxon 2 na raça holandesa, totalizando 20 alelos no total, está de acordo com o esperado, visto que estudos prévios reportaram uma variação entre 11 a 37 alelos para a raça holandesa em diferentes países (DIETZ et al., 1997; TAKESHIMA et al., 2015; BRUJENI et al., 2016; GIOVAMBATTISTA et al., 2020; MAEZAWA et al., 2023; HAMADA et al., 2024). Dentre os 20 alelos identificados na raça holandesa no estado de Santa Catarina, Brasil, 18 variantes já haviam sido anteriormente relatadas por diferentes autores e dois novos alelos foram encontrados em nosso estudo, sendo o DRB3.2* 044:01 e o DRB3.2*020:01:01, identificando mais opções de polimorfismo na raça.

A raça holandesa demonstra possuir baixa variabilidade genética para o gene BoLA-DRB3, o que pode ser considerado uma desvantagem para os programas de melhoramento, principalmente nos quesitos de características voltados à saúde animal (VILAÇA et al., 2016). O cruzamento entre linhagens específicas, com foco apenas em determinada característica produtiva predispõem à perda da variabilidade genética (FAO, 2015).

Pressupõe-se que a resistência exibida por certos grupos genéticos de bovinos ao BLV esteja associada às características ligadas ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (BRUJENI et al., 2016). As descobertas evidenciadas em vários estudos regionais enfatizam a tese da extrema relevância genética correlacionada à resistência sobre a manifestação clínica da leucose bovina.

Os alelos DRB3.2 *001:01, *15:01 e *011:01 juntos, representaram 59% (214/362) das frequências obtidas por meio de PCR-SBT. Vai de encontro com as frequências mais elevadas já descritas (DIETZ et al., 1997; DUANGJINDA et al., 2013; SHARIF et al., 2016; GIOVAMBATTISTA et al., 2020). Portanto, as informações obtidas sobre o polimorfismo do locus BoLA-DRB3 da pesquisa neste grupo regional da raça holandesa pareceu representativo.

Em se tratando de possível resistência ou susceptibilidade genética para esta enfermidade, o alelo BoLA DRB3.2*09:01 é frequentemente encontrado na raça holandesa e foi associado à susceptibilidade à infecção por BLV (BRUJENI et al., 2016), o que não se confirmou em nossa população de estudo, sendo um alelo com baixa frequência e sem correlação com susceptibilidade ou resistência a manifestação de leucose. Por outro lado, o alelo BoLA DRB3.2* 011:01 possui associação entre animais positivos e negativos, havendo associação gênica com resistência para a infecção natural pelo vírus. O mesmo resultado foi evidenciado realizando-se sequenciamento gênico em gado japonês, onde comprovou-se que o alelo 011:01 possui resistência perante ao vírus da leucose bovina (LO et al., 2021).

Nosso achado corrobora com os dados encontrados em estudo prévio realizado na Colômbia, em bovinos crioulos, onde o mesmo alelo foi identificado e ligado positivamente à reduzida infecção viral, ao não desenvolvimento de linfocitose persistente e ao aumento de anticorpos contra leucose bovina, bem como com a diminuição da carga proviral, sendo considerados animais resistentes ao desenvolvimento e progressão da doença (HERNÁNDEZ et al., 2014).

O mesmo estudo realizado por LO et al. (2021), identificou que o gene BoLA-DRB3.2* 016:01, possui potencial ligação com o desenvolvimento da forma clínica da leucose enzoótica bovina induzida pelo BLV, não sendo demonstrado essa mesma evidência em nosso estudo, por mais que esse alelo tenha sido identificado em nossa população de estudo. Diferentes fatores podem explicar a falta de associação à resistência ou susceptibilidade à infecção, sendo que o principal poderia ser pelo fato de que alelos de resistência ou susceptibilidade do gene explicam apenas uma parte da variância deste caráter

(infecção por BLV), sendo que o número de animais analisados e o número de alelos detectados fazem que não tenhamos um suficiente poder de detectá-lo estatisticamente.

Em estudo realizado no Japão onde se avaliou a frequência de alelos BoLA-DRB3 em vacas holandesas, concluiu-se que a carga viral está intimamente associada ao polimorfismo alélico destes animais (TAKESHIMA et al., 2018). Portanto, sabendo-se a carga proviral dos animais positivos, facilita o manejo de controle do vírus dentro das propriedades, eliminando a necessidade de segregação de lotes, ou ainda permitindo segregar apenas animais com elevado potencial de disseminação do agente (KUCZEWSKI et al, 2020).

