

PAULO ROBERTO GALDINO DE LIMA

**PREVALÊNCIA DA LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS NO
ESTADO DO PARÁ**

Belém, Pará
1999

PAULO ROBERTO GALDINO DE LIMA

**PREVALÊNCIA DA LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS NO
ESTADO DO PARÁ**

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-graduação em Medicina e
Saúde Animal, do centro Agropecuário
da Universidade Federal do Pará,
Museu Paraense Emílio Goeldi e
Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária, com requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal.

Área de concentração: Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lászlóné Éva Monár - UFPa

**Belém, PA
1999**

PAULO ROBERTO GALDINO DE LIMA

PREVALÊNCIA DA LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS NO ESTADO DO PARÁ

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre no curso de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Centro Agropecuário pela comissão formada pelos doutores:

Orientador:

Profa. Dra. Lászlóné Éva Molnár
Centro Agropecuário
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. László Molnár
Centro Agropecuário
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Elyzabeth da Cruz Cardoso
Departamento de Patologia e Medicina Veterinária Preventiva
Faculdade de Ciências Agrárias do Pará

Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro
Departamento de Medicina Veterinária
Faculdade de Ciências Agrárias do Pará

21 de maio de 1999
BELÉM

“A meta final de qualquer pesquisa não é a objetividade, mas a verdade”.

Helene Deutsch

Agradecimentos

- A Jesus Cristo, pela reorganização de meus pensamentos e incremento e minha fé;
- Aos meus pais, responsáveis por minhas formações moral e intelectual;
- À minha esposa Fátima e aos meus filhos Thayse, Thalles e Thayane, pela paciência, compreensão e incentivo;
- À Prof^a. Dra. Lászlóné Éva Monár (UFPa), que assumiu a orientação após a defesa do projeto de dissertação e que desde o início da pesquisa nos orientou na realização dos testes laboratoriais, bem como, pela sua dedicação, apoio, determinação e amizade que se estabeleceu;
- Ao Prof^o László Molnár (UFPa), pelas sugestões, críticas construtivas e prestimoso apoio na execução deste trabalho, bem como, pelo diálogo e amizade estabelecida;
- Ao Prof^o. Dr. William Gomes Vale (UFPa), pelas palavras de incentivo, apoio e amizade já estabelecida através de duas décadas e meia;
- Ao Prof^o. Dr. Erno Túry (UFPa), orientador na fase do projeto de dissertação, pelos ensinamentos, diálogos e amizade que se estabeleceu;
- À Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Pará - EMATER-Pará, pelo apoio e confiabilidade em nosso trabalho;
- Ao Serviço Nacional de Aprendizagem Rural – SENAR / Reg. Pará, que nos deu a oportunidade de estar presente na maioria dos municípios citados nesta pesquisa;
- Ao centro Agropecuário da UFPa, pela realização do curso de mestrado;

- Ao Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades Animais da UFPa - LIDEA, pelo apoio que nos foi dado;
- A FAO/ IAEA, Vienna; pela remessa dos *kits* do ELISA;
- Em especial ao amigo e colega Médico Veterinário Humberto Soares Ferreira (Centro de Primatas da FSESP), colaborador incassável, pelo prestimoso apoio na informática, em todas as fases de preparação deste trabalho;
- Aos Profs. Drs. Eduard Harry Birgel (USP) e José de Angelis Côrtes (USP), pelo envio de matéria literário específico, bem como, pelo incentivo e amizade;
- Aos Profs. Otávio Mitio Ohashi (UFPa), José Diomedes Barbosa Neto (UFPa) e Haroldo Francisco Lobato Ribeiro (FCAP), pelo sincero apoio, incentivo e amizade;
- Aos Médicos Veterinários: Antônio Gonçalves de Andrade (Altamira), Arnaldo de Mello Henriques Junior (Capanema), Fernando Antônio Albert (Santarém), José Eloy de Barros Neto (Rondon do Pará), José Luiz Rolland (Conceição do Araguaia), Kleber Mendes dos Santos (Itaituba), Leonardo Munhen Ferreira (Rio Maria), Rodolfo Eugênio Fonseca Nunes (Belém), Roberto Souza Lima da Silva (Igarapé-Açu) e Rui Ikegami (Monte Alegre), pelo fornecimento de informações e apoio na coleta de material a nível de campo;
- Aos Engenheiros Agrônomos: Creeden Gauch (EMATER-PA), Otávio César Durans de Oliveira (EMATER-PA), Mauro Farias Gato (SENAR/PA), Celso Iran Pugett Botelho (SENHAR/PA), e Rubens Nazeazeno Ferreira Britto (SEBRAE/PA) pela amizade e apoio ao presente trabalho;
- Ao amigo Vasco Alexandre (Paragominas), pelo apoio nas coletas de sague a nível de campo;
- Enfim, a todos aqueles que contribuíram de maneiras direta e indireta na realização deste trabalho.

