

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
***CAMPUS* REALEZA**
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

JHULIE CRISTIANI NOGUEIRA

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA SOBRE
CÉLULAS SOMÁTICAS E PARÂMETROS LÁCTEOS**

REALEZA

2024

JHULIE CRISTIANI NOGUEIRA

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA SOBRE
CÉLULAS SOMÁTICAS E PARÂMETROS LÁCTEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Medicina Veterinária da
Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS),
como requisito parcial para aprovação na
disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso
II.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maiara Garcia Blagitz

REALEZA

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Nogueira, Jhulie Cristiani
ANÁLISE DA INTERAÇÃO DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA
SOBRE CÉLULAS SOMÁTICAS E PARÂMETROS LÁCTEOS / Jhulie
Cristiani Nogueira. -- 2024.
30 f.

Orientadora: MV, MMV, Dra. Maiara Garcia Blagitz

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina Veterinária, Realeza, PR, 2024.

1. Glândula mamária. Imunodifusão em Gel de Ágar.
Imunossupressão. Leite. Leucemia bovina. I. Blagitz,
Maiara Garcia, orient. II. Universidade Federal da
Fronteira Sul. III. Título.

JHULIE CRISTIANI NOGUEIRA

ANÁLISE DA INTERAÇÃO DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA SOBRE CÉLULAS SOMÁTICAS E PARÂMETROS LÁCTEOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Medicina Veterinária da Universidade
Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito
para obtenção do título de Bacharel em Medicina
Veterinária.

Este trabalho de conclusão foi defendido e aprovado pela banca em: 05 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **MAIARA GARCIA BLAGITZ AZEVEDO**
Data: 12/12/2024 21:37:31-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof^a Dr^a Maiara Garcia Blagitz de Azevedo - UFFS
Orientadora

Documento assinado digitalmente
 **VANESSA SILVA RETUCI**
Data: 12/12/2024 13:44:12-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof^a Dr^a Vanessa Silva Retuci
Avaliadora

Documento assinado digitalmente
 **MARIA VICTORIA ZANGRANDE PECOITS**
Data: 12/12/2024 14:10:38-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

M.V M. Maria Zangrande
Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me ajudado a chegar até aqui. A cinco anos atrás eu era apenas uma menina pedindo para Deus um sonho aos meus olhos impossível, hoje me sinto uma mulher colhendo os frutos do que um dia foi somente uma oração. Que toda a honra e glória seja dada a ele.

Aos meus pais, agradeço por nunca medirem esforços para me ajudar em meu sonho, que também se tornou o deles. Aos 14 anos meu pai, Francisco Jusmar Berger Nogueira foi expulso de casa, pois moravam no interior e o sonho dele era estudar, meu avô, pela rusticidade da época, tirava sarro e o chamava de dr pé de chinelo, infelizmente por conta dos caminhos da vida, ele não conseguiu realizar o desejo de ser um estudante, porém 40 anos depois, estou aqui realizando o sonho dele, que tornou nosso! Meu querido pai nós conseguimos, prometo esforçar todos os dias para me tornar uma doutora, como o senhor me chamava desde criança.

Agradeço também a minha mãe, Hilda de Fatima Nogueira, a mulher do coração mais puro que existe, de uma fé inabalável, que me ajudou trabalhando muito junto com o meu pai para me manter aqui, além de ser meu amparo nas horas difíceis, me deu colo para chorar, e me fortaleceu nos dias em que pensei em desistir, você foi responsável por ter chegado até aqui, obrigada por todas as orações e por me ensinar que riqueza não tem nada haver com dinheiro. Mãe você é a mulher mais rica que eu já conheci, rica de qualidade que não se encontra por ai.

Ao meu irmão, Cristian Nogueira, agradeço por ter cuidado de mim mesmo de longe, por ter sempre um bom conselho e um ombro amigo, mas principalmente por ser inspiração de força e superação.

Agradeço ao meu amor, meu eterno namorado, razão do meus sorrisos mais sinceros, meu noivo, Higor Henrique Cogo, que esteve comigo durante toda essa caminhada, me dando forças e trazendo leveza ao meu dias. Meu conselheiro, minha base e meu maior incentivador. Obrigada por nunca deixar eu desistir e tornar os meus sonhos os seus. Tenho certeza que esse é o início de uma longa história contigo. Te amarei de janeiro a janeiro, e te espero na área do nosso sitiozinho vendo o pôr do sol todos os dias até o último.

Agradeço aos meus familiares, família Nogueira, por todo o apoio, por todos os abraços e orações, e por mesmo de longe preenchem meu coração com amor. Agradeço em especial o Tio Júlio que deu a primeira oportunidade de experiência cirúrgica e sempre

acreditou em mim. E a minha tia Inês que não está mais entre nós, mas tenho certeza que se orgulha muito de quem eu me tornei. Amo a minha família como a mim mesma.

Agradeço a família do meu noivo, que se tornou a minha também, obrigada pelos momentos de alegria e diversão, pelos almoços em família e o carinho de sempre, em especial das minhas sobrinhas Mavi e Maitê, e a minha sogra Neli Cogo, que sempre me cuidou e me ajuda em tudo. Eu me senti acolhida por todos vocês desde o primeiro dia, e talvez nem tenha ideia do quanto já me ajudaram nos dias em que um abraço muda tudo.

Aos meus amigos de infância, Iohana Maria Liebman, Maria Eduarda Mendes, Paulo Kurylo, Milena Bianca Nava e Tainá Veloso, agradeço por caminharem comigo até aqui, por me amar e vibrar com as minhas conquistas, vocês estarão sempre em meu coração.

Agradeço ao grupo Celso LTDA, minhas amigas da faculdade, parceiras de dividir o carro, a graduação e agora a vida. A Luísa Pereira Zacchi, qual encontrei no primeiro dia da faculdade e foi a minha vizinha por quatro anos me mantendo firme nos dias difíceis com muito chazinho e amor. A Mariana Casagrande que me ajudou a estudar para as recuperações, me ensinou que sopa pode ser sim janta e sempre teve uma palavra amiga. A Sarah Vieira que tem um coração incrível e é a maior parceira pra tudo, inclusive para andar de carro, e me apoiou nos planos mais malucos. E a Daniela Savi, mas conhecida como tia Dani, que sempre manteve todas nós do grupo firme, foi uma mãezona pra mim, me acompanhou a idas ao médico, escutou meus choros, passou perrengues comigo, choramos por notas e também comemoramos por elas, minha eterna dupla da faculdade. Nós conseguimos! Vocês meninas transformaram aqui o meu lar, fizeram das suas casas a minha, e me trouxeram paz para alma, risadas sinceras e abraços verdadeiros, eu amo muito cada uma e agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de fazer parte de suas trajetórias.

Ao grupo do projeto de Extensão GERFUS e RUB, onde fiz amizades, encontrei o amor da minha vida e aprendi muito academicamente. Foi responsável pelo início do TCC e reviveu o sonho de trabalhar com ruminantes. Em especial a Mestranda Maria por toda a ajuda e o Davi que me auxiliou em momentos de desespero e me orientou a percorrer o melhor caminho, tenho certeza que será um ótimo Dr, você tem um coração gigante. A minha professora Dr Maiara Blagitz, por me orientar e dar todo o suporte durante a minha jornada até aqui.

A Universidade Federal da Fronteira Sul, a todo o corpo docente e técnicos. Esse sonho só foi possível por conta de vocês.

A cidade de Realeza, por ter o pôr do sol mais lindo do mundo e os melhores natais e por ser minha casa por esses cinco anos de faculdade.

Agradeço também a mim, por ter enfrentado os dias difíceis e confiado em Deus. É justo que muito custe o que muito vale, e valeu a pena chegar até aqui.

Por fim, deixo uma frase de Antoine de Saint-Exupéry, que meu amigo Davi Assenheimer citou e me marcou muito, “Sou um pouco de todos que conheci, um pouco dos lugares que fui, um pouco das saudades que deixei e sou muito das coisas que gostei”.

