

Alterações histopatológicas da glândula mamária e qualidade do leite de cabras naturalmente infectadas com o CAEV

[*Histopathological changes in the mammary gland and milk quality of goats naturally infected with CAEV*]

R.Q. Bezerra Júnior^{1,2}, M.F.S. Teixeira^{2,3}, G.R. Martins², M.R. Abrantes⁴, R.P. Dias², T.D.F. Aguiar², L.A.O. Alves², C.A.F. Lopes Júnior², J.B.A. Silva⁴, J.S.A.M. Evangelista², M.G.F. Salles⁵

¹Aluno de pós-graduação – UECE – Bolsista FUNCAP – Fortaleza, CE

²Aluno de pós-graduação – UECE – Fortaleza, CE

³Bolsista de produtividade do CNPq

⁴UFERSA – Mossoró, RN

⁵Médica veterinária autônoma

RESUMO

Avaliou-se a influência do vírus da CAE nas características físico-químicas de amostras de leite de 54 cabras, sem predileção racial, distribuindo-as em dois grupos: cabras positivas e negativas para o teste de imunodifusão em gel de agarose. As amostras de leite foram submetidas à análise ultrassônica para obtenção de parâmetros físico-químicos – gordura, extrato seco, proteínas, lactose e densidade; realização de microbiologia – bactérias mesófilas (UCF/mL). Foram coletadas amostras de tecido mamário para exame histopatológico e imunohistoquímica. Não houve diferença significativa das características avaliadas entre os dois grupos; no microbiológico, não houve relação direta da presença de mesófilas associada à infecção pelo CAEV. Na histopatologia, observaram-se áreas com infiltração celular de monócitos, polimorfonucleares, plasmócitos, fibrose, ausência de morfologia normal do parênquima mamário, denotando processo inflamatório crônico; e foi confirmada a presença do vírus na glândula pela imunohistoquímica. Os resultados não mostraram relação direta da incidência da CAE como fator negativo no desenvolvimento do rebanho.

Palavras-chave: CAE, lentivírus, análise físico-química, leite

ABSTRACT

Aiming to evaluate the influence of CAE viruses in the chemical and physical characteristics of milk, the samples were collected from 54 goats, without racial predilection, these were divided into two groups: goats positive and negative according results of test Agarose Gel Immunodiffusion. Milk samples were ultrasonic analyzed to obtain physicochemical parameters (fat, solids, protein, lactose and density); performance microbiology (mesophilic bacteria – CFU/mL) and mammary gland samples were collected for evaluation histopathology and immunohistochemistry. The results of physical-chemical analysis showed no significant difference between the milk samples of two groups. In the microbiological analysis showed the presence of aerobic mesophilic bacteria, but this change is not associated with the presence of CAEV infection. On histopathology, there were areas with infiltration of mononuclear-leukocyte and polymorph nuclear, plasma cells, fibrosis and absence of normal morphology of the mammary tissue, indicating a chronic inflammatory process; and confirmed the presence of virus, in the gland, by immunohistochemistry. The results showed no direct relationship between incidence of CAE in the herd as a negative factor for its development, however it is known that the disease in its chronic nature, causes reduction in the productivity of the herd.

Keywords: CAE, lentiviruses, physical-chemical analysis, milk

Recebido em 7 de junho de 2011

Aceito em 10 de setembro de 2012

E-mail: labovirfavetuece@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma enfermidade multissistêmica, de caráter crônico e debilitante, apresentando como principais formas clínicas: artrite, pneumonia e mastite, observadas em animais adultos e mais raramente a leucoencefalomielite em caprinos jovens (Pugh, 2004). É ocasionada pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus* (International..., 2009).