Os genes BoLA, principalmente DRB3, possuem utilização ampla como marcadores para doenças e características imunológicas em bovinos. Em se tratando do vírus da leucose bovina, o diagnóstico baseado na carga de DNA proviral desempenha crucial importância na manifestação clínica e risco de transmissibilidade (DAOUS et al., 2021). Uma sugestão para pesquisas futuras seria a realização de estudos adicionais envolvendo a quantificação de DNA proviral dos animais positivos, e com estes, realizar a identificação dos alelos e correlacionar com a susceptibilidade ou resistência à leucose enzoótica bovina, trazendo dados importantes para seleção e controle da enfermidade nas propriedades.

Nosso estudo contribui para a compreensão molecular da infecção por BLV na raça holandesa, sendo a raça de maior importância nacional no cenário leiteiro. A identificação de 20 alelos para o gene BoLA-DRB3 fornece perspectivas valiosas sobre diversidade genética desta raça.

A diversidade genética (h_o e h_e) e o HWE (FIS) calculados em nosso trabalho, estimam a diversidade genética na população e a atuação de forças evolutivas. O baixo número de alelos presentes na raça holandesa, mesmo que esperados, resultam também em baixa diversidade genética, apresentando valores de h_o e h_e inferiores a 0,90. Resultados semelhantes foram encontrados para outros grupos de bovinos da raça holandesa (GIOVAMBATTISTA et al., 2020). O teste para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) mostrou que a raça holandesa não apresenta desvio da proporção teórica, ou seja, encontra-se em equilíbrio.

Mesmo com número extremamente elevado de animais na população da raça holandesa no estado de Santa Catarina, a raça não consegue manter alta variabilidade genética e a falta de manutenção desta diversidade pode se dar por meio de mecanismos de seleção. A raça holandesa se encontra em HWE, sendo que o excesso ou déficit de heterozigotos possuiu diferença. Sendo assim, não conseguimos atrelar nenhum tipo específico de força de seleção à ausência de elevada variabilidade genética da raça, de modo que possivelmente uma intensa

seleção para características voltadas a produção, usando grupos genéticos específicos, seja suficiente para diminuir a diversidade genética para o gene BoLA-DRB3. Ainda assim, a quantidade de alelos presentes na raça holandesa pode contribuir para que os animais não identifiquem e não tenham boas respostas frente a diferentes antígenos agressores, diferente do que acontece com raças nativas na África, que possuem resistência natural a diversas enfermidades (SALIM et al., 2021).

O teste de neutralidade de Slatkin mostra evidências de que o perfil de frequências do gene BoLA-DRB3 na raça holandesa apresenta distribuição consistente com a proporção teórica esperada para animais que estejam em equilíbrio. Resultados semelhantes foram obtidos para a raça holandesa de origem argentina (TAKESHIMA et al., 2015a).

Recentemente, trabalhos demonstraram presença de DNA do BLV em tecido neoplásico mamário de mulheres, estando em proporção mais elevadas em relação a tecidos saudáveis (BALTZELL et al., 2018; SCHWINGEL et al., 2019, GAO et al., 2020), bem como, identificou-se a presença de DNA viral no sangue humano (BUEHRING et al., 2019). Diante disso, nosso estudo e sua importância tornam-se aparentes, contribuindo para a percepção do vírus da leucose bovina nos rebanhos regionais, bem como pode pressupor hipóteses correlacionadas com a saúde humana, visto que indícios de caráter zoonótico estão cada vez mais aparentes. Desta forma, enfatiza-se a importância da continuidade de estudos que demonstrem o real cenário do BLV, correlacionando com linhas de pesquisa voltadas a saúde pública.

Nosso experimento permitiu uma análise mais precisa e detalhada da resposta imune dos animais da raça holandesa expostos de forma natural ao BLV. Por meio da identificação gênica, podemos aprofundar nossa compreensão sobre os mecanismos moleculares envolvidos com características de resistência ou susceptibilidade à infecção. Tais estudos são cruciais para aprimorar nossa compreensão, estabelecendo uma base de dados que nos garantem intervenções futuras e estratégias de controle da enfermidade nos rebanhos de forma sólida.

6.5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a raça holandesa, no estado de Santa Catarina, Brasil, possui baixa variabilidade genética para o gene BoLA-DRB3.2. Foram encontrados dois alelos DRB3*20:01:01 e DRB3* 044:01 ainda não descritos para a raça holandesa. O alelo BoLA DRB3.2 011:01 apresentou associação com a resistência à infecção natural pelo vírus da leucose enzoótica bovina (BLV).