“Seja forte e corajoso; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.” Josué 1:9

ANÁLISE DA INTERAÇÃO DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA SOBRE CÉLULAS SOMÁTICAS E PARÂMETROS LÁCTEOS

Jhulie Cristiani Nogueira^{1*}
Maiara Garcia Blagitz^{2**}

RESUMO

A indústria leiteira cresce cada vez mais no Brasil e destaca-se pela alta produção, fato que classifica o país como um dos principais produtores de leite. Um ponto a ser observado é a composição do leite, pois a indústria está cada vez mais atenta ao teor de proteína e gordura, além da contagem de células somáticas (CCS). Visto que esses parâmetros afetam o rendimento e qualidade dos derivados lácteos. Entre os fatores que afetam a qualidade do leite, estão doenças de caráter crônico, como a Leucose Enzoótica Bovina (LEB). Animais positivos podem desenvolver imunossupressão, aumentando a susceptibilidade a novas doenças, como a mastite. Essa alteração do organismo prejudica a saúde da glândula mamária, e ocasiona a redução da quantidade e qualidade da composição do leite. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi testar animais para LEB, através do teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), com relação a idade (primíparas ou múltiparas) das vacas, contagem de células somáticas (CCS) e qualidade do leite. Para isso, foram escolhidas 52 fêmeas bovinas leiteiras de um rebanho do sudoeste do Paraná, de forma aleatória, para encontrar a prevalência da LEB e realizar análise de amostras de leite, quanto a CCS, gordura, proteína e sólidos totais. O resultado do teste IDGA apresentou uma prevalência de 76,92% da doença no rebanho avaliado. A maior positividade foi em vacas múltiparas. Não houve nenhuma diferença estatística significativa entre animais positivos e negativos para LEB quando avaliados os sólidos totais, gordura ou CCS. Foram encontradas diferenças significativas na composição de proteína do leite, entre animais positivos e negativos para LEB. Conclui-se que o presente estudo demonstrou uma alta prevalência da LEB na propriedade sendo mais comum em vacas de maior idade, o que reforça a relação da doença com o tempo de exposição. Embora não tenham sido encontrados resultados estatisticamente significativos que associem a doença com a CCS ou compostos lácteos, destaca-se a importância do diagnóstico precoce e da erradicação da enfermidade no rebanho.

Palavras-chave: Glândula mamária. Imunodifusão em Gel de Ágar. Imunossupressão. Leite. Leucemia bovina.

ABSTRACT

The dairy industry is growing increasingly in Brazil and stands out for its high production, which classifies the country as one of the main milk producers. One point to be noted is the composition of milk, as the industry is increasingly attentive to protein and fat content, as well as somatic cell count (SCC). These parameters affect the yield and quality of dairy products. Among the factors that affect milk quality are chronic diseases, such as Bovine Enzootic Leukosis (BEL). Positive animals can develop immunosuppression, increasing susceptibility to new diseases, such as mastitis. This alteration in the body harms the health of the mammary gland and leads to a reduction in both the quantity and quality of milk composition. In this sense, the objective of the present study was to test animals for BEL through the Agar Gel Immunodiffusion test (AGID), concerning the age (first-calvers or multiparous) of the cows, somatic cell count (SCC), and milk quality. For this purpose, 52 dairy female bovines from a herd in southwestern Paraná were randomly selected to determine the prevalence of BEL and to analyze milk samples regarding SCC, fat, protein, and total solids. The results of the AGID test showed a prevalence of 76.92% of the disease in the evaluated herd. The highest positivity was found in multiparous cows.

1* Discente do curso de Medicina Veterinária - Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza. E-mail: jhulie.nogueira@estudante.uffs.edu.br

2** Professora Efetiva do curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza. E-mail: maiara.azevedo@uffs.edu.br

No statistically significant differences were observed between positive and negative animals for BEL when total solids, fat, or SCC were evaluated. Significant differences were found in the protein composition of milk between positive and negative animals for BEL. It is concluded that this study demonstrated a high prevalence of BEL on the property, being more common in older cows, which reinforces the relationship between the disease and the duration of exposure. Although no statistically significant results were found associating the disease with SCC or dairy compounds, the importance of early diagnosis and the eradication of the disease in the herd is emphasized.

Keywords: Mammary gland. Agar gel immunodiffusion. Immunosuppression. Milk. Bovine leukemia. Agar gel immunodiffusion; Bovine Leukemia; Health; Conception rate.

1 INTRODUÇÃO

O setor lácteo cresce cada vez mais no Brasil, que ocupa uma posição de destaque entre os principais produtores de leite do mundo. No país, a produção de leite é cada vez mais competitiva e exige atenção a fatores que afetam a qualidade do leite. Sabe-se que vacas leiteiras, são geneticamente selecionadas para alta produção e enfrentam maior carga metabólica, tornando mais susceptíveis a doenças infectocontagiosas, como a Leucose Enzoótica Bovina (LEB). Essa vulnerabilidade também está relacionada com intenso manejo dos animais, principalmente a sistemas intensivos e semi-intensivos (Meirelles-Bartoli e Sousa, 2013).

A LEB ou Leucemia Bovina, é causada por um vírus da família Retroviridae, gênero Deltaretrovírus. É uma doença de caráter crônico, infeccioso e altamente contagioso, que acontece naturalmente em bovinos (Hirsch, Leite, 2016; Kuczewski, 2021; Venables e Lucas, 2008). Considerada silenciosa nos rebanhos leiteiros, possui um período de latência muito extenso, e não apresenta sinais clínicos na maioria dos animais infectados (Andreolla *et al.*, 2018; Sajiki *et al.*, 2022).

A transmissão da LEB pode ocorrer por três vias principais. A transmissão natural ocorre pela presença de células infectadas no sangue, especialmente em situações como o parto. A transmissão artificial ocorre de forma iatrogênica, como o uso de materiais necessários mal esterilizados ou a reutilização de agulhas em aplicações de medicamentos ou coletas sanguíneas (Monti, Schrijver e Beier, 2005). Já a transmissão lateral, embora menos relacionada, depende de vetores mecânicos, como insetos tabanídeos. Além disso, há a detecção de DNA proviral e antígenos virais em fluidos como sêmen, leite e colostro (Dus Santos *et al.*, 2016; Venables e Lucas, 2008).

A LEB pode se apresentar de três fases diferentes, sendo elas: a fase alinfocítica, linfocitose persistente e a fase tumoral (Konishi *et al.*, 2019). Os sinais clínicos que podem ser observados nos animais, dependem da localização dos linfossarcomas. Normalmente incluem

distúrbios cardiorrespiratórios, digestivos, reprodutivos, inapetência, fraqueza, perda de peso, debilidade geral, podendo levar a casos neurológicos. Os linfonodos ficam reativos, e podem se apresentar aumentados (Silva *et al*, 2008; Pereira, 2013).

Os animais acometidos podem ser descartados precocemente por problemas ocasionados pela doença como queda na produção leiteira, ou doenças subjacentes geradas pela imunossupressão. Além disso, é importante ressaltar que o animal infectado pode ser uma fonte de disseminação da doença no rebanho (Braga, Van Der Laan, 2001; Silva *et al.*, 2008; Pereira, 2013).

O diagnóstico pode ser feito pelo método de Polimerase Chain Reaction (PCR), através da utilização do soro dos animais suspeitos por Imunodifusão de gel de ágar (IDGA) e pela utilização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Contudo, tanto o IDGA quanto o ELISA têm possibilidade de resultados falsos-negativos, relacionados à quantidade de anticorpos presentes nas amostras de soro, de animais até seis meses, alimentados com colostro de mães soropositivas e animais recentemente infectados. Já o PCR ainda sim, pode se tornar falso-positivo por conta de erros na coleta ou laboratoriais. (Hirsche, Leite, 2016).

Até o momento não há tratamento, porém alguns autores ainda estudam ações benéficas de fármacos em animais positivos (Sajiki *et al* 2019), e ainda não há vacina comercial para a LEB (Woah, 2018). Contudo, boas práticas sanitárias e de biossegurança devem ser integradas ao manejo, e a utilização de testes sorológicos periódicos nos animais podem auxiliar no controle e erradicação da doença no rebanho (Hirsch; Leire, 2016; Kuczewski *et al.*, 2021).

Estudos descrevem que há relação entre o vírus da LEB com disfunções imunológicas, ocasionando prejuízo à saúde dos animais, aumentando a incidência de doenças reprodutivas, diminuição da produção leiteira e perda do ganho de carcaça (Nakada *et al.*, 2022; Narciso *et al.*, 2020, Ott; Johnson; Well, 2003). Ademais, a imunossupressão induzida, pode predispor a doenças subjacentes, principalmente de origem infecciosa (Watanabe *et al.*, 2019).