Lista de abreviaturas

- ADA - Prova de atividade da adenosina deaminase
- CD. 8 - Marca de linfócito
- D. O. - Densidade ótica
- ELISA - Imunoabsorbância por ligação de enzimas
- EUA - Estados Unidos da América
- FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
- FC - Fixação de complemento
- GP 51 - Antígeno glicoproteico
- GP60 - Antígeno glicoproteico
- HTLV - Vírus linfotrópico que ataca as células T do homem
- IAEA - Agência internacional de Energia Atômica
- IDAG - Imunodifusão em ágar gel
- IFI - Imunofluorescência indireta
- ISCOM - Complexo imunoestimulante
- LEB - Leucose Encoótica dos Bovinos
- LIDEA - Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades

Animas

- ON - *Overnight*
- P 24 - Antígeno Proteico
- P 25 - Antígeno Proteico
- P 53 - Antígeno Proteico
- P P - Percentagem de positividade
- PCR - Reação da polimerase em cadeia
- Reb. - Rebanho
- RIA - Radioimunoensaio
- TMB - Componente químico do cromógeno
- UFPa - Universidade Federal do Pará
- USP - Universidade de São Paulo
- VLB - Vírus da leucose bovina
- ZVK - Agência alemã de negócios

Sumário

Epigrafe.....	i
Agradecimentos.....	ii - iii
Lista.....	iv
Sumário.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Definição.....	1
1.2. História.....	1
1.3. Etiologia.....	2
1.4. Epidemiologia.....	3
1.5. Patologia.....	10
1.6. Sinais clínicos.....	13
1.7. Diagnósticos.....	13
1.8. Prevenção, controle e erradicação.....	22
1.9. Objetivos.....	25
2. Material e Métodos.....	26
2.1. Animais.....	26
2.2. Amostras.....	28
2.2.1. Soro sanguíneo.....	28
2.2.2. Leite.....	28
2.3. Prova sorológica.....	28
3. Resultados.....	31
4. Discussão.....	37
5. Conclusões.....	44
6. Referencias Bibliográficas.....	45

Resumo

Em 31 rebanhos bovinos de 18 municípios localizados nas seis mesorregiões do Estado do Pará, Brasil, foram colhidas 514 amostras de soro sanguíneo e 118 amostras de leite para mensurar a prevalência da infecção pelo vírus da LEB. Estas amostras foram examinadas através do método ELISA Indireto. De 514 soros sanguíneos aptos para exame resultaram positivas 364 amostras, o que representa 70,81 % de prevalência. Em todos os 31 rebanhos, exceto um, foram encontrados animais soropositivos. A prevalência de soropositividade alternou-se entre 5 e 100%. Examinando os resultados segundo a faixa etária, descobriu-se que a proporção da infecção aumenta com o avanço da idade, entretanto, não foi encontrada diferença importante segundo a idade (as amostras foram provenientes de animais entre 3 e 12 anos de idade). Contudo, em 98 animais do total destes rebanhos, as amostras de leite foram colhidas entre um e dois anos após a coleta das amostras de sangue. Todas as 20 amostras de leite, bem como, as 19 de sangue que foram simultaneamente colhidas resultaram em positivas. Acredita-se que o exame do leite através do método ELISA Indireto seja bastante promissor.

Palavras chaves: leucose enzoótica dos bovinos, ELISA Indireto, soro sanguíneo, soro de leite, prevalência, Estado do Pará.

Abstract

In order to examine the prevalence of bovine leukosis virus antibodies 514 blood serum samples and 118 milk samples were collected from 31 bovine herds, located in 18 municipalities in the State of Pará. These samples were examined by Indirect ELISA Test. From 514 blood serum samples, we found that 364 resulted positive with 70,81 % of prevalence.

Among 31 bovine herds 30 had serum positive animals and only one was without infection.

The prevalence of the serum positivity varied between 5 and 100 %. There were no results of any significance among ages, however the percentages of infection raises with aging.

The samples of milk were collected from 12 bovine herds and 98 animals out of those had its milk samples collected one to two years later the blood serum samples collection. All 20 milk samples and 19 blood serum samples collected at the same time from the same cows resulted positive by Indirect ELISA Test that had a great performance, as it was proved.

Index terms: enzootic bovine leucosis, Indirect ELISA, blood serum, milk serum, prevalence, State of Pará.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição

A leucose enzoótica dos bovinos, LEB, é uma doença infecciosa causada por um Retrovírus. A enfermidade desenvolve-se lentamente, afetando os órgãos linfopoiéticos e seu prognóstico é grave, sendo que a forma tumoral sempre culmina com a morte.

1.2. História

As primeiras referências sobre a LEB, datam de 1861, em um rebanho criado no oeste do rio Elba, na Alemanha (Marçal, 1993). Somente foi descrita detalhada e profissionalmente pela primeira vez por Knuth e Volkmann em 1916 (Szent-Iványi & Mészáros, 1985), que estudando a doença, verificaram ser a sua forma tumoral precedida de um quadro clínico onde o número dos leucócitos presentes no sangue encontrava-se elevado. A partir desta observação, baseou-se o diagnóstico hematológico da LEB, concluindo-se de que se tratava de uma enfermidade infecciosa. Somente em 1969 conseguiu-se comprovar a infecção com a demonstração do vírus pela microscopia eletrônica na espécie bovina (Miller et al. 1969) e pela inoculação em ovinos (Wittman & Urbaneck, 1969, citada por Szent-Iványi & Mészáros 1985).