A transmissão pode ocorrer de forma direta, através da ingestão de colostro e leite da própria mãe ou do leite misturado de várias cabras, do contato direto entre animais através dos líquidos corporais – aerossóis, saliva –; e indireta, por meio de objetos contaminados – fômites –, e pelo homem – iatrogênica. A idade, raça e o sexo dos animais parecem não intervir na sua suscetibilidade frente ao CAEV (Rowe e East, 1997), porém outros fatores, como estresse, infecções bacterianas e virais concomitantes podem aumentar o risco da infecção (Zink *et al.*, 1987), existindo a possibilidade de alguns animais infectados poderem expressar mais o vírus do que outros (Adams *et al.*, 1983). Cabras naturalmente infectadas com o vírus CAE expressam o DNA proviral em diversos tecidos do seu trato genital, tais como útero, ovidutos, além da glândula mamária. A presença dos lentivírus nesses tecidos pode contribuir para a transmissão vertical da enfermidade (Fieni *et al.*, 2002).

A influência da infecção pelo vírus da CAE na constituição físico-química do leite de caprinos foi estudada por pesquisadores como Nord e Adnoy (1997), os quais observaram que os valores de lactose, gordura e proteína não sofreram variações significativas que pudessem ser creditadas à infecção pelo vírus. Birgel Júnior *et al.* (2007), por meio de análise do leite de cabras das raças Saanen e Pardo Alpina frente ao CAEV, confirmaram ser evidente e significativa a influência da enfermidade na composição físico-química e celular do leite, observada, por exemplo, em valores de eletrocondutividade, teores de cloretos e a contagem de células somáticas que foram maiores nas cabras infectadas pelo CAEV com ou sem sinais de endurecimento difuso da mama.

O leite atua como importante veiculador e disseminador da enfermidade quando existente a presença do patógeno, e, conseqüentemente, espera-se que haja alguma alteração evidente no mesmo quanto às suas características organolépticas e físico-químicas. Porém, a falta de trabalhos referentes, bem como a ausência de informações sobre a influência da doença nos valores físico-químicos, faz com que seja necessária a realização de pesquisas nesse sentido. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a influência da CAE nas características físico-químicas e microbiológicas do leite de cabras naturalmente infectadas e estudar a histopatologia da glândula mamária.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas em um capril situado na zona metropolitana de Fortaleza, CE. O experimento foi realizado no período de novembro a dezembro de 2010. O projeto de pesquisa foi avaliado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Estadual do Ceará, sendo aprovado sob o número de protocolo 10130900-7/32.

A escolha dos animais foi independente de raça, sendo selecionadas cabras com idade entre 2-3 anos. Foram coletadas amostras de sangue de 62 animais para sorologia. Porém, para a análise físico-química e microbiológica, realizou-se escolha aleatória de 54 cabras – dentro do grupo de animais considerados soropositivos, 28 animais, e soronegativos, 26 animais – para o IDGA. O *n* amostral para a análise físico-química foi estabelecido adotando-se um nível de confiança de 95%, com erro amostral de 5%.

As coletas foram divididas em duas etapas distintas: na primeira, a coleta de sangue dos caprinos por venopunção da jugular para posterior realização de exame sorológico, IDGA; e na segunda, a coleta de amostras de leite de cabras soropositivas e soronegativas no IDGA para realização de análises físico-química e microbiológica.

Na coleta foram obtidas amostras de 10mL de sangue, acondicionadas em recipiente refrigerado e levadas ao laboratório para processamento. As amostras foram centrifugadas a 3000 RPM durante 10 minutos para obtenção do soro e posterior realização do IDGA. O kit diagnóstico

utilizado foi o BIOVETECH®, sendo realizada a análise conforme instruções do fabricante. A primeira leitura foi realizada 24 horas após incubação e a leitura definitiva ocorreu após 48 horas de incubação. As reações foram avaliadas pela presença de linhas identidade com a linha de precipitação, obtidas entre antígeno e soro dos animais e soro controle.

Durante a ordenha, depois de desprezados os primeiros jatos de leite, amostras foram coletadas em tubos Falcon estéreis de 50mL, acondicionadas em recipiente refrigerado e levadas ao LIPOA para posterior análise ultrassônica. As amostras foram avaliadas em duplicata, realizando-se em seguida cálculo da média dos resultados.