Para que o organismo do animal obtenha uma resposta frente a infecção, é necessária uma imunidade mediada por células para eliminar os microrganismos invasores. Sabe-se que a LEB reduz a resposta do sistema imunológico, o que torna a glândula mamária mais vulnerável a infecções como a mastite (Della Libera *et al.*, 2015). A partir da entrada do agente na glândula mamária, o organismo do animal induz uma reação inflamatória com o objetivo de reparar os danos causados e neutralizar as toxinas produzidas (Alves; Moreira, 2021).

O aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS) ocorre como indicador de uma resposta inflamatória, devido a afecção da glândula mamária, como os neutrófilos e células epiteliais que são eliminados no leite (Edmondson, Bramley, 2008). Consequentemente, quando se tem um declive no sistema imunológico, este também altera o metabolismo animal podendo prejudicar a saúde geral da glândula mamária, e consequentemente a redução na produção de leite, bem como a sua composição, como menores níveis de gordura, proteínas e lactose (Bartlett, 2013; Spinola, *et al.*, 2013; Della libera *et al.*, 2013; Azedo *et al.*, 2008).

Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar a presença de LEB em um rebanho leiteiro do sudoeste do Paraná, utilizando o teste de IDGA, e investigar sua associação com a CCS e parâmetros de composição do leite, como gordura, proteína e sólidos totais. Além disso, explorou-se a presença da LEB em diferentes faixas etárias relacionando às variações na qualidade do leite, com foco na linearidade dos compostos lácteos em animais jovens em comparação com as vacas mais velhas. O estudo também buscou contribuir para uma melhor compreensão do impacto da LEB sobre a saúde dos rebanhos leiteiros e a qualidade do leite produzido, oferecendo subsídios para o manejo sanitário e a melhoria da produção leiteira em rebanhos afetados pela doença.

2 METODOLOGIA

2.1 ORIGEM DOS DADOS E APROVAÇÃO ÉTICA

Os dados utilizados para a realização do atual trabalho foram derivados de outras duas pesquisas aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS. Do primeiro intitulado “Incidência de Leucose Enzoótica Bovina no Sudoeste do Paraná aplicado a diferentes métodos de diagnóstico” sob nº 9386210722 (trabalho 1) retirou-se a identificação e resultados dos animais testados para LEB, utilizando como método de diagnóstico o IDGA. O segundo trabalho intitulado "Biotecnologia aplicada à saúde animal: Biomarcadores inflamatórios, variabilidade da frequência cardíaca e índices cardiovagal e cardiosimpático (CSI) como ferramentas diagnósticas para predição de mastite bovina" sob nº 4329120422 (trabalho 2), forneceu os dados dos componentes do leite e CCS de três meses consecutivos realizados pelo Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros (PARLEITE) da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), através do Laboratório Centralizado de Análise de Leite do PARLPR (Curitiba - Paraná, Brasil).

2.2 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado entre verão, outono e início do inverno, entre os dias 20 de Dezembro de 2022 a 31 de Agosto de 2023, na Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Realeza e em uma fazenda leiteira do Sudoeste do Paraná (25°47'40.0"S 53°19'37.6"W), com a produção média de leite por vaca de 10.500kg ao ano. Os critérios para seleção da propriedade se basearam em ser um sistema de produção confinado, com dieta equilibrada, realizando manejos reprodutivos, vacinais e de ordenha com todos os animais de forma constante. Durante todo o experimento os animais foram alojados em sistema de confinamento tipo *Free-Stall* com cama de maravalha, em condições ambientais estáveis.

O manejo de ordenha dos animais aconteceu três vezes ao dia, sendo às 6 horas da manhã, às 14 horas da tarde e às 22 horas da noite, realizado por dois colaboradores. Além do mais, a propriedade conta com assistência veterinária na parte de reprodução, nutrição, clínica médica e cirúrgica. Os animais recebiam ração mista total (TMR) balanceada, três vezes ao dia, suprimindo as necessidades energéticas, proteicas, de mineral e vitaminas de uma vaca holandesa de 550 Kg com produção média de 40 Kg de leite diariamente. Porém durante o experimento os animais sofreram com ajustes na dieta, o que fez com houvesse mudanças semanalmente na alimentação, ate alcançar o equilíbrio novamente.

2.3 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados dados de 52 vacas de raça holandesa, pelagem preta e branca e com ao menos uma lactação, de um rebanho de 188 animais. Como critérios de inclusão, foram considerados os que tiveram ao menos uma gestação, estivessem em lactação, tenham sido testados para LEB e que possuíssem análises dos componentes do leite e CCS por três meses consecutivos. Já como critérios de exclusão, foram retirados da pesquisa, animais que não possuíam dados completos sobre a análise do leite nos três meses, animais que não foram testados para LEB, animais doentes, animais em uso de medicamentos e nulíparas.

Os animais foram divididos inicialmente em dois grupos: Animais Positivos para Leucose (APL) e Animais Negativos para Leucose (ANL), com objetivo de analisar a relação estatística entre os grupos sobre os componentes do leite e a CCS. Posteriormente, estes grupos foram subdivididos conforme o número de gestações, ou seja, em primíparas e múltíparas. Logo, formaram-se os grupos: Primíparas Positivas para Leucose (PPL),

Primíparas Negativas para Leucose (PNL), Multíparas Positivas para Leucose (MPL) e Multíparas Negativas para Leucose (MNL).

2.4 COLETA DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS

9

A coleta das amostras sanguíneas foi realizada durante o (trabalho 1), em um único momento no mês de dezembro. Inicialmente realizou-se antissepsia com álcool 70° na região de coleta. Em seguida utilizou-se agulha individual estéril e tubos cilíndricos estéreis de coleta de sangue a vácuo com capacidade de 4 ml sem anticoagulante. Após a identificação do tubo as amostras eram acondicionadas em caixas isotérmicas com temperatura de 4°C e levadas até o Laboratório de Análises Clínicas da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU) da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 5000 RPM por 10 minutos com o objetivo de obter o soro, o qual foi armazenado em freezer convencional com temperatura média -19°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) para análise no teste diagnóstico de IDGA.

2.5 COLETA DE AMOSTRAS DE LEITE

As coletas das amostras de leite foram realizadas sobre o (trabalho 2) durante três meses consecutivos. Sendo coletadas as amostras na sala de ordenha da propriedade, antes dos animais serem ordenhados. Após os animais identificados entrarem para serem ordenhados, iniciou-se os procedimentos com a higienização dos tetos em solução *pré-dipping*, realizando em seguida o teste da caneca de fundo preto descartando os três primeiros jatos e os avaliando observando a cor, consistência e ou presença de grumos, seguindo os critérios descritos por Birgel (2014).

Posteriormente, realizou-se uma segunda higienização dos tetos também com *pré-dipping*, o qual ficou agindo por 30 segundos e retirado em seguida com auxílio de toalhas de papel descartáveis. As amostras de leite de cada quarto mamário foram colhidas em frascos transparentes com tampa vermelha contendo conservante brononata, e armazenados em caixas isotérmicas com temperatura em 4°C destinadas em até 24 horas após a coleta ao Laboratório Centralizado de Análise de Leite do PARLPR (Curitiba, Paraná, Brasil).

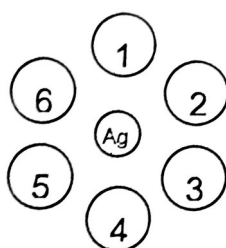
As amostras foram analisadas quanto a Contagem de Células Somáticas (CCS) (citometria de fluxo, ISO 13366-2, IDF 148-2), gordura, proteína e sólidos totais (infravermelho, ISO 9622/ IDF 141). Fatores como lactose, extrato seco desengordurado, e teor de nitrogênio ureico não foram consideradas para o presente estudo.

2.6 IMUNODIFUSÃO EM ÁGAR GEL

O teste de IDGA foi realizado no (trabalho 1) utilizando o kit Teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) (IDvet BLV AGID- ID.VET, Grabels, França) para detecção de anticorpos LEB anti-gP51 em soro e plasma bovino seguindo os passos descritos abaixo conforme a recomendação do fabricante. Utilizou-se o antígeno do vírus da LEB, um controle positivo e o gel de ágar (200 mL). O antígeno e o controle positivo necessitaram ser reconstituídos com 2 e 3 mL de água destilada. Já o gel de Ágar, necessitou apenas ser derretido em um forno microondas até ficar transparente, porém, necessitou aguardar o resfriamento em temperatura ambiente até que chegasse a temperatura de 45-50°C para que não houvesse evaporação.