6.6 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, I.C. et al. Seroprevalence and Influence of Bovine Leukemia Virus on the Incidence of Mastitis in Gairy Herds. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, n. 1, p. 1783, 2021.
- BALTZELL, K.A. et al. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case- control study of women in Texas. **Cancer (2018)**, 124:1342–1349.
- BRUJENI, G. N. et al. Association of BoLA-DRB3. 2 alleles with BLV infection profiles (persistent lymphocytosis/lymphosarcoma) and lymphocyte subsets in Iranian Holstein cattle. **Biochemical genetics**, v. 54, p. 194-207, 2016.
- BUEHRING, G.C et al. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 772, 2019.
- CASA, M.S. et al. Identification of Anaplasma marginale, Babesia bovis and Babesia bigemina resistance alleles in Crioulo Lageano cattle using PCR-SBT and BoLA-DRB3 gene sequencing. **Frontier in Veterinary Science**, v. 10, p. 1256928, 2023.
- DAOUS, H. E. et al. Relationship between Allelic Heterozygosity in BoLA-DRB3 and Proviral Loads in Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 647, 2021.
- DIETZ, A.B. et al. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 haplotypes with immunological traits of Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 80, p. 400–405, 1997.
- DUANGJINDA, M. et al. Association of BoLA-DRB3 alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 314-320, 2013.
- GAO, A. et al. Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104417, 2020.
- GIOVAMBATTISTA, G. et al. Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in global cattle breeds, with a- focus on cattle in Myanmar. **BMC genetics**, v. 21, n. 1, p. 1-17, 2020.
- HERNÁNDEZ, D.Y.H. et al. Asociación del locus BOLA-DRB3. 2 con el virus de la leucosis bovina en el ganado criollo colombiano. **Revista Colombiana de Ciência Animal-RECIA**, v. 6, n. 2, p. 319-326, 2014.
- MAEZAWA, M. et al. BoLA-DRB3*15:01 allele is associated with susceptibility to early enzootic bovine leukosis onset in Holstein-Friesian and Japanese Black cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 284, n.1, p. 1-4, 2023.
- KUCZEWSKI, A. et al. Invited review: Bovine leukemia vírus -Transmission, control, and eradication. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n.1 p. 6358-6375, 2020.

- KULBERG, S. et al. Study on the association of BoLA-DRB3. 2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cows. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 124, n. 4, p. 201- 207, 2007.
- LEI, W. et al. BoLA-DRB3 gene polymorphism and FMD resistance or susceptibility in Wanbei cattle. **Mol Biol Rep**, v. 39, p. 9203–9209, 2012.
- LO, C.W. et al. Association of Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma with BoLA-DRB3 Polymorphisms at DNA, Amino Acid, and Binding Pocket Property Levels. **Pathogens**, v. 10, n.4, p. 437, 2021.
- PENN, D.J. **Major Histocompatibility Complex (MHC)**. Encyclopedia of Life Sciences, p. 1- 7, 2002.
- POKORSKA, J. et al. The influence of BoLA-DRB3 alleles on incidence of clinical mastitis, cystic ovary disease and milk traits in Holstein Friesian cattle. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 1, p. 917-923, 2018.
- PORTER, V. **Cattle: A Handbook to the Breeds of the World**. London: Cristopher Helm. 1978. 400p.
- RUPP, R. et al. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3. 2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 1029-1038, 2007.
- SALIM, B. et al. BoLA-DRB3 gene haplotypes show divergence in native Sudanese cattle from taurine and indicine breeds. **Scientific reports**, v.11, n. 1, p. 1-15, 2021.
- SCHROOTEN, C. et al. Genetic progress in multistage dairy cattle breeding schemes using genetic markers. *Journal of dairy science*, v. 88, n. 4, p. 1569-1581, 2005.
- SCHWINGEL, D. et al. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. **Sci Rep**, v. 9, n.1, p. 2949, 2019.
- SHARIF, S. et al. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v. 29, n. 3, p. 185-193, 1998.
- SPRINGBETT, A. J. et al. The contribution of genetic diversity to the spread of infectious diseases in livestock populations. *Genetics*, v. 165, n. 3, p. 1465-1474, 2003.
- TAKESHIMA, S.-N. et al. A new method for typing bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles by combining two established PCR sequence-based techniques. *Tissue Antigens*, v. 78, n. 3, p. 208-213, 2011.
- TAKESHIMA, S.-N. et al. Assessment of biodiversity in Chilean cattle using the distribution of major histocompatibility complex class II BoLA-DRB3 allele. *Tissue Antigens*, v. 85, n. 1, p. 35-44, 2015a.