Está pressuposto que a LEB originou-se na região do Mar Báltico, de raças bonivas leiteiras criadas de modo intensivo, porém, na atualidade é considerada de ocorrência cosmopolita. A LEB foi trazida da Europa para as Américas na primeira parte deste século e retornou à Europa através da importação da raça Holstein Canadense proveniente da América do Norte (Tekes, 1984; Johnson & Kaneene, 1992).

No Brasil, Rangel & Machado no ano de 1943, fizeram o primeiro registro da ocorrência de linfossarcoma em bovinos, podendo ser esta, considerada como a primeira referência sobre a LEB (Birgel Junior, et al. 1995). Posteriormente, esta enfermidade foi cientificamente reconhecida por Merkt et al. (1959) e Santos et al. (1959). As alterações hematológicas foram descritas

por vários autores (Merkt et al., 1982; Garcia, 1989; Birgel Junior, 1991) e atribuem-se a Angelo et al. (1985) o isolamento do VLB. Pressupõe-se que a infecção foi introduzida no País, provavelmente, em uma época anterior à identificação do agente etiológico, bem como, ao desenvolvimento das técnicas de diagnóstico (Flores, et al. 1992)

1.3 Etiologia

A doença é causada por um Retrovírus denominado Vírus da Leucose Bovina que tem como característica usar a enzima transcriptase reversa para sintetizar o DNA à partir do seu material genético, composto de RNA (Tambasco et al. 1997)

O VLB pertence ao grupo dos Oncovírus, subfamília Oncovirinae, família Retroviridae. Esse vírus possui parentesco na sua estrutura com o vírus linfotrófico de células T no homem (*Human T- Cell Lymphotropic Virus*, HTLV), causando a leucemia (Seiki et al. 1983). Por causa da semelhança entre esses dois vírus, o VLB representa um modelo para investigação da etiopatogênese da leucemia no homem (Sagata et al. 1985; Burny et al. 1988). Entretanto, o VLB produz proliferação nos linfócitos B, enquanto o HTLV ocasiona neoplasia dos linfócitos T (Burny et al. 1988; Depelchin et al. 1989). Em virtude da semelhança entre esses vírus vários estudos foram realizados para determinar se o VLB contagia o homem, principalmente através do consumo de leite de vacas infectadas. Atualmente, não existem provas que justifiquem essa transmissão e em geral é aceito que o VLB não causa perigo ao ser humano (Lucas, 1996).

O VLB é um vírus RNA envelopado, que infecta principalmente os linfócitos B, produzindo um pró vírus DNA que ao integrar-se no genoma dos linfócitos, induz a produção tumoral destas células (Graves et al. 1977). Mede cerca de 100 nm e todas as suas proteínas estruturais são antigênicamente ativas (Galiero & Fraulo, 1998)

Até os últimos anos, foi-se atribuído um certo tropismo do VLB apenas pelos linfócitos, porém recentemente, determinados exames demonstraram que este vírus possui um tropismo mais amplo. Ficou comprovado posteriormente, que o VLB também possuía um determinado

tropismo por células epiteliais da glândula mamária (Buehring et al., 1994), monócitos, granulócitos e CD 8⁺ célula T (Schwarz et.al., 1994), e que somente a população de células B são infectadas em nível significativo no sangue periférico (Mirsky et al., 1996)

O VLB contém alguns tipos de antígenos entre os quais, dois são os antígenos principais: o antígeno externo, encontrado no envelope, composto de glicoproteínas, designado de GP 51 ou GP 60 de 70.000 Daltons e o antígeno interno, composto de proteínas denominado P 24 ou P 25 de 24.000 Daltons; e a enzima transcriptase reversa, que o permite produzir cadeias de DNA acopladas a estrutura do seu próprio RNA (Cruz, 1988). Ultimamente, foi demonstrado que a estrutura do GP 51 configura-se diferente em diversas cepas de VLB (Molteni et al., 1996).

O VLB acomete especificamente os bovinos, mas existem evidências sobre a ocorrência em ovinos, bubalinos e também em capivaras (Burny et al., 1985; Lucas, 1996). Tem sido também inoculado experimentalmente em ovinos, caprinos e suínos (Mammerickx et al., 1981), macacos Rhesus (Schödel et al., 1986) e coelhos (Baumgartner & Olson, 1982). O vírus produz regularmente tumores nos ovinos, raramente nos bovinos e excepcionalmente nos caprinos. Até agora, não foi verificada a presença desses tumores em suínos e coelhos, estes últimos geralmente morrem após a infecção, principalmente, se esta ocorre em animais jovens (Merza et al., 1989).

A resistência do VLB é muito baixa. Fora do organismo ele fica inativado rapidamente (Szent-Iványi & Mészáros, 1985); é sensível aos solventes lipídicos e detergentes em geral, podendo ser destruído à 50° C em 30 minutos, contudo, resistente à luz ultra violeta e ao raio-X (Weiblen, 1991).