Com o antígeno e o controle positivo restituídos e o gel de Ágar derretido e na temperatura adequada, os materiais foram levados a uma capela de fluxo laminar e iniciou-se a preparação do meio para receber as amostras. Para isso, o gel de Ágar foi distribuído em 15 placas de Petri de 80 mm de diâmetro e aguardou-se a sua solidificação. Posteriormente com o auxílio de um cortador de IDGA de sete poços, as placas foram marcadas três vezes segundo a recomendação do fabricante (Figura 1). O poço central recebeu 32μL do antígeno, o poço 1 e 4 paralelos, receberam 73μL de controle positivo, enquanto os poços 2, 3, 5 e 6 receberam as amostras a serem testadas.

Figura 1– Esquema da marcação realizada nas placas de Petri com gel de Ágar e identificação dos poços propostos pelo fabricante.

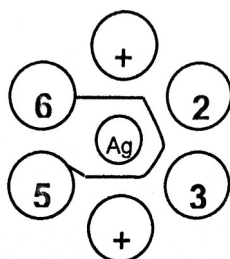


Fonte: Innovative Diagnostics, (2015).

As placas foram levadas a uma incubadora Biochemical Oxygen Demand (BOD) com temperatura controlada 21°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) e umidificada. Os testes permaneceram incubados por 72 horas, e em seguida foi feita a leitura. Considerou-se resultado “positivo” as amostras que, da mesma maneira que os controles positivos, apresentaram uma linha de precipitação (demonstrado abaixo pelos poços 2 e 3). Para resultado negativo, considerou-se quando não

houve a formação da linha de precipitação (demonstrado pelos poços 5 e 6). E por fim, os resultados considerados indeterminados foram a partir da observação de uma fraca reação antígeno-anticorpo, não sendo suficiente para formar uma linha de precipitação completa (Figura 2).

Figura 2– Esquema de representação para interpretação dos resultados depois de 72 horas, como proposto pelo fabricante



Fonte: Innovative Diagnostics, (2015).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 9.0® (GraphPad Software, Dotmatics, Boston, Massachusetts, EUA). Todos os dados foram digitados em uma base de dados e verificados duas vezes para erros de entrada. A Contagem de Células Somáticas, Gordura total, Proteína total e Sólidos totais foram classificados como dados quantitativos contínuos. Assim, considerando o Teorema Central do Limite, não necessitaram passar por teste de normalidade. Foi realizado teste *t* independente com cada uma das variáveis, comparando os resultados entre grupos positivos e negativos para leucose.

Devido a assimetria dos dados da CCS, estes foram transformados para logaritmo de base 10, podendo assim ser analisados com maior precisão pelos métodos estatísticos empregados.

Os conjuntos de dados que foram classificados em mais de dois grupos foram também submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram analisados com o teste de análise de variância unifatorial não pareado, enquanto dados não-paramétricos, foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. As variáveis não paramétricas Mann-Whitney O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 52 animais da raça Holandesa avaliados pelo teste IDGA, 40 animais apresentaram resultado positivo para Leucose (APL) e 12 animais negativos para Leucose (ANL). Dos resultados positivos, 28 eram vacas multíparas (MPL) e 12 eram vacas primárias (PPL). Quanto aos resultados negativos, 6 eram multíparas (MNL) e 6 eram primárias (PNL), como apresentado na Tabela 1. Conforme os achados supracitados, caracteriza-se uma alta prevalência da doença (76,92%) entre os animais avaliados, de acordo com os critérios de prevalência do rebanho propostos por Shettigara, Samagh e Lobinowich (1986).

Quando os animais foram subdivididos, observou-se que as vacas multíparas demonstraram uma prevalência de 82,35% de LEB, enquanto as primíparas 66,67% de prevalência. Assim, tanto a prevalência total da doença quanto as taxas observadas nos subgrupos apresentam valores numericamente mais elevados. Isso sugere que a LEB é mais frequente em vacas com múltiplas gestações, ou seja, em animais que permanecem por mais tempo nos rebanhos.

Sugere-se que os dados apresentados anteriormente estão de acordo com as afirmações de Meirelles *et al.*, (2019), Barros Filho *et al.* (2010), os quais destacam que animais mais velhos, devido maior exposição ao longo dos anos às práticas de manejo intenso, apresentam uma taxa de infecção mais alta. Já quanto a alta taxa de positividade em primíparas, acredita-se que assim como descrito por Kuczewski *et al.* (2021), protocolos zootécnicos como vacinação e brincagem nos animais desde muito jovens além de manejos reprodutivos podem aumentar as taxas de infecção precocemente em todo o rebanho.

Tabela 1 – Resultados da análise de IDGA para detecção de anti-gP51 de acordo com a divisão dos grupos.

Resultado IDGA	Nº de animais	Multíparas	Primíparas
Positivo	40 (76,92%)	28 (82,35%)	12 (66,67%)
Negativo	12 (23,08%)	6 (17,65%)	6 (33,33%)
Total	52 (100%)	34 (100%)	18 (100%)

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O APL apresentou uma média de CCS de $5,506 \pm 1,054$ em dezembro, $5,560 \pm 0,824$ em janeiro, e $5,904 \pm 0,720$ em fevereiro. Já o ANL apresentou a média de CCS de $5,506 \pm 1,054$ em dezembro, $5,560 \pm 0,824$ em janeiro e $5,904 \pm 0,720$ em fevereiro (Tabela 2). Apesar do APL apresentar resultados numericamente maiores que o grupo ANL nos três meses avaliados, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada.

Tabela 2 – Resultados encontrado na contagem de células somáticas mensal, separados por grupo experimental.

Grupo	Nºanimais	Contagem de células somáticas mensal (Log 10 ²)		
		Dezembro	Janeiro	Fevereiro
APL	40	$5,506 \pm 1,054^a$	$5,560 \pm 0,824^a$	$5,904 \pm 0,720^a$
ANL	12	$5,294 \pm 0,896^a$	$5,321 \pm 0,955^a$	$5,283 \pm 0,929^a$

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Legenda: APL: Animais Positivos para Leucose; ANL: Animais Negativos para Leucose. ^a : a diferença entre os valores médios dos grupos APL e ANL marcados com letras iguais não foi estatisticamente significativa, considerando-se $p < 0,05$.

Ao dividir as primíparas em subgrupos têm-se os seguintes resultados de média da contagem de CCS mensal. O grupo PPL (12 animais) no mês de dezembro $5,052 \pm 1,581$, janeiro $5,372 \pm 0,937$ e fevereiro $5,207 \pm 0,808$. O grupo PNL (6 animais) apresentou no mês de dezembro $5,656 \pm 0,572$, janeiro $5,372 \pm 0,937$ e $5,207 \pm 0,808$ em fevereiro. Já o grupo MPL (28 animais) obteve $5,701 \pm 0,674$ em dezembro, $5,643 \pm 0,772$ em janeiro e $5,473 \pm 0,916$ em fevereiro. O grupo de MNL (6 animais) apresentou $4,932 \pm 1,065$ em dezembro, $5,130 \pm 1,130$ janeiro e $5,263 \pm 1,255$ em fevereiro (tabela 3). Como já comentado durante os resultados dos grupos APL e ANL, confirma-se na tabela abaixo que mesmo redistribuindo os animais em subgrupos não se encontrou diferença estatística significativa na média da CCS.

Tabela 3 – Resultados encontrado na contagem de células somáticas mensal, separados por subgrupo experimental.

Grupo	Nºanimais	Contagem de células somáticas mensal (Log 10 ²)		
		Dezembro	Janeiro	Fevereiro
PPL	12	5,052±1,581 ^a	5,372±0,937 ^a	5,207±0,808 ^a
PNL	6	5,656±0,572 ^a	5,512±0,803 ^a	5,296±0,780 ^a
MPL	28	5,701±0,674 ^a	5,643±0,772 ^a	5,473±0,916 ^a
MNL	6	4,932±1,065 ^a	5,130±1,130 ^a	5,263±1,255 ^a

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Legenda: PPL: Primíparas Positivas para Leucose; PNL: Primíparas Negativas para Leucose; MPL: Multíparas Positivas para Leucose; MNL: Multíparas Negativas para Leucose. ^a : a diferença entre os valores médios dos grupos PPL, PNL, MPL e MNL marcados com letras iguais não foram estatisticamente significativa, considerando-se $p < 0,05$.