TAKESHIMA, S.-N. et al. Characterization of bovine MHC class II DRB3 diversity in South American Holstein cattle populations. *Tissue Antigens*, v. 86, n. 6, p. 419-430, 2015b.

TAKESHIMA, S.-N. et al. Genetic diversity of BoLA-DRB3 in South American Zebu cattle populations. *BMC genetics*, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2018.

VILAÇA, L.F. et al. Polimorfismos do gene BoLA-DRB3 em rebanhos bovinos leiteiros 5/8 Girolando e Holandês no estado de Pernambuco. **Arch. Zootec**, v. 65, n. 249, p. 7-11, 2016.

ANEXOS



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "FATORES DE RISCO, SOROPREVALÊNCIA, GENOTIPAGEM E ASSOCIAÇÃO DO LOCUS BOLA-DRB3 COM A RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS.", protocolada sob o CEUA nº 3779240422 (ID 001555), sob a responsabilidade de **Joandes Henrique Fontequê e equipe; Felipe Eduardo Fiorin** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de 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), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 29/04/2022.

We certify that the proposal "RISK FACTORS, SEROPREVALENCE, GENOTYPING AND ASSOCIATION OF THE BOLA-DRB3 LOCUS WITH ENZOOTIC LEUKOSIS VIRUS RESISTANCE IN DAIRY CATTLE.", utilizing 400 Bovines (males and females), protocol number CEUA 3779240422 (ID 001555), under the responsibility of **Joandes Henrique Fontequê and team; Felipe Eduardo Fiorin** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 04/29/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 06/2022 a 06/2026

Área: [Medicina Veterinária](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [0 a 20 anos](#)

N: [400](#)

Linhagem: [Holandesa](#)

Peso: [50 a 1000 kg](#)

Local do experimento: Os animais serão provenientes de propriedades rurais criadoras de bovinos leiteiros no estado de Santa Catarina.

Lages, 29 de abril de 2022

José Cristani
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

Universidade do Estado de Santa Catarina

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO : EMENDA v26/03/2023

Certificamos que a EMENDA (versão de 26/03/2023) da proposta intitulada "FATORES DE RISCO, SOROPREVALÊNCIA, GENOTIPAGEM E ASSOCIAÇÃO DO LOCUS BOLA-DRB3 COM A RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS.", CEUA nº 3779240422 (ID 015440), sob a responsabilidade de **Joandes Henrique Fontque e equipe; Felipe Eduardo Fiorin** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) em 04/04/2023.

Término previsto: 06/2026

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Bovinos

sexo: Machos e Fêmeas idade: 0 a 20 anos

Quantidade
de
solicitada: 450

Linhagem: Holandesa

Peso: 50 a 1000 kg

ANIMAIS UTILIZADOS

Bovinos

Machos e Fêmeas

Quantidade
Aprovada
850

Quantidade
Utilizada
0

Lages, 04 de abril de 2023

José Cristiani



José Cristiani
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina





UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fatores de risco, soroprevalência, genotipagem e associação do locus BOLA-DRB3 com a resistência ao vírus da leucose enzoótica em bovinos leiteiros.

Pesquisador: Joandes Henrique Fontequê

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60325722.6.0000.0118

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SC UDESC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.834.158

Apresentação do Projeto:

Trata-se de segunda versão de protocolo de pesquisa CAAE: 60325722.6.0000.0118 **Título da Pesquisa:** Fatores de risco, soroprevalência, genotipagem e associação do locus BOLA-DRB3 com a resistência ao vírus da leucose enzoótica em bovinos leiteiros.

Pesquisador Responsável:

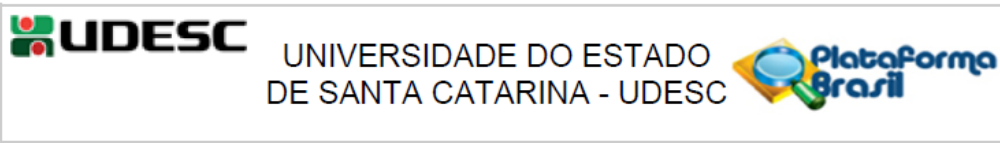
Joandes Henrique Fontequê e como equipe de pesquisa FELIPE EDUARDO FIORIN

Pesquisa oriunda do CAV/UDESC PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAL (PPGCA)
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL.

Como desenho consta:

O projeto de pesquisa envolve acadêmico do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nível Doutorado da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) e terá o objetivo de determinar a prevalência da Leucose Enzoótica Bovina em bovinos leiteiros no estado de Santa Catarina, além dos fatores de risco para a propagação da doença nas propriedades, bem como os genótipos virais mais frequentes e a possível resistência destes animais à enfermidade associando-se o locus BoLA-DRB3.