A avaliação das características físico-químicas do leite foi realizada através do analisador de leite ultrassônico (Ekomilk Total, CAP-LAB®), sendo avaliadas as seguintes características: densidade, temperatura, proteína, lactose, gordura, extrato seco desengordurado, pH e condutividade. Pelos valores da gordura e ESD calculou-se o EST, e com os valores da temperatura e densidade obteve-se o resultado da densidade a 15°C. Seguiram-se as normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), segundo a Instrução Normativa N° 37 de 31 de outubro de 2000 (Brasil, 2000).

De cada amostra de leite, n=29, prepararam-se diluições sucessivas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , sendo utilizadas a partir da 10^{-2} . Foi transferido 1mL de cada diluição para placas de Petri, esterilizadas, em duplicata. Adicionaram-se 20mL de ágar padrão para contagem. As placas foram homogeneizadas através de realização de movimentos circulares e deixadas em repouso até a solidificação do ágar. Após a solidificação, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Procedeu-se, então, a contagem, cujo resultado foi expresso em unidade formadora de colônia por mL (UFC/mL). O exame microbiológico seguiu protocolo estabelecido pelo MAPA, segundo a Instrução Normativa N° 62 de 26 de agosto de 2003 (Brasil, 2003).

Após o abate das cabras, amostras de tecido mamário de animais soropositivos e soronegativos para CAE foram coletadas e realizaram-se cortes histológicos de tecido

mamário, 5µm cada, para posterior preparação das lâminas histológicas. Os fragmentos foram fixados em formol e corados por hematoxilina-eosina.

A análise imunohistoquímica seguiu metodologia descrita por Ricarte (2009), objetivando a localização topográfica da proteína p28 do CAEV no tecido mamário. Foram realizados cortes histológicos de tecido mamário, 5µm cada, para posterior recuperação de antígenos. Para isso, as lâminas foram incubadas em tampão citrato 10 mM (pH 6,0) com o auxílio de um forno de micro-ondas em potência máxima (700 watts). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada utilizando-se 3% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água, com duas trocas de cinco minutos cada. Para bloquear as ligações inespecíficas, as amostras foram incubadas em soro contendo anticorpos específicos de espécie diferente dos anticorpos primário (soro positivo para CAE) e secundário (coelho anti-caprino) durante o período de cinco minutos. Em seguida, após lavagem em PBS, foi colocado o anticorpo primário, diluído em PBS, por um período de 10' a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em PBS e incubadas com IgG anti-caprino conjugada a peroxidase por 30 minutos a 37°C a uma diluição de 1:1000. A reação foi revelada pela adição da diaminobenzidina tetrahydroclorídeo por 8-10 minutos. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer por um minuto, montadas e analisadas em um microscópio óptico.

Os dados das amostras foram organizados em tabela do Excel, sendo calculadas médias aritméticas, desvios padrão das médias e coeficiente de variação dos resultados obtidos para físico-química. Os resultados foram submetidos a teste estatístico t de Student.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, apresentaram-se os valores obtidos da análise físico-química das 54 amostras coletadas de cabras soropositivas e soronegativas para CAE. Todas apresentaram valores médios (parâmetros) acima do padrão estabelecido pelo MAPA (2000), e não foi observada diferença significativa entre os grupos. Esses valores acima do padrão podem ser decorrentes do tipo de manejo alimentar aplicado. Conforme explicou Linn (1989), a alimentação é o fator que mais

influencia a composição do leite, em que dietas com poucas fibras resultam em uma produção de leite com baixa porcentagem de gordura. Esses resultados corroboram os achados de Nord e Adnoy (1997), Martínez Navalón *et al.* (2002) – quando avaliados os valores de extrato seco desengordurado, lactose e proteína –, e diferem dos encontrados por Birgel Júnior (2007) – em

que se evidenciou a significativa influência da infecção pelo CAEV na composição físico-química e celular do leite caprino –, e por Brito (2009) – que concluiu que o CAEV contribuiu para o comprometimento da produção leiteira e de qualidade do leite, principalmente de gordura do leite, sólidos totais e contagem de células somáticas.