1.4 Epidemiologia

O VLB acomete basicamente os bovinos, afetando todas as raças de ambos os sexos (Ereno, 1988) e se caracteriza pela sua fácil disseminação entre os animais susceptíveis, favorecida pela concentração de animais e permanência dos mais velhos no rebanho (Cordeiro et al., 1994), entretanto, a

sensibilidade dos bovinos à linfocitose persistente, como também à tumores, é determinada geneticamente (Lucas, 1996).

O agente tem uma distribuição mundial, apesar das taxas de prevalência variarem amplamente entre os continentes e países, sendo esporádica a sua apresentação na Ásia, África e Oceania, ao contrário do que ocorre na América e Europa, onde a forma é enzoótica. Existe em alta prevalência em alguns países (Villouta et al., 1994), como por exemplo; na Nova Zelândia com 36 % (Parrish et al., 1982); Israel com 25 % (Oliveira et al., 1994) Austrália com 30 % (Eaves et al., 1982); Chile com 35,9 % (Villouta et al., 1994); Costa Rica com 18,4 % dos animais e 51 % dos rebanhos (Jiménes et al., 1995); Estados Unidos da América com 23 % de vacas e 69,6 % dos rebanhos (Sargeant et al., 1997); na Tanzânia com 36 % (Schoepf et al., 1997); e na Turquia com 5,2 % (Lyisan et al., 1997)

A situação relativa à prevalência da LEB mudou muito nos últimos 20 anos. A prevalência da doença foi a mais alta nos países desenvolvidos da Europa. Por isso, começaram a surgir programas de erradicação em vários países; em 1976, na Bélgica e Alemanha; em 1978, na Áustria; em 1979 na Holanda, e em 1982 na Hungria. O combate à doença começou mais cedo na Dinamarca em 1959, através de exames para linfocitose persistente, e este país passou a utilizar a imunodifusão em gel de ágar desde 1976 para a detecção da infecção pelo VLB (Tekes, et al., 1984). Grande parte destes países conseguiu erradicar totalmente a LEB e outros manter a ocorrência da infecção em condições mínimas.

Na Estônia, o programa nacional de controle da LEB vem conseguindo excelente progresso. Segundo Viltrop & Laht(1996) a média anual de casos da doença que era de 180 por 100.000 vacas na década de 80, caiu para quatro casos em 1994, e a prevalência de animais infectados que era de 31,4% em 1989, caiu para 0 % em 1994.

Em outros países a situação mostrou-se diferente. Entre 1983 e 1991, na região Wroclaw na Polônia, foram examinados amostras de 9 a 14 % dos animais para presença de LEB. A prevalência da infecção variou entre 7 a 27 % nos rebanhos individuais. Em 1991, foi introduzido o exame obrigatório

utilizando IDAG e ELISA. A porcentagem de soropositividade foi de 5,8 %, 3,6%, 1,7 % e 1,6 %, nos anos de 1992, 1993, 1994 e 1995, respectivamente. O número de reações positivas foi o dobro nos rebanhos coletivos em relação aos rebanhos privados. Em 1995, de 129 rebanhos (propriedades de cooperativas) somente 10 rebanhos foram considerados livres da doença, enquanto 448 dentre 964 rebanhos privados encontraram-se sem sororeagentes (Otachel-Hawranek, 1997).

Na Argentina, numa província de Buenos Aires, entre 1994 e 1995, foram examinadas 4.203 amostras de leite oriundas de 73 rebanhos leiteiros, através do ELISA Indireto. O resultado foi o seguinte: 31,5 % dos rebanhos foram considerados livres da infecção; em 49,4 % dos rebanhos encontrou-se o nível da infecção entre 1 a 15 %; em 17,8 % de 16 % a 30 % e em 1,3 % dos rebanhos a ocorrência da doença foi mais que 30% (Gehzzi et al., 1997). Os pesquisadores concluíram que o avanço da infecção pelo VLB se deu porque entre 1979 e 1981, o percentual de 95,65 % dos rebanhos estava livre da infecção. Por outro lado, eles ficaram otimistas, devido à cerca de um terço do rebanho estar livre da infecção e 49,4 % dos rebanhos estarem infectados em baixo nível.

No Brasil, os levantamentos sorológicos através da prova de IDAG foram feitos em vários Estados (no Pará, também com ELISA, exclusivamente). Birgel Júnior, et al. (1995), resumiram os dados resultantes dos bovinos sororeagentes nos citados levantamentos sorológicos (exceto Pará, por ser recente), assim: Paraná com 20,7 % e 7,0 %; Minas Gerais com 70,1 %; 70,9 %; 26,7 % e 28,4 %; Rio Grand do Sul com 19,0 %; 32,6 %; 14,2%; e 20,7 %; São Paulo com 60,0 %; 35,6 %; 51,2 %; 52,6 %, 42,9 %; 53,5% e 4,1 %; Ceará com 9,1%; Rio de Janeiro com 53,3 % e 26,9%; Acre com 9,7 %; Bahia com 16,9 %; Goiás com 35,9%; Pernambuco com 13,8 %; e Rondônia com 23,0 %. No Pará com 49,8% e 26 % no ELISA e IDAG, respectivamente (Molnár et al., 1997) Atualmente, a LEB encontra-se presente, praticamente, em todos os estados brasileiros (Garcia et al., 1995) e, a propagação da doença dar-se de foram intensa e incontrolável (Távora & Birgel, 1991).

