

DIAGNÓSTICO DE ENFERMIDADES EM BOVINOS DESTINADOS À EXPORTAÇÃO

MARINA STURBELLE GARCIA¹; NADÁLIN YANDRA BOTTON²; MATHEUS IURI FRÜHAUF²; LARIANE DA SILVA BARCELOS²; LUIZA RIBEIRO DA ROSA²; GEFERSON FISCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas – sturbellemarina@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nadalinyb@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – matheus.fruhauf@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – larianebarcelos@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – luizaribeirovet@outlook.com

³Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2021), o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com cerca de 224,6 milhões de cabeças, e é considerado, também, o maior exportador da proteína animal viva do mundo. Para a exportação de gado vivo, um Certificado Zoosanitário Internacional (CZI) deve ser emitido pelo órgão competente do país de origem, atestando o cumprimento das condições sanitárias exigidas pelo país de destino dos animais (MAPA, 2020). Dentre as determinações comumente solicitadas por cada país importador, estão os testes diagnósticos, aplicados para doenças como a Brucelose, a Tuberculose, a Paratuberculose, a Leucose Enzoótica Bovina, a Diarreia Viral Bovina e a doença da Língua Azul.

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV), pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, e é um dos vírus mais comumente encontrados nos rebanhos bovinos de todo o mundo. A doença (Diarreia Viral Bovina – BVD) apresenta sintomatologia gastrointestinal e reprodutiva. O organismo acometido por este vírus torna-se imunossuprimido, mas o maior impacto econômico relacionado, é a formação de animais persistentemente infectados (PI) que contribuem, durante toda a sua vida, para a disseminação do vírus e permanência da doença na natureza (FLORES, 2017).

A Paratuberculose é causada pela bactéria *Mycobacterium paratuberculosis* e os ruminantes, de maneira geral, são suscetíveis. Os principais sinais clínicos apresentados são diarreia crônica e intermitente e emagrecimento progressivo, porém a enfermidade pode ocorrer de forma assintomática, tornando o animal portador (FECTEAU, 2018). Dentre as perdas econômicas provenientes da doença estão a redução na produção de leite, redução do valor ao abate, abate prematuro e redução na fertilidade do animal (SUN, 2015).

Ainda, a Leucose Enzoótica Bovina, importante enfermidade no cenário de exportação de gado vivo, é causada pelo vírus da leucemia bovina (BLV), pertencente à família *Retroviridae* (PEREIRA, 2013). A doença pode se desenvolver de forma assintomática ou através de linfocitose persistente, tornando o animal portador do vírus e disseminando este, pelo rebanho. Na sua forma mais grave, pode causar linfossarcomas comumente fatais (LEUZZI JUNIOR, 2004).

Desta forma, este trabalho tem como objetivo relatar o diagnóstico sorológico e molecular de 8.356 amostras de sangue de bovinos destinados para a exportação, contemplando as enfermidades: Paratuberculose, Leucose Enzoótica Bovina (LEB) e Diarreia Viral Bovina (BVD).

2. METODOLOGIA

2.1 Recebimento e processamento das amostras

Foram recebidas 8.356 amostras de sangue bovino, coletadas em tubos com ativador de coágulo, no Laboratório de Virologia e Imunologia (Labvir), da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O sangue foi usado em pools de 50 amostras (BVD), 10 amostras (Leucose) ou individualmente.

2.2 Diagnóstico de Diarreia Viral Bovina

Para a detecção do agente etiológico relacionado à Diarreia Viral Bovina (BVD) duas abordagens foram utilizadas. Inicialmente, pools de 50 amostras de sangue foram agrupadas e sofreram extração de RNA (Kit para extração e purificação de RNA – Colunas de sílica, Nova Biotecnologia LTDA). Posteriormente, o material (RNAs) extraídos dos pools foram submetidas a técnica de RT-qPCR. O kit ID Gene™BVD/BD Triplex (IDVet Genetics) foi utilizado para a realização da transcrição reversa do RNA e amplificação do alvo no cDNA (DNA complementar), para o diagnóstico, conforme recomendações do fabricante.

As amostras que constituíam os pools positivos foram testadas individualmente por ELISA (IDVet ID Screen® BVD P80 Antigen Capture, IDVet Genetics). As placas de 96 cavidades sensibilizadas com anticorpos de captura reconhecem a proteína NSP2-3 do BVDV, quando o sangue do animal está contaminado. O resultado é revelado através da coloração gerada na reação entre uma enzima conjugada com o anticorpo e seu substrato. A coloração é transformada em medida numérica de absorbância no espectrofotômetro e avaliada por um software específico.

2.3 Diagnóstico de Paratuberculose

O diagnóstico de Paratuberculose foi realizado através de ELISA indireto (IDVet ID Screen® Paratuberculosis Indirect – Screening test, IDVet Genetics) que tem como objetivo detectar os anticorpos contra o microrganismo. Em uma placa de 96 cavidades sensibilizada com o antígeno foi adicionado o sangue a ser testado e, caso presentes, os anticorpos reconheciam os抗ígenos da placa. Ainda, foi adicionado o conjugado, constituído por anticorpos anti-espécie marcados com uma enzima e, por fim, o substrato o qual reage com a enzima produzindo coloração para posterior leitura de absorbância em espectrofotômetro e avaliação dos resultados em software específico.

