

## DIARREIA VIRAL BOVINA E SUA INFLUÊNCIA NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE

NADÁLIN YANDRA BOTTON<sup>1</sup>; TONY PICOLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Bacharelado em Zootecnia, IFRS Campus Sertão – nadalinyb@gmail.com

<sup>2</sup>Pesquisador de Pós-Doutorado do PNP/CAPES, UFPel - picolivet@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV), família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* é o causador da Diarreia Viral Bovina, enfermidade de importância veterinária e zootécnica, que leva a prejuízos econômicos principalmente pelas perdas reprodutivas. No entanto, o vírus pode apresentar cepas, além de citopatogênicas, também não-citopatogênicas responsáveis pelo aparecimento de animais persistentemente infectados, os quais constituem a principal forma de disseminação do microrganismo e o principal entrave no controle da enfermidade, já que estes não apresentam sintomatologia e não são detectados em testes sorológicos tradicionais (RIDPATH; FLORES, 2007).

Em rebanhos destinados à exploração leiteira, as perdas causadas devido à disseminação do BVDV refletem especialmente no declínio da atividade produtiva e reprodutiva (SCHMITZ, 2005) e, por possuir atividade imunossupressora, casos de mastite infecciosa podem se tornar comuns e recorrentes (CANÁRIO et al., 2009). A imunidade na glândula mamária de vacas em lactação é prejudicada pela diluição de anticorpos das classes IgA e IgG, secretados no lúmen do órgão, e, pela sua retirada a partir das ordenhas. Além disso, as células correspondentes ao sistema imune inato têm sua capacidade fagocítica prejudicada pela ingestão de gorduras e pela menor opsonização de patógenos (NEVES, 2011).

Dentre as causas mais comuns de mastite, encontram-se as bacterianas e, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* ocupam posições de destaque na etiologia, sendo considerados os patógenos infecciosos de maior incidência em todo mundo. A contagem de células somáticas (CCS) é importante ferramenta para monitoramento da sanidade da glândula mamária e, avaliada em tanques resfriadores, indica os níveis de mastite no rebanho. Basicamente, sua constituição é de células de defesa que migram para o tecido mamário frente a uma infecção (CARNEIRO et al., 2009).

Desta maneira, objetivamos investigar a influência da infecção pelo BVDV na CCS e na qualidade microbiológica do leite.

### 2. METODOLOGIA

Após visitas à Unidades de Produção Leiteira (UPL's) na região sudeste do Rio Grande do Sul, para coleta de amostras de leite e aplicação de questionários epidemiológicos, foram selecionadas 161 UPL que não realizavam vacinação contra BVDV. A coleta de leite (3 amostras por UPL) foi realizada diretamente do tanque resfriador, após homogeneização. As amostras foram devidamente identificadas e enviadas sob refrigeração aos Laboratórios de Qualidade do Leite (EMBRAPA Clima Temperado), de Virologia e Bacteriologia (UFPel). A primeira amostra, coletada com conservante bronopol, foi destinada à CCS através de citometria de fluxo.

A amostra destinada à bacteriologia foi semeada placas de Petri contendo meio de Edwards modificado (identificação do gênero *Streptococcus*), Baird-

Parker (identificação do gênero *Staphylococcus*) e Manitol salgado (contagem de *S. aureus*). As colônias características de *S. aureus* e *Streptococcus* spp. foram repicadas em Agar sangue (5% sangue ovino desfibrinado), e mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas em aerobiose, submetidas à coloração de Gram, e aquelas que apresentaram características morfo-tintoriais típicas, foram caracterizadas através de testes bioquímicos, segundo QUINN et al. (2005).

No Laboratório de Virologia e Imunologia (LabVir), procedeu-se centrifugação das amostras (3000 rpm, 15 min) para separação e coleta do soro lácteo livre de células e gordura. O soro foi submetido à temperatura 56°C por 30 minutos para inativação do sistema complemento. Após, realizou-se a técnica da vírusneutralização para determinação do título de anticorpos neutralizantes específicos contra BVDV presentes no leite. Foram utilizadas células Madin-Darby Bovine Kidney, por ser permissíveis ao BVDV cepa NADL.