Apesar de todas as raças serem susceptíveis, a enfermidade acomete com maior frequência o gado leiteiro, devido ao estreito contato entre os animais no rebanho (Tambasco et al., 1997), e pelos diferentes tipos de manejo e tecnologia empregados (Birgel Júnior et al., 1995). Curiosamente, no Japão (Flores, 1992), tais valores se invertem, fato justificado pelo sistema de criação do gado de corte ser de caráter mais intensivo do que o utilizado para animais leiteiros.

A possibilidade de transmissão do vírus para o homem é real, pois ele está presente no leite de vacas infectadas (Szent-Iványi & Mészáros, 1985) e a transmissão tem ocorrido nos chimpanzés desta forma, mas os estudos ora realizados, embora exaustivos, ainda estão incompletos, para afirmar tal hipótese (Blood & Radostits, 1991).

A transmissão do vírus pode ocorrer de maneira vertical e/ou horizontal. Teoricamente, a transmissão vertical pode ocorrer pelas seguintes maneiras: o VLB pré vírus integra-se no DNA das células germinativas (óvulo ou espermatozoide); através da infecção do feto no útero ou através de consumo de colostro e leite. O VLB pode integrar-se ao genoma de células tumorais, entretanto, não ocorre (Mészáros et al., 1986). A transmissão transplacentária pode ocorrer, pois o vírus é capaz de atravessar a barreira placentária, entretanto, há divergências em relação às possibilidades de contaminação por esta via, entre os autores. Para Ferrer et al. (1976), e Pipper et al. (1979) esse tipo de infecção pode ocorrer entre 13 e 18 % dos bezerros nascidos de vacas infectadas. Segundo Mészáros et al. (1986), a infecção transplacentária só ocorre excepcionalmente. Ereno (1988), afirma que este modo de transmissão é raro e, ultimamente, Domkus et al. (1996), asseguraram que a infecção pré-natal do VLB não tem importância na prática. A infecção através do colostro ou ingestão de leite contaminado é muito semelhante e acontece com pouca frequência, segundo Birgel Júnior et al. (1995). Mészáros et al. (1986), citam que esta proporção pode ultrapassar em 10 %. Segundo um estudo mais recente (Hopkins & Di Giacomo, 1997) a transmissão vertical (no útero e/ou através do colostro e leite) representa um papel relativamente pequeno.

A transmissão horizontal ocorre pelo contato entre animais pertencentes ao mesmo rebanho. Este tipo de infecção pode ser realizado em qualquer caso, se forem transferidas na ocasião, células infectadas (linfócitos B) para animais sensíveis. Sem dúvida alguma, os processos iatrogênicos são os principais meios de transmissão do vírus. Segundo Weiblen (1991), cerca de 0,0005 ml de sangue pode conter a quantidade de vírus que é suficiente para provocar a infecção quando inoculado pelas vias subcutânea, intradérmica, intramuscular e endovenosa. Assim sendo a infecção pode ser transmitida pelo teste de tuberculina intradérmica, descornas, alicate de tuatagem de orelha, agulhas hipodérmicas e transfusão sanguínea (Blood & Radostist, 1991). Segundo Szent-Iványi & Mészáros (1985) a tuberculinização intradérmica bem realizada, não transmite o vírus. A troca de agulha somente se faz necessária se no local da aplicação aparecer sangue. Já em 1982, constatou-se a possibilidade de estar importando-se animais infectados, mas, as variações observadas estariam mais relacionadas à infecção pós premunicação do que a importação de animais sororeagentes (Birgel, 1982). Então, a importação de animais infectados tem grande importância no mundo inteiro. Na Etiópia, em três rebanhos que tiveram vacas importadas de raça Friesian, a porcentagem de animais soropositivos foi muito mais alta (44 %; 33/75) do que em rebanhos sem soropositivos de Friesians (8 %; 10/129) (Heinonen & Assefa, 1996). Acredita-se que a importação de animais infectados tenha ocorrido no Brasil em grande frequência. Este fato foi observado várias vezes através de literaturas, entretanto, a grande maioria das importações deste tipo não foi detectada. A respeito deste assunto foram feitas observações interessantes na Hungria, que podem ser úteis com relação a situação atual no Brasil. Na década de 70, a Hungria importou cerca de 40 mil novilhas dos EUA, Canadá e de outros países da Comunidade Europeia, com o objetivo de melhorar a produção de leite de seus rebanhos. Com o início do desenvolvimento de programas de erradicação da LEB em alguns países da Comunidade Europeia, o Ministério da Agricultura da Hungria, ordenou a realização de um inquérito sorológico à partir de 1980, com o objetivo de avaliar a difusão da doença. Os resultados deste inquérito indicaram que todos os rebanhos leiteiros compostos da raça Friesian-Holandesa importadas dos EUA e Canadá estavam infectados e, que a prevalência da soropositividade de um rebanho pela imunodifusão

variou entre 17 % a 53 %. Nos rebanhos importados da Alemanha e Suécia também encontraram-se rebanhos infectados, porém não se constatou a infecção em animais importados da Finlândia e nem da Holanda. Outrossim, os rebanhos húngaros nativos aonde haviam-se colocados touros da raça Friesian-Holandesa, com o objetivo de melhoramento genético, todos apresentaram-se infectados, contudo, ficaram diluídos para a inseminação artificial (Tekes et al., 1984; Mészáros et al. 1986).