2.4 Diagnóstico de Leucose Enzoótica Bovina

Para o diagnóstico de Leucose Enzoótica Bovina (LEB) os soros foram agrupados em pools de 10 amostras, e um ELISA de competição, que detecta anticorpos contra a proteína gp51 do BLV foi empregado (IDVet ID Screen® BLV Competition, IDVet Genetics). Nesse caso, o anticorpo conjugado com a enzima é direcionado para a proteína gp51, que quando não é reconhecida por anticorpos do soro (no caso de amostras sem anticorpos para o BLV), fica livre para se ligar ao anticorpo conjugado, gerando a coloração, após a adição do substrato, somente nas amostras negativas. A absorbância também foi medida no espectrofotômetro e os resultados foram avaliados em um software específico. Os pools positivos foram testados posteriormente, de forma individual.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 demonstra os resultados obtidos nos testes diagnósticos para as enfermidades avaliadas. Das 8.356 amostras analisadas, 19 (0,22%) foram consideradas positivas para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pela técnica de RT-qPCR. Anticorpos contra o *Mycobacterium paratuberculosis* (agente causador da Paratuberculose) foram encontrados em 39 amostras (0,46%) e, ainda, 6 amostras foram consideradas suspeitas, pela técnica de ELISA indireto. Quanto à Leucose Enzoótica Bovina, 40 amostras (0,47%) apresentaram anticorpos contra o vírus da leucemia bovina (BLV), através da técnica de ELISA de competição.

Tabela 1. Resultados obtidos através dos testes diagnósticos de ELISA e qRT-PCR para as enfermidades de Diarreia Viral Bovina, Paratuberculose e Leucose Enzoótica Bovina

| Doença | Positivos | Negativos | Suspeitos |
|--------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Diarreia Viral Bovina | 19 | 8.337 | - |
| Paratuberculose | 39 | 8.311 | 6 |
| Leucose Enzoótica Bovina | 40 | 8.316 | - |

A exportação de gado vivo tem crescido muito nos últimos anos, resultando em incremento de recursos financeiros no país. Os índices tendem a crescer cada vez mais no Brasil, devido ao tamanho do rebanho que atualmente é de mais de 210 milhões de cabeças e em decorrência da atenção que o país dá ao manejo sanitário. Esse cuidado é exemplificado pelos baixos índices de animais positivos, descritos na tabela 1. O diagnóstico prévio de doenças infecciosas é indispensável, principalmente para enfermidades que possuem portadores assintomáticos ou animais persistentemente infectados, para que esses animais que serão exportados vivos e terminados no exterior não se tornem disseminadores dos agentes etiológicos causadores dessas enfermidades em ambientes livres, portanto a chegada de animais infectados resultaria em surtos que ocasionariam grandes perdas econômicas.

Os países importadores apresentam suas próprias exigências, de acordo com a situação sanitária do país. No caso da Turquia, por exemplo, além da GTA (guia de trânsito animal) são exigidos os exames para IBR, BVD, tuberculose e leucose. A febre aftosa também é constantemente exigida em protocolos de países importadores, porém o Rio Grande do Sul apresenta uma vantagem nesse viés pois possui o certificado de livre sem vacinação. Esses fatores implicam diretamente no crescimento de 800% na exportação de gado vivo, segundo a estatal que gerencia o sistema hidroportuário do estado, pelo Rio Grande do Sul.

4. CONCLUSÕES

Após a realização dos testes diagnósticos em 8356 animais destinados à exportação, 19 foram considerados positivos para BVD, 39 positivos e 6 suspeitos para Paratuberculose e 40 animais positivos para Leucose Enzoótica Bovina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Canal Rural, **Exportação de gado vivo cresce 800% no Rio Grande do Sul**. Canal Rural, 06 de setembro de 2023. Acessado em 15 de setembro de 2023. Online. Disponível em: <https://www.canalrural.com.br/pecuaria/boi/exportacao-de-gado-vivo-cresce-800-no-rio-grande-do-sul/>

Defesa Agropecuária de São Paulo, **Exportação de animais vivos: o Brasil tem muito espaço para ampliar suas vendas e o Instituto Biológico pode ajudar.** Governo do Estado de São Paulo, São Paulo, 14 de março de 2023. Acessado em 15 de setembro de 2023. Online. Disponível em: <https://www.agricultura.sp.gov.br/pt/b/exportacao-de-animal-vivos-o-brasil-tem-muito-espaco-para-ampliar-suas-vendas-e-o-instituto-biologico-pode-ajudar>

FECTEAU, Marie-Eve. Paratuberculosis in cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 34, n. 1, p. 209-222, 2018.

FLORES, E.F. **Virologia veterinária:** virologia geral e doenças víricas. 3 ed. Santa Maria: UFSM, 2017.

IBGE, **Pesquisa de Pecuária Municipal.** IBGE, Brasília, 2021. Acessado em 01 de junho de 2023. Online. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>

LEUZZI JUNIOR, L. Álvaro; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, [S. I.], v. 22, n. 2, p. 211–221, 2004.

MAPA, **Exportação de animais vivos e afins.** MAPA, Brasília, 29 de setembro de 2020. Acessado em 01 de junho de 2023. Online. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/internacional/portugues/exportacao/animal/animais-vivos-e-afins>

OIE. ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. World Organisation for Animal Health. **OIE Terrestrial Manual.** Bovine viral diarrhoea, Chapter 3.4.7. 2018. Acessado em 11 de Agosto de 2023. Online. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.09_EBL.pdf

OIE. ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. World Organisation for Animal Health. **OIE Terrestrial Manual.** Enzootic bovine leukosis, Chapter 3.4.9. 2018. Acessado em 11 de Agosto de 2023. Online. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.09_EBL.pdf

PEREIRA, A.L.M. COSTA, A.F. VESCHI, J.L.A, ALMEIDA, K.S. Soroprevalência de Leucose Enzoótica Bovina – Revisão de Literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária.** São Paulo, v.11, n.21. 2013.

SUN, W. W; L.V, W.F; CONG, W; MENG, Q.F; WANG, C.F; SHAN, X. F; QIAN, A. D. 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 Research International**, v.2015, p.1-7, 2015.