Pode-se inferir diferentes hipóteses para entender os resultados numericamente superiores aos apresentados anteriormente, como estado inflamatório, e situação imunológica do grupo APL e MPL. O que concorda com as observações de Mendes *et al.* (2020), que afirmam que animais positivos para LEB possuem menor quantidade de células de defesa na mama, gerando menor eficiência da defesa frente a novas infecções, explicando assim a diferença numérica observada quando avaliado os dois grupos em relação aos demais.

Fatores como manejo inadequado nas camas de *Free-Stall*, estresse térmico, manejos intensos e demorados, e mudanças recorrentes na dieta total estão relacionados à ambiência da propriedade e estreitamente ligados ao bem-estar animal e a instauração da imunidade do rebanho. Estes fatores podem ter gerado uma ligação com os resultados apresentados anteriormente, corroborando com as afirmações de Da Silva e Vidal (2021) e Souza; Nogueira e Carvalho (2023).

A média de CCS é considerada uma forma de avaliar tanto a qualidade do leite, quanto o estado de saúde da glândula mamária de um animal ou rebanho, sendo que segundo a Instrução Normativa 76 e 77 da Secretaria da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento (MAPA), 500.000 células/ mL é atualmente permitida. É possível notar que a média de CCS tanto nos grupos quanto nos subgrupos está bastante elevada, em sua maioria, maior que a média permitida, o que corrobora com a hipótese anterior, além de adicionar outras causas, como predomínio de animais de idade avançada no rebanho.

Os dois pontos citados anteriormente estão interligados, visto que vacas multíparas naturalmente possuem aumento da CCS devido a exposição a quadros de mastite e a maior descamação celular da glândula mamária, ressaltando que as maiores médias foram encontradas no grupo MPL. Este achado concorda com as observações feitas por Ribeiro; Caliman, e Gasparotto (2023), os quais relatam que quanto mais lactações os animais possuem, maior foi a CCS. Outrossim, em contradição a estes autores, neste estudo, não houve diferença estatística entre primíparas e multíparas, o que sugere que a celularidade encontrada nas amostras de leite em todos os grupos possui maior relação com aspectos ligados a propriedade do que sobre a infecção pela LEB, resultado que discorda das observações feitas por Mendes *et al.*, (2019).

Quanto à análise de gordura mensal, o grupo APL apresentou uma média de $5,506 \pm 1,054$ no mês de Dezembro, $5,560 \pm 0,824$ no mês de Janeiro e $5,904 \pm 0,720$ em Fevereiro. Já o ANL apresentou média de $1,746 \pm 1,921$ em Dezembro, $1,326 \pm 0,436$ em Janeiro e $1,543 \pm 0,721$ em Fevereiro (Tabela 4). Ao serem comparados, o grupo APL apresentou a média na análise de janeiro numericamente superior ao ANL, porém, não houve nenhuma diferença estatística relevante, seja para o mês de dezembro, janeiro ou fevereiro.

Tabela 4 – Resultados encontrados na análise de gordura mensal, separados por grupo experimental.

Grupo	Nºanimais	Análise de gordura mensal		
		Dezembro	Janeiro	Fevereiro
APL	40	$1,989 \pm 2,211^a$	$2,072 \pm 1,883^a$	$1,755 \pm 0,649^a$
ANL	12	$1,746 \pm 1,921^a$	$1,326 \pm 0,436^a$	$1,543 \pm 0,721^a$

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Legenda: APL: Animais Positivos para Leucose; ANL: Animais Negativos para Leucose. ^a : a diferença entre os valores médios dos grupos APL e ANL marcados com letras iguais não foram estatisticamente significativa, considerando-se $p < 0,05$.

Quando os animais foram redistribuídos em subgrupos, a média encontrada no grupo de PPL foi de $1,663 \pm 0,518$ em dezembro, $2,120 \pm 2,127$ em janeiro e $1,663 \pm 0,518$ em fevereiro. No grupo PNL a média foi de $1,417 \pm 0,519$ em dezembro, $1,287 \pm 0,473$ janeiro e

1,417±0,519 em fevereiro. O grupo MPL apresentou a média de 1,820±0,717 em dezembro, 2,050±1,808 em janeiro e 1,820±0,7172 em fevereiro. E por fim o MNL dispõe da média de 1,733±1,015 em dezembro, 1,365±0,436 em janeiro e de 1,733±1,015 em fevereiro (Tabela 5). Sendo assim, mesmo que alguns valores sejam numericamente superiores a outros, quando comparados os grupos e os meses, não houve diferença estatística significativa considerando $p < 0,05$.

Tabela 5 – Resultados encontrados na análise de gordura mensal separados por subgrupo experimental.

Grupo	Nºanimais	Análise de gordura mensal do leite		
		Dezembro	Janeiro	Fevereiro
PPL	12	1,663±0,518 ^a	2,120±2,127 ^a	1,663±0,518 ^a
PNL	6	1,417±0,519 ^a	1,287±0,473 ^a	1,417±0,519 ^a
MPL	28	1,82±0,717 ^a	2,05±1,808 ^a	1,82±0,7172 ^a
MNL	6	1,733±1,015 ^a	1,365±0,436 ^a	1,733±1,015 ^a

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Legenda: PPL: Primíparas Positivas para Leucose; PNL: Primíparas Negativas para Leucose; MPL: Multíparas Positivas para Leucose; MNL: Multíparas Negativas para Leucose. Letras diferentes entre linhas indicam diferenças entre os grupos de primíparas, multíparas, positivas e negativas. ^a : a diferença entre os valores médios dos grupos PPL, PNL, MPL e MNL marcados com letras iguais não foram estatisticamente significativa, considerando-se $p < 0,05$.

De acordo com a padronização dos componentes do leite descrita por Paula *et al.* (2008), aplicado ao estudo atual, os resultados obtidos para o teor de gordura não se enquadraram nos padrões esperados para vacas da raça Holandesa no Paraná, cuja média é de $3,33 \pm 0,45\%$. Isso foi apresentado tanto em vacas positivas quanto negativas para LEB, assim como na subdivisão entre primíparas e multíparas.

Segundo Rosa *et al.* (2017), os fatores nutricionais desempenham um papel central na variação do teor de gordura, pois influenciam diretamente a fermentação ruminal e o tempo de ruminação. Essas alterações podem resultar em menor produção de saliva, o que reduz o pH ruminal e altera a relação entre os ácidos graxos voláteis, como acetato e propionato. Como

consequência, o metabolismo geral do animal é comprometido, afetando os níveis de produção e a composição do leite.

A troca frequente de ingredientes na dieta, bem como a falta de adaptação a esses insumos, pode ter contribuído para que os níveis de gordura não atingissem a média esperada. Estudos como o de Peres (2001) destacam a importância da relação volumoso x concentrado e da presença de fibras efetivas para manter a estabilidade ruminal, além do fornecimento adequado de gordura e aditivos. O autor explica que desequilíbrios nesses fatores podem causar distúrbios metabólicos, resultando não apenas na redução da gordura, mas também na diminuição de outros componentes do leite, como proteínas e sólidos totais.

Outro fator que pode ter influenciado a alteração da composição do leite é o clima. Embora a faixa ideal de temperatura para produção esteja entre 5°C e 25°C, considerada a zona de conforto térmico (Fonseca e Santos, 2000), o estado do Paraná apresenta grande variação térmica, expondo os animais a condições que desativam maior esforço fisiológico e frequentemente os colocam em estresse térmico. Durante o período do estudo, nos meses de verão, as temperaturas médias no sudoeste do estado atingiram entre 35°C e 37°C (Climatempo, 2023). Essa situação pode ter levado à redução na ingestão de alimentos, afetando tanto a produção quanto a composição do leite, conforme observado por Nascimento *et al.* (2014).

Quanto aos sólidos totais, o grupo APL apresentou uma média de $10,740 \pm 2,438$ em dezembro, $11,260 \pm 1,944$ em janeiro e $11,060 \pm 0,819$ em fevereiro. Já o grupo ANL apresentou médias de $10,260 \pm 2,460$ em dezembro, $10,300 \pm 0,561$ em janeiro e $10,630 \pm 0,722$ em fevereiro (Tabela 6). Mesmo considerando as variações numéricas entre os grupos e os meses, ao comparar APL e ANL, não houve diferença estatisticamente significativa nas médias de sólidos totais.