Tabela 1. Média dos valores físico-químicos encontrados na análise do leite de animais soropositivos e soronegativos para CAE

Características	Soropositivo	Soronegativo	Brasil (2000)
Gordura	3,8	3,7	2,9
ESD*	9,4	9,2	8,2
Proteína	3,3	3,2	2,8
Lactose	5,4	5,2	4,3

Extrato seco desengordurado*.

Na Tabela 2, observam-se os resultados referentes à contagem padrão em placas para mesófilos aeróbios, em que, do total de amostras analisadas, 27 (93,1%) estavam em conformidade com o limite estabelecido pela IN37 até o ano de 2010, que é de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL, e que 6,9% dessas amostras

encontravam-se fora do critério estabelecido pela IN37. A incidência da CAE não teve relação direta com a presença de bactérias mesófilas, uma vez que, dentro desse grupo de 27 animais, o número de animais positivos e negativos foi aproximado, sem diferença significativa.

Tabela 2. Contagem padrão de placas para mesófilos aeróbios

Contaminação	Mesófilos aeróbios (UFC/mL)	
	N	%
> 0 - 10^2	17	58,6
> 10^2 - 10^3	6	20,7
> 10^3 - 10^4	2	6,9
> 10^4 - 10^5	2	6,9
> 10^5 - 10^6	2	6,9
> 10^6 - 10^7	-	-
Total	29	100

A baixa contaminação presente no leite para mesófilas aeróbias não significa dizer que o CAEV não tem relação com a presença de patógenos alterando a microbiologia normal do leite, como também a ocorrência de mastite nos animais; como foi mostrado por Birgel Júnior *et al.* (2005), sobre a ocorrência de mastite indurativa, sendo que, das 97 glândulas avaliadas por palpação, diagnosticou-se endurecimento difuso em 19,78% dos animais infectados pelo CAEV. Lara *et al.* (2005), ao estudarem as formas clínicas da CAE, encontraram mastite indurativa presente em 6,6% dos caprinos sororreagentes. Os animais aqui trabalhados não apresentaram, ao exame clínico, evidências de

mastite, porém alguns deles apresentavam-se com artrite.

No tecido mamário de cabras que foram submetidas a exame histológico, constatou-se mastite subclínica, caracterizada por infusão linfocitária, denotando a ocorrência de processo inflamatório, e as principais mudanças observadas foram: ácinos mononucleares com fibrose e atrofia; mastite difusa, com presença de monócitos e plasmócitos (indicativo de inflamação crônica); infusão mono-leucocítica; e por todo parênquima mamário extensas áreas com fibrocolágeno (Fig. 1). Achados similares foram encontrados por Gregory *et al.* (2009).