Foram realizadas análises de variância, correlações de Pearson e análises de risco através do software estatístico BioEstat® 5.3, com confiabilidade de 95%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados, expressos na Tabela 1, demonstram que, dentre as 161 UPL selecionadas, 41,6% apresentam títulos de anticorpos contra BVDV detectáveis no leite dos tanques resfriadores. No entanto, não é possível afirmar que as demais UPL estejam livres de animais positivos para BVDV. SCHERER et al. (2002) ao correlacionar títulos séricos com títulos em leite pela VN, constatou que frequentemente, amostras com título sérico entre 10 e 40 não apresentam níveis detectáveis de anticorpos no leite. O percentual de amostras de leite que é detectada como positiva varia entre 33,3% (em vacas com títulos séricos de 10) e 97,4%, em animais com títulos de >320 no soro. Além disso, a mistura do leite de animais positivos e negativos no tanque resfriador contribui para dificuldade de detecção de anticorpos.

Fato semelhante ocorre com a CCS em tanques resfriadores, onde o leite mastítico é diluído em todo o leite produzido pelo rebanho. No entanto, a CCS é uma importante ferramenta para monitorar a mastite de uma UPL (CARNEIRO et al., 2009) e sua elevação, invariavelmente, demonstra casos de mastite. O mesmo ocorre com as contagens de microorganismos, e eleva a dificuldade na identificação de espécies bacterianas residentes obrigatórias da glândula mamária, como é o caso de *S. agalactiae*, que não sobrevive no ambiente. Porém sua identificação revela a procedência de infecções intra-mamárias, excluindo a possibilidade de contaminação ambiental (SANTOS, 2012).

Segundo a Instrução Normativa 7 (MAPA, 2016), que dita os requisitos mínimos de qualidade do leite cru refrigerado em propriedades rurais, a CCS deve ter uma média geométrica inferior a  $4,0 \times 10^5$  CS/ml em três meses consecutivos. Não há legislação vigente sobre as contagens e presença de bactéria dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* em leite cru, porém, a contagem padrão em placas de mesófilos, deve estar abaixo de  $1,0 \times 10^5$  UFC/ml de leite. Estes dentre outros parâmetros são utilizados para bonificar o produtor pela qualidade do leite entregue a indústria.

Linfócitos, macrófagos e neutrófilos, importantes células do sistema imune, constituem células alvo do BVDV e os mecanismos imunossupressores ligados a este vírus relacionam-se à neutropenia e depleção linfóide geradas, com a diminuição de linfócitos B e T CD4+ e CD8+. A redução da atividade bactericida dos neutrófilos infectados, aliado à redução de citocinas pró-inflamatórias geradas por linfócitos que ativariam células fagocíticas, e ainda, o descarte constante do

leite da glândula mamária, são fatores que podem favorecer novas infecções intra-mamárias (CANÁRIO et al., 2009). Entretanto, afirmar que a infecção pelo BVDV é o único fator responsável pela imunossupressão ainda é controverso. NISKANEN et al. (1995) concluiu que o aumento dos níveis de mastite em um rebanho foi concomitante ao aumento da titulação de anticorpos contra o BVDV.

Tabela 1. Qualidade microbiológica do leite de Unidades de Produção Leiteira do sul do Rio Grande do Sul, em função do título de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina encontrados no leite dos tanques resfriadores

Título de Anticorpos	n	CCS (x 10 <sup>5</sup> cél/ml)	presença <i>S. agalactiae</i>		presença <i>S. aureus</i>		<i>S. aureus</i> (x 10 <sup>4</sup> UFC/ml)
			n	%	n	%	
-	94	1,62 <sup>c</sup>	8	8,5	85	90,4	4,3 <sup>b</sup>
2	11	2,32 <sup>b,c</sup>	1	9,1	10	90,9	5,1 <sup>b</sup>
4	14	3,23 <sup>b</sup>	0	-	12	85,7	5,4 <sup>b</sup>
8	12	3,1 <sup>b</sup>	0	-	11	91,6	5,1 <sup>b</sup>
16	16	3,58 <sup>b</sup>	1	6,25	14	87,5	6,5 <sup>b</sup>
32	8	4,63 <sup>b</sup>	0	-	8	100	6,1 <sup>b</sup>
64	3	7,82 <sup>a</sup>	1	33,33	3	100	6,3 <sup>b</sup>
128	3	7,6 <sup>a</sup>	1	33,33	3	100	20,8 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste Tukey ( $p<0,05$ )

A CCS se elevou proporcionalmente ao título de anticorpos e, a partir do título 4, difere das UPL que não apresentam títulos ( $p<0,05$ ). Este dado justifica-se pela elevação nas porcentagens de isolamento de micro-organismos infecciosos. Nas UPL com títulos entre 64 e 128, 33,33% apresentaram isolamento de *S. agalactiae* e 100% de *S. aureus*. As análises não revelaram risco de infecções por *S. agalactiae* quando da presença de títulos de anticorpos contra BVDV, porém o baixo número de UPL nos estratos com maiores títulos, aliado ao fato da diluição do produto nos tanques, podem contribuir para que as análises estatísticas não detectem risco.