Tabela 6 – Resultados encontrados na análise de sólidos totais mensal, separados por grupo experimental.

Grupo	Nºanimais	Análise de sólidos totais mensal		
		Dezembro	Janeiro	Fevereiro
APL	40	10,740±2,438 ^a	11,160±1,944 ^a	11,060±0,819 ^a
ANL	12	10,260±2,460 ^a	10,300±0,561 ^a	10,630±0,722 ^a

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Legenda: APL: Animais Positivos para Leucose; ANL: Animais Negativos para Leucose. ^a : a diferença entre os valores médios dos grupos APL e ANL marcados com letras iguais não foi estatisticamente significativa, considerando-se $p < 0,05$.

Quando realizado a subdivisão dos grupos foram encontrados os seguintes resultados, grupo PPL do mês de dezembro 10,390±3,922, janeiro 11,200±1,814 e fevereiro 11,140±0,809. No grupo de PNL o mês de dezembro apresentou 10,300±3,641, o mês de janeiro 10,400±0,718 e fevereiro com 10,550±0,641. Já no grupo de MPL em dezembro resultou em 10,890±1,497, janeiro 11,140±2,032 e fevereiro 11,040±0,857. O grupo MNL teve em dezembro 10,220±0,238, janeiro 10,190±0,389 e fevereiro 10,750±0,922 (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultados encontrados na análise de sólidos totais mensal, separados por subgrupo experimental.

Grupo	Nºanimais	Análise de Sólidos Totais mensal do leite		
		Dezembro	Janeiro	Fevereiro
PPL	12	10,390±3,922 ^a	11,200±1,814 ^a	11,140±0,809 ^a
PNL	6	10,300±3,641 ^a	10,400±0,718 ^a	10,550±0,641 ^a
MPL	28	10,890±1,497 ^a	11,140±2,032 ^a	11,040±0,857 ^a
MNL	6	10,220±0,238 ^a	10,190±0,389 ^a	10,750±0,922 ^a

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Legenda: PPL: Primíparas Positivas para Leucose; PNL: Primíparas Negativas para Leucose; MPL: Multíparas Positivas para Leucose; MNL: Multíparas Negativas para Leucose. ^a : a diferença entre os valores médios dos grupos PPL, PNL, MPL e MNL marcados com letras iguais não foram estatisticamente significativa, considerando-se $p < 0,05$.

Como não há possibilidade de se ter todo o grupo de animais em um mesmo período da lactação, há animais com dias em lactação (DEL) baixo e animais com DEL alto. Logo, como descrito por Nero & Moreira (2015), os sólidos totais estão mais concentrados no início e fim da lactação, pois é quando o volume de leite é produzido em menor quantidade, havendo maior concentração de componentes. Isso pode explicar a variação dos sólidos nos meses avaliados pelo estudo. Porém, outra hipótese é que, por mais que não se encontrou diferença estatística, as maiores médias ficaram com os grupos positivos para LEB, concordando também com as anotações de Mendes *et al.*, (2019), que descreve que animais positivos tendem a produzir menor quantidade de leite, aumentando assim a porcentagem de sólidos totais, além de voltar a corroborar com Nero & Moreira (2015).

A média da análise de proteína mensal apresentou no grupo APL em dezembro 3,429±0,304, e no mês de janeiro 3,464±0,326, 3,656±0,259 em fevereiro. Já o grupo ANL apresentou 3,290±0,339 no mês de dezembro, 3,352±0,310 no mês de janeiro e 3,432±0,214 no mês de fevereiro (Tabela 8). Ao comparar o resultado da média da análise de proteína do mês de dezembro do grupo APL com o resultado do mês de fevereiro do mesmo grupo, houve diferença estatística ($p = 0,021$), ou seja, o valor de proteína foi mais elevado no mês de dezembro.

Tabela 8 – Resultados encontrado na análise de proteína mensal separados por grupo experimental.

Grupo	Nºanimais	Análise de proteína mensal		
		Dezembro	Janeiro	Fevereiro
APL	40	3,429±0,304 ^b	3,464±0,326 ^a	3,656±0,259 ^{bcd}
ANL	12	3,290±0,339 ^c	3,352±0,310 ^d	3,432±0,214 ^a

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Legenda: APL: Animais Positivos para Leucose; ANL: Animais Negativos para Leucose. a, b, c, d : a diferença entre os valores médios dos grupos APL e ANL marcados com letras diferentes é estatisticamente significativa, considerando-se $p < 0,05$.

Pelo fato de ocorrer no grupo das vacas positivas para LEB, esta diferença pode ser atribuída a uma série de fatores, como genética, idade, ambiente, estresse, presença de doenças crônicas e qualidade dos alimentos (Allaband *et al.*, 2019; Miyoshi *et al.*, 2018; Uchiyama, *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2024). Além disso o ajuste da dieta ocorria de forma mensal, e adicionado aos outros fatores pode ser a explicação da diferença apresentada anteriormente.

Encontrou-se também diferença estatística significativa quando comparado o resultado do mês de fevereiro do grupo APL e o mês de dezembro do grupo ANL ($p = 0,0056$), ou seja, ANL apresentou média menor quando comparado ao APL. Ainda sobre a análise de proteína o APL no mês de fevereiro quando comparado com ANL no mês de janeiro também apresentou diferença significativa ($p = 0,03668$). Neste dois últimos casos apresentados, onde a média de proteína se mostrou maior em animais positivos do que em negativos, além de também poderem ter sido resultado dos fatores supracitados, vai contra as observações feitas por diversos autores (Konnai *et al.*, 2017; Lo *et al.*, 2021; Uchiyama *et al.*, 2020) que afirmam que infecções causadas por retrovírus como a LEB, geram modulação da microbiota principalmente intestinal de ruminantes devido a interação do vírus com o hospedeiro, gerando perda energética e afetando diretamente a produção do leite.

Quanto aos resultados derivados da subdivisão em primíparas e múltiparas, obteve-se uma média no grupo de PPL de 3,318±0,292 em dezembro, 3,419±0,270 em janeiro e 3,674±0,277 em fevereiro. No grupo PNL apresentou 3,115±0,331 em dezembro, 3,400±0,303 em janeiro e 3,430±0,280 fevereiro. Já no grupo MPL apresentou em dezembro

3,483±0,293, janeiro 3,483±0,352 e fevereiro 3,660±0,257. E o grupo MNL retratou em dezembro 3,482±0,352, janeiro 3,303±0,338 e fevereiro 3,435±0,082 (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultados encontrado na análise de proteína mensal separados por grupo experimental.

Grupo	Nºanimais	Análise de proteína mensal do leite		
		Dezembro	Janeiro	Fevereiro
PPL	12	3,318±0,292 ^a	3,419±0,270 ^a	3,674±0,277 ^c
PNL	6	3,115±0,331 ^{bc}	3,400±0,303 ^a	3,430±0,280 ^a
MPL	28	3,483±0,293 ^a	3,483±0,352 ^a	3,660±0,257 ^b
MNL	6	3,483±0,352 ^a	3,303±0,338 ^a	3,435±0,082 ^a

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Legenda: PPL: Primíparas Positivas para Leucose; PNL: Primíparas Negativas para Leucose; MPL: Multíparas Positivas para Leucose; MNL: Multíparas Negativas para Leucose. Letras diferentes entre linhas indicam diferenças entre os grupos de primíparas, multíparas, positivas e negativas. a, b, c : a diferença entre os valores médios dos grupos PPL, PNL, MPL e MNL marcados com letras diferentes é estatisticamente significativa, considerando-se $p < 0,05$.

Ao comparar o grupo PPL no mês de fevereiro com o grupo PNL no mês de dezembro, houve diferença estatística de ($p = 0,0191$). O grupo PNL de dezembro também teve diferença estatística significativa com o grupo MPL de fevereiro ($p = 0,0066$). Assim como discutido anteriormente, há muitos fatores que podem interferir na composição do leite, visto que não é possível traçar uma relação de valores médios de proteína do leite com infecção crônica por LEB, devido à complexidade do assunto e a impossibilidade de eliminar fatores adversos em uma fazenda comercial.