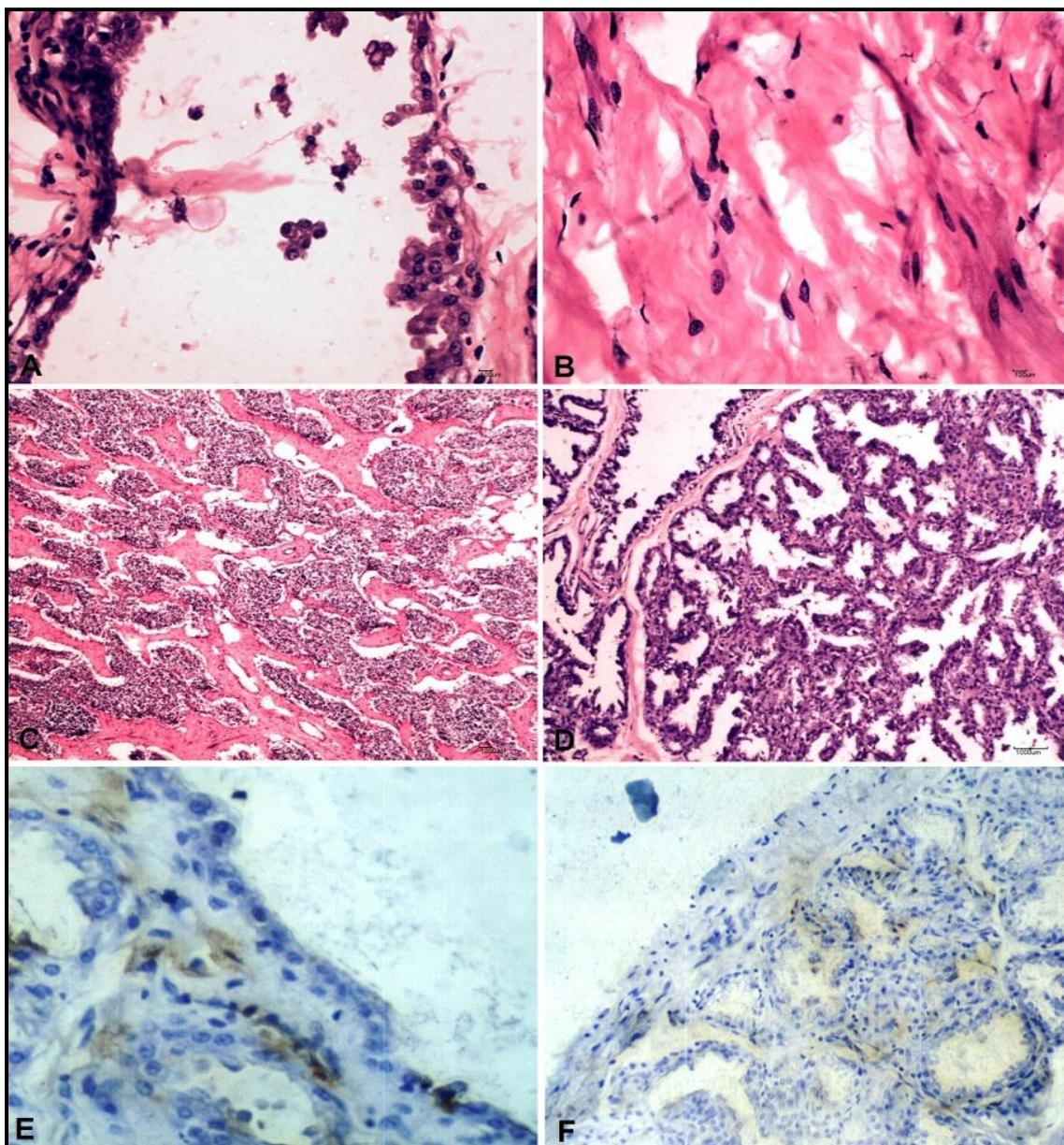


Figura 1. Fotomicrografia de glândula mamária de cabra. Presença agregado de plasmócitos (A, 400X; H.E.); área de fibrose (B, 100X; H.E.); epitélio transformado, ausência de morfologia normal dos alvéolos mamários (C, 40X; H.E.); parênquima mamário normal (D, 100X; H.E.); marcação multifocal do citoplasma da célula em marrom, caracterizando reação positiva (imunohistoquímica; E, 400X, F, 200X).

As lesões histológicas observadas na glândula mamária dos animais clinicamente afetados pela CAE consistem em extensiva infiltração intralobular de linfócitos e marcada hiperplasia linfoide adjacente aos ductos lactíferos (Al-Ani e Vestweber, 1984). Lerondelle *et al.* (1989) encontraram infiltrado moderado de linfócitos e macrófagos, abundância de tecido conjuntivo e linfadenopatia subaguda ou crônica.