Endereço: Avenida Madre Benvenutta, 2007, Reitoria - Térreo -sala CEP/UDESC
Bairro: Itacorubi **CEP:** 88.035-001
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3664-8084 **Fax:** (48)3664-7881 **E-mail:** cepsh.reitoria@udesc.br



Continuação do Parecer: 5.834.158

participante da pesquisa ou seu representante legal, quando for o caso, bem como o pesquisador responsável, deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo suas assinaturas na última página do referido Termo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1976459.pdf	07/12/2022 14:01:24		Aceito
Outros	Termo_de_Cooperacao.pdf	07/12/2022 13:55:21	Joandes Henrique Fontequê	Aceito
Outros	ATO_DO_REITOR.pdf	07/12/2022 13:54:29	Joandes Henrique Fontequê	Aceito
Outros	Carta_Respostas_a_pendencias.pdf	07/12/2022 13:53:05	Joandes Henrique Fontequê	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEPSH_Leucose_Corrigido.pdf	07/12/2022 13:51:57	Joandes Henrique Fontequê	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_Leucose_Corrigido.pdf	07/12/2022 13:50:11	Joandes Henrique Fontequê	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoThalerAssinada.pdf	07/12/2022 13:46:31	Joandes Henrique Fontequê	Aceito
Outros	Questionario_leucose.pdf	04/07/2022 10:47:25	Joandes Henrique Fontequê	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 22 de Dezembro de 2022

Assinado por:
Renan Thiago Campestrini
(Coordenador(a))



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA



Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

GABINETE DO REITOR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa científica de Doutorado intitulada "FATORES DE RISCO, SOROPREVALÊNCIA, GENOTIPAGEM E ASSOCIAÇÃO DO LOCUS BOLA-DRB3 COM A RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS", que tem como objetivo determinar a soroprevalência da leucose em bovinos leiteiros no estado de Santa Catarina por meio do teste de ELISA, bem como os genótipos do vírus e a sua associação com o locus Bola-DRB3. Identificar os possíveis fatores de risco associados à transmissão do vírus, por meio da aplicação de um questionário epidemiológico abordando as principais características da propriedade, manejo empregado, presença de outras espécies, frequência e tipo de transtornos relacionados a enfermidade.

Serão previamente marcados a data e horário para a colheita das amostras de sangue e realização do questionário epidemiológico. O contato com os proprietários será realizado via telefone, bem como o conteúdo do questionário será previamente disponibilizado e encaminhado para a sua avaliação. Informamos que o recrutamento dos proprietários se deu por meio do TERMO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA N° 7921, firmado entre a COMPANHIA INTEGRADA DE DESENVOLVIMENTO AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA (CIDASC) e a UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA (UDESC) onde foi solicitado o cadastro das propriedades leiteiras do Estado de Santa Catarina registradas na CIDASC para realizar o contato com os proprietários a fim de iniciar as colheitas das amostras e a realização do questionário epidemiológico. Estas avaliações serão realizadas nas próprias propriedades sem necessidade de deslocamento. Não é obrigatório responder a todas as perguntas. Para a realização do questionário epidemiológico serão tomadas as medidas de prevenção e controle da transmissão do coronavírus COVID-19 conforme normas da UDESC. O questionário será realizado em ambiente ventilado (portas e janelas abertas), manter distância mínima de 1 metro entre o entrevistador e entrevistado, utilização de máscara, higienização das mãos com álcool 70%, não compartilhar objetos e adotar comportamento amigável sem contato físico.

Os procedimentos realizados incluem a coleta por meio da venopunção da jugular para obtenção de amostras de sangue e aplicação de um questionário epidemiológico com os proprietários de bovinos para avaliação dos fatores de risco contendo questões sobre as principais características da propriedade, manejo empregado, presença de outras espécies domésticas, frequência e tipo de transtornos.

O(a) Senhor(a) e seu/sua acompanhante não terão despesas e nem serão remunerados pela participação na pesquisa. Todas as despesas decorrentes de sua participação serão ressarcidas. Em caso de dano, durante a pesquisa será garantida a indenização.

Os riscos destes procedimentos serão mínimos sendo apenas colhidas amostras de sangue dos bovinos e aplicado um questionário epidemiológico com os proprietários de bovinos para avaliação dos fatores de risco contendo questões sobre as principais características da propriedade, manejo empregado, presença de outras espécies domésticas, frequência e tipo de transtornos.

A sua identidade será preservada, pois cada indivíduo será identificado por um número.