Apesar de encontrar diferenças numéricas nas médias descritas da CCS, sólidos totais e gordura nos três meses avaliados, acredita-se que muitos outros fatores além da infecção por LEB estão diretamente ligados a esses achados. Pois além de nenhum componente avaliado apresentar relação estatística com a doença, as observações de autores como Nero & Moreira (2015) descrevem fatores que podem explicar as diferenças encontradas, como a interferência do clima, fatores genéticos, volume produzido, condições de bem-estar e fase da lactação. Porém, apesar do exposto, as diferenças numéricas entre os grupos, concordam com os

estudos de Mendes *et al.* (2019), em que vacas positivas possuem média dos compostos do leite superiores as negativas, já que tendem a ter menor produção que as demais.

Por fim, ainda quanto à proteína, componente do leite que apresentou relação estatística, pode ser apresentada em dois cenários. Mesmo antes da subdivisão dos animais em primíparas e múltiparas, foi possível observar que houve diferença entre os meses avaliados, porém no mesmo grupo de animais, assim como entre grupos e meses. Quando analisado sob a perspectiva da diferença da média entre os meses, mas do mesmo grupo, salientam-se vários fatores que podem estar envolvidos. De outra forma, a diferença estatística de grupos diferentes, os animais positivos tiveram média de proteína do leite superiores a animais negativos para LEB. Apesar de não se ter valor da produção média de cada animal, retorna-se a observação de Mendes *et al.* (2019), que animais positivos tendem a manter menor produção, consequentemente aumentando a porcentagem de sólidos totais, gerando maior média de proteína, visto que a mesma pertence a este grupo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo demonstrou relevância sobre da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) e sua presença no ambiente leiteiro, revelando uma prevalência significativa da doença na propriedade avaliada, especialmente em vacas mais velhas, o que reforça a associação entre o tempo de exposição e a infecção. No que diz respeito à contagem de células somáticas (CCS), observou-se que as alterações estão mais relacionadas aos processos infecciosos mamários e ao manejo da ordem do que à presença do vírus da leucose bovina (VLB).

Embora os resultados encontrados estejam em concordância com diversos estudos, a relação entre LEB, CCS e os compostos lácteos apresenta uma maior complexidade. Isso ressalta a necessidade de estudos futuros que considerem um maior número de variáveis, minimizando a influência de fatores externos aos apresentados.

No entanto, este trabalho se mostrou de extrema importância, principalmente para orientar os pecuaristas sobre a dificuldade de erradicar a doença dos rebanhos e o quanto ela pode interferir na produção de leite de qualidade. O controle da LEB deve começar com boas estratégias de manejo, cuidado com materiais reutilizáveis e, especialmente, a identificação precoce de animais positivos por meio de análises laboratoriais, evitando tanto impactos no bem-estar animal quanto prejuízos econômicos para a fazenda.

REFERÊNCIAS

- ANDREOLLA, A. P.; ERPEN, L. M. S.; FRANDOLOSO, R.; KREUTZ, L. C. Development of an indirect ELISA based on recombinant capsid protein to detect antibodies to bovine leukemia virus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 68-75, 2018.
- ALVES, T.; MOREIRA, A. M. Mastite bovina: Tratamento convencional e ação de compostos extraídos de plantas. **UNICIÊNCIAS**, v. 25, n. 1, p. 20-25, 2021.
- AZEDO, M. R.; MASSOCO, O. C.; BLAGITZ, M. G.; SANCHES, G.S.B.; SOUZA, N. F.; BATISTA, F. C.; SAKAI, M.; SÁ-ROCHA, C. L.; JÚNIOR, K. R. J.; STRICAGNOLO, R. C.; BENESI, J. F.; LIBERA, D. P. M. M. A. Influência da leucose enzoótica bovina na função fagocítica de leucócitos circulantes em animais manifestando linfocitose persistente. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia**, v. 45, n. 5, p. 390-397, 2008.
- BARTLETT, 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, 2013.
- BARROS FILHO, I. R. de.; GUIMARÃES, A. K.; SPONCHIADO, D.; KRUGER, E. V. ; W AMMES, R. D.; OLLHOFF, P. T. et al. Soroprevalência de anticorpos para o vírus da leucose enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arquivos Do Instituto Biológico**, 77(3), 511–515, 2010.
- BIRGEL JUNIOR, E. H.; DIAS, W. M. C.; SOUZA, R. M.; POGLIANI, F. C.; BIRGEL, D. B.; BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em animais da raça Simental, criados no Estado de São Paulo. **ARS Veterinária**, v.22, n.2, p.122-129, 2006.
- BLAGITZ, M. G. Avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos. 161p. **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, 2011.
- BRAGA, F. M.; VAN DER LAAN, C. W. Leucose Esporádica Bovina. CORREA, et. al. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 1ª Ed. São Paulo- SP, Varela Editora e Livraria, pág. 134 a 135, 2001.
- CLIMA TEMPO**. A StamGeo Company. Previsão do tempo, 2023. Disponível em: <https://www.climatempo.com.br/previsao-do-tempo/15-dias/cidade/2897/realeza-pr>
- DA SILVA, Caroline Matos; VIDAL, Ana Maria Centola. A influência do conforto térmico de vacas leiteiras sobre a composição do leite. **Coletânea Bem-Estar Animal, Inovação e Tecnologia: Atualidades**, v. 13635, p. 51, 2021.
- DELLA LIBERA, A. M. M. P. et al. Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. **Veterinary research**, v. 46, p. 1-8, 2015.
- DELLA LIBERA, A. M. M. P., de Souza, F. N., Batista, C. F., dos Santos, B. P., Parra, A. C., de Azevedo, L. F. F., & Blagitz, M. G. Expression of CD14 molecule by milk neutrophils in

bovine leukemia-virus infected dairy cows/Expressao da molecula de CD14 por neutrofilos lacteos em vacas infectadas pelo virus da leucemia bovina. **Veterinaria e Zootecnia**, 20(2), 339-341, 2013.

DUS SANTOS M. J.; TRONO, K.; LAGER, I.; WIGDOROVITZ, A.; DEVELOPMENT, F. R. I. E.; SPORER, K. R.; WALLACE, J.C.; MAES, R. K.; SORDILLO, L. M.; BARTLETT, P. C.; COUSSENS, P. M. Imunidade humoral reduzida e imunidade mediada por células atípicas em resposta à vacinação em vacas naturalmente infectadas com o vírus da leucemia bovina. **Imunologia Veterinária e Immunopatologia**, 182, 125–135, 2016.

EDMONDSON, P. W.; BRAMLEY A. J. Mastite. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, W. R.; BOYD, H.; EDDY, G. R.;(Org). **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2 ed. São Paulo: Roca,. p 290-299, 2008.

FERNANDES, C. H. C.; MELO, L. E. H.; TENÓRIO, T. G. da S.; MENDES, A. C.; FERNANDES, A. C. de C.; RAMALHO, P. A. et al. Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região norte do estado do Tocantins, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 327–334, 2009.

FONSECA, L. F. L., SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 175p. 2000.

HIRSCH, C.; LEITE, R. C.. **Leucose Enzoótica Bovina**. In: MAGID, Jane; RIBEIRO, Márcio Garcia; PAES, A. C. (Org). Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca,. p. 736-741,2016.

KONNAI, Satoru; MURATA, Shiro; OHASHI, Kazuhiko. Immune exhaustion during chronic infections in cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 1, p. 1-5, 2017.

KONISHI, M.; KOBAYASHI, S.; TOKUNAGA, T.; CHIBA, Y.; TSUTSUI, T.; ARAI, S.; KAMEYAMA, K.; YAMAMOTO, T. Avaliação simultânea da utilidade do marcador diagnóstico para leucose bovina enzoótica. **Pesquisa veterinária BMC** , 15 , 1-9, 2019.

KUCZEWSKI, A.; ORSEL, K.; BARKEMA, H. W.; MASON, S.; ERSKINE, R.; VAN DER MEER, F. Revisão convidada: Vírus da leucemia bovina – transmissão, controle e erradicação. **Journal of Dairy Science**, p. 6358-6375, 2021.

LO, C. W.; TAKESHIMA, S. N.; WADA, S.; MATSUMOTO, Y.; AIDA, Y. Vantagem do heterozigoto do complexo principal de histocompatibilidade bovina (BoLA) contra o resultado da infecção pelo vírus da leucemia bovina. **HLA**, p. 132-139, 2021.