Nos tecidos imunohistoquimicamente corados para a proteína p28 do CAEV, foi observada a presença focal de plasmócitos e monócitos com intensa marcação multifocal do citoplasma em marrom, caracterizando imunohistoquímica positiva (Fig. 1).

CONCLUSÕES

Os resultados não mostram relação direta da incidência da CAE como fator negativo no desenvolvimento do rebanho, porém é de conhecimento que a enfermidade, em sua cronicidade, isto é, redução das características produtivas, com queda de produção e qualidade do leite, bem como das condições fisiológicas dos animais acometidos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e Universidade Federal do Semiárido (UFERSA) por disponibilizarem condições técnica e pessoal.

REFERÊNCIA

- ADAMS, D.S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J.L. *et al.* Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Amer. J. Vet. Res.*, v.44, p.1670-1675, 1983.
- AL-ANI, F.K.; VESTWEBER, J.G.E. Caprine arthritis-encephalitis síndrome (CAE): A review. *Vet. Res. Communications*, v.8, p.243-253, 1984.
- GREGORY, L.; BIRGEL Jr., E.H.; LARA, C.C.S.H. *et al.* Clinical features of indurative mastitis caused by caprine arthritis encephalitis virus. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v.2, p.64-68, 2009
- BRASIL. Ministério da Agricultura, P.E.A. *Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite de cabra*. Brasília, 8 de novembro de 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, P.E.A. *Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água*. 2003.
- BIRGEL JUNIOR, E.H.; CESTARI, V.; SAMPAIO, R.M. *et al.* Influência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina nas características físico-químicas e celulares do leite de caprinos. *Arq. Inst. Biol.*, v.74, p.199-206, 2007.
- BIRGEL JUNIOR, E.H.; CESTARI, V.; MARQUES, R.S. *et al.* Influência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina nas características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de caprinos. In: 5º Congresso Brasileiro de Buiatria, 2005, Búzios. Anais do 5º Congresso Brasileiro de Buiatria CD ROM, 2005.
- BRITO, R.L.L. Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras. 2009. 89f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Vale do Acaraú, Sobral, Ceará.
- FIENI, F.; ROWE, J. Van HOOSEAR, K. *et al.* Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. *Theriogenology*, v.57, p.931-940, 2002.
- INTERNATIONAL Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV. Disponível em: <http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ICTVdB//00.061.1.06.007.htm>. Acessado: em 25 mai 2011.
- LARA, M.C.C.S.H.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; GREGORY, L.; BIRGEL, E.H. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.736-740, 2005.
- LERONDELLE, C. *et al.* La glande mammaire: organe cible de l'infection par le virus de l'arthrite et de l'encephalite caprine. *Ann. Rech. Vet.*, v.20, p.57-64, 1989.
- LINN, J.G. Altering the composition of milk trough management practices. *Feedstuffs*, p.16, 1989.
- MARTÍNEZ NAVALÓN, B.; PERIS RIBERA, C.; ROCHE JULIAN, M.L.; CABALLERO GALVÁN, C. Efecto del virus de la artritis encefalitis caprina sobre la producción y composición de la leche en cabras Murciano-Granadinas. *Pequeños Rumiantes*, v.3, p.26-30, 2002.
- NORD, K.; ADNOY, T. Effects of Infection by Caprine Arthritis-Encephalitis Virus on Milk Production of Goats. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.2391-2397, 1997.
- PUGH, D.G. *Clínica de ovinos e caprinos*. São Paulo: Roca, 2004, 513p.

Alterações histopatológicas...

RICARTE, A.R.F. Avaliação da susceptibilidade de gametas e embriões caprinos ao vírus da artrite encefalite caprina. 2009. 114f. (Doutorado em Ciência Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

ROWE, J.D.; EAST, N.E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.*, v.13, p.35-53, 1997.

ZINK, M.C.; NARAYANO, O.; KENNEDY, P.G. Pathogenesis of visna/maedi and caprine arthritis-encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet Immunol Immunopathol.*, v.15, p.167-180, 1987.