Os benefícios e vantagens em participar deste estudo serão diretos e imediatos sendo que os resultados dos exames serão comunicados aos proprietários dos animais, bem como laudos da prevalência. Os benefícios também serão indiretos e tardios, pois será gerada uma contribuição científica com dados relacionados a soroprevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em bovinos leiteiros no estado de Santa Catarina. Estes dados, após publicação científica, poderão ser utilizados por outros Médicos Veterinários como auxílio no diagnóstico de enfermidades infecciosas que acometem os bovinos leiteiros. Os procedimentos envolvidos na pesquisa serão realizados exclusivamente pelo Coordenador do Projeto Médico Veterinário Prof. Dr. Joandes Henrique Fontque, CMRV/SC 4612, e o acadêmico de Pós-Graduação Doutorado Felipe Eduardo Fiorin CRMV/SC 7564 os quais são totalmente aptos para realização dos mesmos.

O(a) senhor(a) poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento.

Solicitamos a sua autorização para o uso de seus dados para a produção de artigos técnicos e científicos. A sua privacidade será mantida através da não-identificação do seu nome ou do animal.



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA



Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

GABINETE DO REITOR

Este termo de consentimento livre e esclarecido é feito em duas vias, sendo que uma delas ficará em poder do pesquisador e outra com o sujeito participante da pesquisa.

PESSOA PARA CONTATO: PROF. DR. JOANDES HENRIQUE FONTEQUE
(PESQUISADOR RESPONSÁVEL)
NÚMERO DO TELEFONE: (49) 3289-9254 / (49) 99919-7980
ENDEREÇO: HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS (HCV) DO CAV/UDESC
AV. LUÍS DE CAMÕES, 2090 – BAIRRO CONTA DINHEIRO – LAGES, SC.

ASSINATURA DO PESQUISADOR _____

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – CEPESH/UDESC
Av. Madre Benvenuta, 2007 – Itacorubi – Florianópolis – SC-88035-001 – Fone/Fax: (48)3321-8195
e-mail: cepsh.reitoria@udesc.br
CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - SEPN 510, Norte, Bloco A, 3º andar, Ed. Ex-INAN,
Unidade II – Brasília – DF- CEP: 70750-521 - Fone: (61)3315-5878/ 5879 – e-mail: conep@saude.gov.br

TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao projeto e, que todos os dados a meu respeito serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo, as medições dos experimentos/procedimentos de tratamento serão feitas em mim, e que fui informado que posso me retirar do estudo a qualquer momento.

Nome por extenso _____

Assinatura _____ Local: _____ Data: ____/____/____.

QUESTIONÁRIO

FATORES DE RISCO, SOROPREVALÊNCIA, GENOTIPAGEM E ASSOCIAÇÃO DO LOCUS BOLA-DRB3 COM A RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS

Nº FICHA: _____ Nº _____

PROPRIEDADE: _____

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____

ASPECTOS DA PROPRIEDADE:

1. Número de animais na propriedade:

- ☐ Menor que 50
- ☐ De 50 a 100
- ☐ De 101 a 200
- ☐ Mais de 200

2. Sistema de Criação:

- ☐ Extensivo
- ☐ Intensivo
- ☐ Semi-extensivo

3. Qual a finalidade produtiva da criação:

- ☐ leite
- ☐ leite+carne
- ☐ Animais para reprodução
- ☐ Venda
- ☐ Cria
- ☐ Recria
- ☐ Engorda

3.1 Se a finalidade for leite, qual a produção média diária por vaca:

- ☐ 5 a 10 litros
- ☐ 11 a 18 litros
- ☐ 19 a 25 litros
- ☐ 26 a 35 litros
- ☐ acima de 35 litros

3.2 Se a finalidade for leite, notou-se queda na produção de leite nos últimos meses sem causa definida:

- ☐ Sim
☐ Não
4. Tamanho da propriedade (hectare):
☐ Menor que 20 hectares
☐ de 21 a 50 hectares
☐ de 51 a 100 hectares
☐ de 101 a 200 hectares
☐ Maior que 200 hectares
5. Qual a exploração da propriedade:
☐ Pecuária
☐ Agricultura
☐ Mista
6. Existe a presença de outros animais na propriedade que possuam contato com os bovinos:
☐ Sim
☐ Não
- 6.1. Em caso afirmativo, quais:
☐ Equinos
☐ Suínos
☐ Cães
☐ Gatos
☐ Silvestres
☐ Aves
☐ Ovinos
☐ Caprinos
☐ Capivaras
7. A alimentação volumosa é constituída por:
☐ Pastagem : ☐ Nativa
☐ Cultivada
☐ Feno
☐ Silagem
8. A ração fornecida é :
☐ Ração Comercial
☐ Ração produzida na propriedade
9. Existe contato dos bovinos com animais de outras propriedades:
☐ Sim
☐ Não
10. Quais construções existem na propriedade para o gado:
☐ Curral
☐ Cercado
☐ Compost Barn
☐ Free-Stall