A premunicação pode ser uma fonte de infecção muito importante (Birgel, 1982; Birgel Junior et al., 1995). Rogers et al. (1988), reportaram um caso de difusão de VLB em vacas vacinadas contra a “febre do carrapato”. A vacina foi produzida de um bovino que não reagiu sorologicamente à IDAG. Acredita-se que o perigo desta forma de infecção é muito grande no Brasil, tendo em vista que, os animais utilizados como doadores de sangue para premunicação contra hemoparasitas, não são examinados regularmente para a infecção do VLB. Em um exame sorológico através da IDAG, em Londrina, Paraná, 94,4 % (17/18) dos animais doadores foram positivos (Beuttemüller et al., 1996).

Vários autores cogitam a possibilidade de transmissão por vetores como carrapato ***Boophilus microplus***, insetos como o ***Stomoxys calcitrans*** (Santos et al., 1985), ácaros e helmintos (Birgel, 1983) moscas e morcegos hematófagos (Romero et al., 1982). É impossível excluir a possibilidade de transmissão do VLB através de insetos hematófagos, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais onde a quantidade destes insetos é extremamente abundante. Ultimamente, na África do Sul, foram efetuados exames detalhados sobre o possível papel de transmissão do VLB por duas espécies de carrapatos: o ***Rhipicephalus appendiculatus*** e o ***Amblyomma hebraeum***. Num experimento, cerca de 400 carrapatos foram colocados para parasitar a vaca infectada pelo VLB e após ingurgitados foram homogeneizados em diferentes intervalos e inoculados subcutaneamente em ovinos soronegativos. Nenhum dos ovinos soroconverteram durante 13 meses de experimento. Segundo Morris et al., (1996), os carrapatos não têm grande importância na transmissão do VLB na África do Sul.

A maioria dos autores não tem encontrado o VLB no sêmen de touros (Cruz, 1988). Entretanto, se touros sororeagentes forem utilizados para cobertura natural, uma parte das vacas se tornará infectada dentro de algum tempo (Mészáros et al., 1986). Por outro lado, utilizando-se o sêmen diluído de touros infectados em vacas inseminadas artificialmente, estas não se tornarão infectadas. Por isso, os processos de inseminação artificial, assim como, a transferência de embriões, geralmente são aceitos como ferramentas possíveis para controlar a difusão do VLB (Mészáros et al., 1986; Cruz, 1998; Blood & Radostits, 1991; Oliveira et al., 1994).

As experiências com transmissão do VLB asseguram que o vírus aparece intermitentemente na urina, e está presente nos lavados traqueais, nasais e eventualmente nas fezes, então, estes fatores podem ser também fontes de infecção. Todavia, devido a baixa resistência do VLB, estas secreções podem infectar animais sensíveis apenas dentro de curto tempo (Szent-Iványi & Mészáros, 1985). Tekes (1989) demonstrou que o controle para a erradicação da LEB seria possível colocando-se animais infectados juntos com outros não infectados dentro de um mesmo estábulo, e divididos em dois grupos que ficassem separados pelo menos entre dois e três metros de distância um do outro. Porém, se os animais infectados e os não infectados fossem colocados sem distância de isolamento, cerca de 8 a 10% dos animais soronegativos tornar-se-iam positivos em dois anos.

É de amplo conhecimento, que no caso da LEB a infecção pode difundir-se rapidamente, caso não seja realizado um controle voltado para a erradicação da doença. Na prática demonstrou-se a existência de rebanhos com soropositividade entre 20 a 25 %, com a frequência da infecção aumentando entre 60 a 65 % durante três anos (Mészáros et al., 1986). Mas, para as condições no Brasil, a difusão da doença parece ser mais lenta, não somente pela extensão territorial, como pela variabilidade de manejo utilizada, porém em alguns casos as observações também foram muito semelhantes daquelas observadas em outros países (Samara et al., 1996).

Existem dados que atualmente não podem ser avaliados. Por exemplo: Segundo Jian & Fang (1997), a alta quantidade de cobalto e cádmio aumentam a susceptibilidade de bovinos à LEB.

Os rebanhos infectados produzem de 2,5 a 3 % menos leite que os não infectados. Os sororeagentes são mais sensíveis às diferentes doenças infecciosas como mastite, diarreia e pneumonia, entretanto, a influência da infecção na fertilidade é considerada mínima (Emanuelsson et al., 1992).

Um rebanho composto de animais da raça Jersey, na província de Cartago, Costa Rica, foi examinado para determinar a eficácia da infecção pelo VLB para fins de produção, reprodução e prevalência da mastite durante o período de 1986 a 1992. Conclui-se que: a infecção pelo VLB, sem sinais clínicos não produz prejuízos na produção reprodução e nem em índices de mastite (Schram & Aragon, 1994).