LEIRA, M. H.; BOTELHO. A. H.; SANTOS, H. C. A. S.; BARRETO, B. B.; BOTELHO, J. H. V.; PESSOA, G. O. Fatores que alteram a produção e a qualidade do leite: Revisão. **Pubvet**, v. 12, p. 172, 2018.

MARQUES. P. L. T.; BAÊTA, A. B.; MORAES, F. F.. R.; ROIER. R. C. E. Mastite bovina: revisão. **Pubvet**, v. 15, p. 162, 2020.

MEIRELLES, C.; DITTRICH, T.; CIPRIANO, F.; OLLHOFF, R. D. Evolução da soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina em um rebanho bovino leiteiro universitário. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 671-678, 2009.

MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; DE SOUSA, D. B. Leucose enzoótica bovina: Importância do desenvolvimento da enfermidade na eliminação viral. **PUBVET**, v. 7, p. 885-1001, 2013.

MENDES, D. S.; da SILVA, A. D. J.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; BLAGITZ, M. G.; & BATISTA, C. F. et al. Influência do vírus da leucose enzoótica bovina na celularidade e na composição do leite. **Revista Saúde-UNG-Ser**, v. 13, n. 2 ESP, p. 86-86, 2019.

MIYOSHI, Jun et al. Minimizing confounders and increasing data quality in murine models for studies of the gut microbiome. **PeerJ**, v. 6, p. e5166, 2018.

MONTI G.E.; SCHRIJVER R.; BEIER D. Genetic diversity and spread of bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. **Arch. Virol.**, 150, 443–458, 2005.

NERO, L. A., MOREIRA, M. A. S. Mastites. Leite: obtenção, inspeção e qualidade. 1ª ed. Beloti, V. **editora Planta**, Londrina, p. 283-296, 2015.

NASCIMENTO, C. C. N; NASCIMENTO, M. R. B. M.; SILVA, N. A. M. da. Ocorrência de ondas de calor no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba e seu efeito na produção leiteira e consumo alimentar em bovinos. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, p. 1488-1495, 2014.

NAKADA, S.; FUJIMOTO, Y.; KOHARA, J.; ADACHI, Y.; MAKITA, K. Estimativa da perda econômica pela redução do peso da carcaça de vacas leiteiras japonesas devido à infecção pelo vírus da leucemia bovina. **Medicina veterinária preventiva** , 198 , 105528, 2022.

NARCISO, V. B.; COLLET, S. G.; GIRARDINI, L. K.; SOUZA, F. N.,; CATARINA, S. A.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; SABEDOT, C.; BRUNETTO, R. T.; SCHNEIDER. M.; BLAGITZ, M. G. Influência do vírus da leucemia bovina sobre a atividade imunológica por meio da função neutrofílica. **Acta Scientiae Veterinariae** , 48 , 1745, 2020.

OTT, S. L.; JOHNSON, R. S. J. W.; WELLS, S. J. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. **Prev. Vet. Med.**, 61, 249–262, 2003.

PAULA, Meiby Carneiro de et al. Estimativas de parâmetros genéticos para produção e composição do leite de vacas da raça Holandesa no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 824-828, 2008.

PEREIRA, A. L. M; COSTA, A. F.; VESCHI, J. L. A.; ALMEIDA, K. de S.. Soroprevalência da leucose enzoótica bovina-revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Garça**. v. 11, n. 21, jul. 2013

PEREIRA, E. S., PIMENTEL, P. G., QUEIROZ, A. C. & MIZUBUTI, I. Y. Novilhas leiteiras. **Graphiti Gráfica e Editora Ltda**, Fortaleza, Ceará, 2010

PERES, J. R. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. **Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2001.

OIE/ WOA – World Organisation for Animal Health – OIE Terrestrial Animal Health Code, Enzootic Bovine Leukosis, chapter. 11.6, 2018

RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; PANTOJA, J. C. F. Mastite em Animais Domésticos. In: MEGID, Jane; RIBEIRO, Márcio Garcia; PAES, A. C. (Org). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, p. 1154-1205, 2016.

RIBEIRO, L. F., CALIMAN, M. D. F., GASPAROTTO, P. H. G. Principais Impactos da Mastite Bovina: Revisão de Literatura. **Revista GeTeC**, v. 12, n. 37, 2023.

ROSA, P. P. ZANELLA, M. B., RIBEIRO, M. E. R., FLUCK, A. C. ANGELO, I. D. V., FERREIRA, O. G. L., COSTA, O. A. D. Fatores etiológicos que afetam a qualidade do leite e o Leite Instável Não Ácido (LINA). **REDVET**. v.18 n°12, 2017.

SAJIKI, Y.; KONNAI, S.; OKAGAWA, T.; NISHIMORI, A.; MAEKAWA, N.; GOTO, S.; WATARI, K.; MINATO, E.; KOBAYASHI, A.; KOHARA, J.; YAMADA, S.; KANEKO, K.M.; KATO, Y.; TAKAHASHI, H.; TERASAKI, N.; TAKEDA, A.; YAMAMOTO, K.; TODA, M.; SUZUKI Y.; MURATA, S.; OHASHI, K. Prostaglandin E2-induced immune exhaustion and enhancement of antiviral effects by anti-PD-L1 antibody combined with COX-2 inhibitor in bovine leukemia virus infection. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 5, p. 1313-1324, 2019.

SAJIKI, Y.; KONNAI, S.; OKAGAWA, T.; MAEKAWA, N.; GOTO, S.; KOHARA, J.; NITANAI, A.; TAKAHASHI, H.; KUBOTA, K.; TAKEDA, H.; MURATA, S.; OHASHI, K. (Estradiol-induced immune suppression via prostaglandin E2 during parturition in bovine leukemia virus-infected cattle. **PloS one**, v. 17, n. 3, p. e0263660, 2022.

SHETTIGARA, P. T. Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel immunodiffusion test. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.50, p.221-226, 1986.

SILVA, R. C.; FONTANA, I.; MEIRELLES, F. C.; RUGGIERO, A. P. M.; BENATO, N.; BORGES, J. R. J. Ocorrência de leucose enzoótica bovina na forma de linfossarcomas no distrito federal: relato de caso. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.4, p.507-512, 2008.

SILVA, V. D S., ALMEIDA, M. M. RODRIGUES, S.A., BORGES, J. P.T.P., SILVA, G.C.C., GAZIM, Z. C., JUNIOR, R. P. dos Santos Silva, V., de Almeida Machado, M., Rodrigues, S. A., Borges, J. P. T. P., Silva, G. C. C., Gazim, Z. C., & Junior, R. P. Uso de beta-glucano subcutâneo no controle da mastite bovina. **Peer Review**, 5(17), 393-415, 2023.

SOUZA, J. A.; NOGUEIRA, D. C.; CARVALHO, M. C. O efeito da ambiência do sistema de Compost Barn na produção de leite: estudo de caso. Artigo de Graduação – **Faculdade de Tecnologia Prof. José Camargo**, Jales, 2023.

SPINOLA, T. R., BERTAGNON, H. G., BATISTA, C. F., SOUZA, F. N., AZEDO, M. R., BLAGITZ, M. G., BENESI, F. J. DELLA LIBERA, A. M. M. P. Correlação entre a atipia linfocitária e o perfil imunológico de vacas leiteiras infectadas pelo vírus da leucemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, 34(1), 293-300, 2013.

UCHIYAMA, J.; MURAKAMI, H.; SA TO, R.; MIZUKAMI, K.; SUZUKI, T.; SHIMA, A. et. al. .Examination of the fecal microbiota in dairy cows infected with bovine leukemia virus, **Veterinary Microbiology**, 2020.

VENABLES, C.; LUCAS, M. V. Leucose Bovina, In: ANDREWS, A.H. Medicina bovina: doenças e criação de bovinos. 2 ed. São Paulo: **Roça**. p 610-616. 2008.

WATANABE, A.; MURAKAMI, H.; KAKINUMA, S.; MURAO, K.; OHMAE, K.; ISOBE, N.; AKAMATSU, H.; SETO, T.; HASHIMURA, S.; KONDA, K.; SHINOZUKA, Y.; KAWAI, K. Association between bovine leukemia virus proviral load and severity of clinical mastitis. **Journal of Veterinary Medical Science**, p. 1431-1437, 2019.