11. Quais as condições destas construções:
- ☐ Boas
 - ☐ Regulares
 - ☐ Precárias
12. Faz-se compra e/ou venda de animais para reprodução:
- ☐ Sim : ☐ Compra
 - ☐ Venda
 - ☐ Ambos
 - ☐ Não
13. Como é feita a reposição de animais:
- ☐ Compra de animais de outras propriedades
 - ☐ Com animais oriundos do próprio rebanho
 - ☐ Ambos
14. Qual a proporção de animais que são repostos a cada ano do total do rebanho:
- ☐ 10% ou menos
 - ☐ de 11% a 20%
 - ☐ de 21% a 30%
 - ☐ Mais de 30%
15. Após o nascimento, quanto tempo o bezerro é deixado com a mãe:
- ☐ Apenas o tempo de mamar o colostro e então é imediatamente retirado
 - ☐ Até uma semana
 - ☐ De uma semana a um mês
 - ☐ De um mês a três meses
 - ☐ De três a seis meses
 - ☐ Mais de seis meses
16. Os bezerros têm contato direto uns com os outros? São confinados juntos:
- ☐ Sim
 - ☐ Não
17. Os bezerros e novilhas tem contato direto com o restante dos animais adultos do rebanho:
- ☐ Sim
 - ☐ Não
18. Onde ficam os bezerros do rebanho:
- ☐ Pasto
 - ☐ Cercado
 - ☐ Curral
 - ☐ Bezerreiro coletivo
 - ☐ Bezerreiro individual
19. A propriedade recebe assistência veterinária:
- ☐ Sim

() Não

19.1 Em caso afirmativo, isso acontece de apenas quando algum animal adoece:

() Sim

() Não

19.2 Se a assistência veterinária é periódica, de quanto em quanto tempo ocorre a visita do médico veterinário:

() Todo mês

() A cada três meses

() A cada 6 meses

() Outro: _____

20. Qual o estado nutricional do rebanho:

() Normal

() Magro

() Caquético

() Gordo

() Obeso

PERCEPÇÃO ACERCA DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

21. Existem casos diagnosticados de Leucose Enzoótica Bovina na propriedade:

() Sim

() Não

22. Foi realizado algum teste diagnóstico para a Leucose Bovina na propriedade nos últimos 05 anos:

() Sim

() Não

23. Animais adquiridos de outras propriedades passam pelo exame para a detecção da LEB:

() Sim

() Não

24. Os animais costumam ficar estabulados:

() Sim

() Não

25. Os animais são submetidos a algum tipo de estresse durante o seu manejo:

() Sim

() Não

26. Os utensílios utilizados para colocação de brincos no gado são higienizados:

() Sim

() Não

27. É utilizado desmamador para os bezerros:
☐ Sim
☐ Não
28. É utilizada argola no nariz dos touros para facilitar o manejo:
☐ Sim
☐ Não
- 28.1 Em caso afirmativo, os utensílios e argolas utilizados são higienizados previamente:
☐ Sim
☐ Não
29. É realizada a vermifugação do rebanho:
☐ Sim
☐ Não
- 29.1 Em caso afirmativo, as agulhas e seringas usadas são higienizadas ou descartadas antes de realizar o procedimento em outro animal:
☐ Sim
☐ Não
30. Nota-se a presença de insetos hematófagos como moscas, mutucas e mosquitos:
☐ Sim
☐ Não
31. É realizada a premunicação contra babesiose e anaplasmoses no rebanho:
☐ Sim
☐ Não
32. No manejo sanitário dos animais, são reutilizadas agulhas e seringas para vários animais sem que se faça nenhum tipo de higiene dos mesmos:
☐ Sim
☐ Não
33. É realizada inseminação artificial na propriedade:
☐ Sim
☐ Não
34. É realizada a transferência de embriões na propriedade:
☐ Sim
☐ Não
35. Qual o tempo médio de vida dos animais da propriedade:
☐ Até 02 anos
☐ De 02 a 04 anos
☐ Mais de 04 anos
36. No exame obstétrico de palpação retal, as luvas são usadas em mais de um animal:
☐ Sim
☐ Não