Examinados 102 rebanhos (69,9 % deles estava infectado) leiteiros no Ontário, EUA, encontrou-se uma associação negativa entre a produção de leite a nível de rebanho e a infecção da LEB (Sargeant et al., 1997).

Segundo Pelzer (1997), um rebanho infectado pelo VLB sofre danos econômicos diretos devido ao linfossarcoma clínico, mas, os danos indiretos são mais elevados por causa da proibição da venda dos animais e do germoplasma para o mercado externo.

1.5. Patologia

O linfossarcoma dos bovinos pode ser dividido em quatro formas: bezerro (juvenil), tímica, cutânea e adulto multicêntrica. As formas bezerro, tímica e cutânea são conhecidas como leucoses esporádicas dos bovinos e não existem dados que comprovem que as mesmas sejam enfermidades infecciosas (Klintevall et al., 1993). Podem ser encontrados casos que não devem ser atribuídos à nenhum grupo dessas formas mencionadas (Lucas, 1996). Recentemente, foi descrito um caso desse tipo (Southwood et al., 1996), onde uma vaca com quatro anos de idade, da raça Angus, demonstrou um determinado engrossamento na parte caudal do pescoço. Utilizando-se de provas sorológicas o animal evidenciou resultado negativo ao VLB. Os resultados dos exames hematológicos também foram normais. Após sacrifício

do animal, foram encontradas lesões na traqueia, esôfago e musculatura do pescoço. Logo, demonstrou-se que quanto à localização e estrutura das lesões macroscópica havia muita semelhança que coincidia com a forma tímica, porém, o caso não pôde ser considerado para nenhuma das quatro formas citadas.

Somente a forma adulta multicêntrica do linfossarcoma pode ser produzida pelo VLB (Van der Maaten & Miller, 1990), sendo essa enfermidade denominada de Leucose Enzoótica dos Bovinos, e segundo os estudos atuais, só essa forma de linfossarcoma tem importância econômica, pois a mesma, causa infecção em massa mundialmente, e as demais formas são diagnosticadas esporadicamente

Para entender o modo de infecção pelo VLB, o mais importante é se conscientizar que as infecções geralmente são subclínicas, e que somente 30 a 70 % dos animais infectados desenvolvem-se tumorações (Lucas, 1996). Há divergência entre diversos autores a respeito da frequência no desenvolvimento do linfossarcoma. Segundo Lewin (1989), cerca de 70% dos animais apresentam o linfossarcoma após um período de latência que varia de um a oito anos. Buehring et al (1994), acreditam que o VLB produz geralmente uma infecção subclínica nos bovinos e menos de 1 % dos animais infectados desenvolve linfoma de células B, após alguns anos da infecção. Segundo Burny et al. (1980 e 1985), em bovinos infectados pelo VLB, cerca de 11 % dos mesmo desenvolve-se linfocitose persistente e/ou linfossarcoma. Em geral, é possível dizer que todas as raças são sensíveis à infecção, praticamente no mesmo nível, entretanto, com relação ao desenvolvimento da tumoração as diferenças são muito grandes. Ninguém pode responder certamente porque isso ocorre, mas, vários autores citam que o aparecimento da linfocitose persistente e/ou linfossarcoma surge como uma consequência ligada à determinação genética (Birgel, 1983; Cruz, 1988; Blood & Radostist, 1991). Segundo Szent-Iványi & Mészáros (1985), a ocorrência de tumorações ocorre com muito mais frequência em algumas famílias de vacas nas mesmas condições que em outras famílias, e este fato também confirma que a sensibilidade ao desenvolvimento de tumoração está ligada à determinação genética.

A patogenia da infecção experimental começa pelo estabelecimento rápido da infecção no baço, pois o vírus é detectado neste órgão, oito dias após esta fase esplênica inicial, o vírus aparece nos leucócitos do sangue periférico, onde é possível ser demonstrado (Van der Maaten & Miller, 1990), e o vírus por conter a enzima transcriptase reversa, permite produzir cadeias de DNA acopladas à estrutura do seu próprio RNA, essas cadeias se inserem na cromatina nuclear do linfócito, permanecendo ao longo da divisão celular.

Como já foi referido no tópico “Etiologia”, o VLB possui parentesco na sua estrutura com o vírus HTLV e que o VLB produz proliferação nos linfócitos B, enquanto o HTLV ocasiona neoplasia dos linfócitos T. Portanto, assegura-se que as células do tumor induzidas pelo VLB, não foram caracterizadas suficientemente até agora, mas parece que as mesmas são pré células B (Burny et al., 1988; Depelchin et al., 1989). Apesar da enorme quantidade de pesquisas sobre o assunto, até hoje, muitos detalhes não estão bem explicadas. Tanto o VLB quanto o HTLV, não possuem um oncógeno conhecido e incorporado aos seus genomas, da mesma forma que não possuem um lugar preferido para se integrarem nas células do tumor. Esse fato sugere que o mecanismo para iniciação do tumor, no caso do VLB e HTLV, é diferente de outros retrovírus oncogênicos (Seiki et al., 1983; Sagata et al., 1985).