A correlação entre a contagem de *S. aureus* e o título de anticorpos foi  $r^2=0,52$  ( $p<0,05$ ) e comprova a hipótese de que a presença de BVDV pode predispor à mastite. Embora *S. aureus* possa ser oriundo de contaminações ambientais, sua presença correlacionada com títulos de anticorpos, sugere seu papel como agente etiológico de mastites. Esse dado é corroborado pela correlação apresentada entre a contagem de *S. aureus* e CCS ( $r^2=0,87$ ,  $p<0,05$ ).

Através da análise dos resultados obtidos, percebe-se que o leite oriundo de tanques resfriadores não constitui um sistema específico para determinar a real influência das infecções por BVDV nos níveis de mastite de um rebanho leiteiro, mas demonstra alguma sensibilidade, evidenciada pelas correlações entre os títulos de anticorpos de as contagens de *S. aureus*. A realização da técnica utilizando leite retirado diretamente da glândula mamária aumentaria a sensibilidade do teste ao tornar detectáveis os títulos de anticorpos no leite e elevar as chances de isolamento bacteriano.

#### 4. CONCLUSÕES

Após análise dos resultados conclui-se que as infecções causadas por BVDV afetam a qualidade microbiológica do leite, predispondo à mastite.

Entretanto a metodologia aqui apresentada, utilizando amostras de leite de tanques resfriadores apresentou baixa sensibilidade e especificidade.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CANÁRIO, R.; SIMÕES, J.; MONTEIRO, M. H.; MIRA, J. C. **Diarréia Viral Bovina: Uma afecção multifacetada.** Veterinária.com.pt: E-book, 2009. Acessado em 05 Set. 2018. Online. Disponível em: [http://www.veterinaria.com.pt/media/DIR\\_27001/VPC-I-2-e6](http://www.veterinaria.com.pt/media/DIR_27001/VPC-I-2-e6).

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.7, p.1934-1943, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (MAPA). **Instrução Normativa nº7 de 03 de Maio de 2016.** MAPA: 2016. Acessado em 01 Set. 2018. Online. Disponível em: <https://www.alimentusconsultoria.com.br/1470-2/>.

NEVES, R. B. S. **Resposta imune da glândula mamária de bovinos: específica e inespecífica.** Universidade Federal de Goiás, disciplina de seminários aplicados: 2011. Acessado em 02 Set. 2018. Online. Disponível em: [https://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011\\_Rodrigo\\_Balduino\\_2c.pdf](https://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011_Rodrigo_Balduino_2c.pdf).

NISKANEN, R., EMANUELSON, U., SUNDBERG, J., LARSSON, B., ALENIUS, S. Effects of infection with bovine virus diarrhoea virus on health and reproductive performance in 213 dairy herds in one county in Sweden. **Preventive Veterinary Medicine**, v.23, p.229–237, 1995

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. **Flaviviridae.** In: FLORES, E. F (Org.) **Virologia Veterinária.** Santa Maria: Ed. da UFSM, 2012.

SANTOS, M. V. **Mastite contagiosa: É preciso conhecer o agente.** Inforleite: 2012. Acessado em 03 Set. 2018. Online. Disponível em: <http://qualileite.org/pdf/Artigos-tecnicos-publicados-em-revista-de-divulgacao/Inforleite/2012/2.pdf>.

SCHERER, C.F.C; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; KREUTZ, L.C.; DÜRR, J.W.; BRUM, L.P.; QUADROS, V.L.; LIMA, M. Técnica rápida de neutralização viral para a detecção de anticorpos contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 45-50, 2002.

SCHMITZ, M. **Caracterização patológica e imunoistoquímica da infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina.** 2005. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Porto Alegre: Artmed, 2005.