37. Os bezerros recém-nascidos da propriedade recebem colostro:
☐ Sim
☐ Não
38. Existe algum tipo de banco de leite e colostro na propriedade:
☐ Sim
☐ Não
39. Os animais doadores de leite e colostro para os respectivos bancos são positivos ou negativos para a Leucose Enzoótica Bovina:
☐ Negativos
☐ Positivos
☐ Não é feito exame
40. Os animais são tatuados:
☐ Sim
☐ Não
- 40.1 Em caso afirmativo, os materiais usados no processo são higienizados a cada utilização:
☐ Sim
☐ Não
41. Os animais passam por cirurgia de descorna cosmética (adultos):
☐ Sim
☐ Não
- 41.1 Em caso afirmativo, os materiais cirúrgicos passam por algum tipo de higienização antes e depois de cada procedimento, entre um animal e outro:
☐ Sim
☐ Não
42. Os animais passam por cirurgia de mochação (bezerros):
☐ Sim
☐ Não
- 42.1 Em caso afirmativo, os materiais cirúrgicos passam por algum tipo de higienização antes e depois de cada procedimento, entre um animal e outro:
☐ Sim
☐ Não
43. É feita castração cirúrgica dos machos da propriedade:
☐ Sim
☐ Não
- 43.1 Em caso afirmativo, os materiais cirúrgicos utilizados, passam por algum tipo de higienização antes e depois de cada procedimento, entre um animal e outro:
☐ Sim
☐ Não

44. Qual o método de higienização usado na propriedade para a desinfecção de materiais usados em cirurgias (castrações, descornas, mochações, e outras), tatuagens, brincagens e aplicações de medicamentos e vacinas:
- ☐ Lavagem com água fria e sabão
 - ☐ Lavagem com água fria e sabão e passa-se álcool ou outro desinfetante
 - ☐ Lavagem com água quente e sabão
 - ☐ Lavagem com água quente e sabão e passa-se álcool ou outro desinfetante
 - ☐ Limpeza somente com álcool ou outro desinfetante
 - ☐ Esterilização em estufa
 - ☐ Esterilização em autoclave
 - ☐ Nenhum
45. Quem realiza os procedimentos cirúrgicos da propriedade:
- ☐ Médico Veterinário
 - ☐ Empregados com prática
 - ☐ Outros: _____
46. Já ocorreram mortes por Leucose Enzoótica Bovina na propriedade:
- ☐ Sim
 - ☐ Não
47. Já foram observados algum(ns) destes sintomas nos animais:
- ☐ Perda de peso
 - ☐ Aumento de volume dos linfonodos
 - ☐ Paralisia e/ou paresia
 - ☐ Exoftalmia
 - ☐ Dificuldade respiratória
 - ☐ Fezes escassas
48. Já foi realizado algum exame para a detecção da Leucose Enzoótica Bovina no rebanho:
- ☐ Sim
 - ☐ Não
49. Já foi vista a presença de tumores (linfossarcomas) em carcaças de animais mortos oriundos da propriedade:
- ☐ Sim
 - ☐ Não
50. Existe algum tipo de controle da LEB na propriedade:
- ☐ Sim
 - ☐ Não
- 50.1 Em, caso afirmativo, qual:
- ☐ segregação entre animais positivos e negativos
 - ☐ descarte ou abate dos animais positivos
 - ☐ Outro: _____
51. Existe histórico de doenças prévias no rebanho:
- ☐ Não

() Sim

51.1 Em caso afirmativo, quais podem-se destacar:

- () Problemas digestivos/alimentar
- () Problemas reprodutivos
- () Problemas respiratórios
- () Problemas cardiorrespiratórios
- () Problemas de pele
- () Vários problemas concomitantes

52. Existe algum tipo de controle da LEB na propriedade:

- () Sim
- () Não



Assinaturas do documento



Código para verificação: **K1O55K5M**

Este documento foi assinado digitalmente pelos seguintes signatários nas datas indicadas:



JOANDES HENRIQUE FONTEQUE (CPF: 879.XXX.419-XX) em 17/02/2025 às 09:00:23

Emitido por: "SGP-e", emitido em 30/03/2018 - 12:36:59 e válido até 30/03/2118 - 12:36:59.

(Assinatura do sistema)

Para verificar a autenticidade desta cópia, acesse o link <https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo/conferencia-documento/VURFU0NfMTIwMjJfMDAwMDQyNTIfNDI2MV8yMDI1X0sxTzU1SzVN> ou o site

<https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo> e informe o processo **UDESC 00004259/2025** e o código **K1O55K5M** ou aponte a câmera para o QR Code presente nesta página para realizar a conferência.