Devido ao desconhecimento do processo de desenvolvimento de linfossarcomas bovinos, foram analisados 38 casos de linfoma bovino utilizando o tipo de classificação morfológica do linfoma humano (Vernon et al., 1997). O estudo suporta a hipótese que, a infecção e transformação associadas com o VLB ocorre como um processo em várias etapas e em algumas delas, envolvem-se estágios específicos durante a diferenciação de células B, resultando em fenótipo de um tumor comum e uma morfologia predominante, mas não exclusiva. Para Frei (1971), os linfócitos apresentam-se como neoformações revestidas de um caráter profundamente maligno.

É provável, que a mudança do gene da proteína supressora p 53, tenha importância no desenvolvimento e processo de tumores humano. No mesmo modo, foi demonstrado que a mutação da p53, ocorre principalmente

em linhas de células VLB – transformadas e parece que essa transformação é necessário para o desenvolvimento da LEB. A homologia do gene p 53 de bovino, no nível de aminoácido, equiparou-se em cerca de 80,9 %; 72,8 %; 52,7 % e 82,3 % com a mesma do homem, camundongo, galinha e gato, respectivamente (Komori et al., 1996). A mutação da p 53 foi examinada em linfócitos oriundos de sangue periférico e de tumores de linfonodos em seis vacas infectadas naturalmente. Uma mutação da p 53 foi demonstrada em três (50 %) desses animais. Nas vacas infectadas, nas quais encontrou-se essa mutação de p 53 no estado de tumor, ocorreu uma proliferação anormal de linfócitos B monoclonais. A mutação não foi encontrada nas células somáticas, somente em células tumorais. Segundo Ishiguro et al., (1997), estes resultados mostram claramente que a mutação da p 53 tem grande importância na patogênese de neoplasmas causados pelo VLB. No entanto, são desconhecidos para os cientistas os fatores que podem causar essa mutação da p 53.

1.6. Sinais Clínicos

A LEB pode determinar manifestações linfáticas, circulatórias, respiratórias, digestivas, reprodutivas, urinária, neurológicas e hematológicas, dependendo do órgão ou sistema envolvido (Gomes et al., 1988). Segundo Frei (1971), esta enfermidade representa um dos mais terríveis padecimento do sistema hematopoiético. Não existem até o momento, possibilidade de cura para a LEB (Garcia et al., 1995), e seu prognóstico é mau com desfecho letal (Corrêa & Corrêa, 1992)

1.7 Diagnóstico

Para o diagnóstico da LEB, como no caso de qualquer doença infecciosa, podem e devem ser usados todos os métodos e possibilidades existentes, assim como, dados epidemiológicos, sinais clínicos e achados anatomohistopatológicos, entretanto, o diagnostico correto atualmente, pode ser realizado somente através de demonstração direta ou indireta do VLB.

Segundo Smith (1993), o hemograma de bovinos com linfossoma, frequentemente, nada apresenta de notável em seus aspectos gerais. Exames

hematológicos (Corrêa & Corrêa, 1992) só ajudam a confirmar o diagnóstico se houver intensa leucocitose com linfocitose.

A citologia dos aspirados de tumores ou de linfonodos tumorais não é instrumento diagnóstico confiável (Smith, 1993).

Com o exame físico, são verificadas as manifestações sintomáticas que se caracterizam por modificações morfológicas ou funcionais do animal enfermo. Esse exame só apresenta bons resultados nas formas clínicas com formação tumoral (Ereno, 1988).

O exame hematológico restringe-se à avaliação do leucograma quantitativa e qualitativa. Nos animais acometidos, já aumento acentuado do número de linfócitos, e grande parte destes linfócitos não estão maduros (Szent-Iványi & Mészáros, 1985; Blood & Radostist, 1991). Na Europa, foram estabelecidas as “chaves leucométricas” de forma diferente, ou seja, em número de três e nomeadas de acordo com o nome de seu pesquisador, assim temos: Goetze (1954), Bendixen (1961) e Tolle (1965), (Szent-Iványi & Mészáros, 1985). Contudo, essas chaves não devem ser aplicadas em animais criados em regiões tropicais e subtropicais, devido o quadro linfocitário dos animais sofrer influência com fatores raciais, alimentares, manejo e outras enfermidades (Cruz 1988). Com o descobrimento da etiologia da LEB (Miller et al., 1969), as chaves leucométricas perderam totalmente seu valor diagnóstico. Aliás, com exames hematológicos foi possível detectar apenas 61,5 % dos casos positivos (Birgel, 1983) e, por outro lado, após o aproveitamento dos testes sorológicos ficou comprovado que uma parte considerável dos animais não infectados pode demonstrar um quadro hematológico muito semelhante aos animais infectados (Szent-Iványi & Mészáros, 1985). Segundo ferreira et al. (1982), o leucograma deixa de reconhecer a enfermidade em muitos animais que permanecem como fonte de infecção.

O diagnóstico anatomopatológico não apresenta dificuldade nos casos típicos. Nos bovinos adultos (geralmente acima de quatro anos), praticamente, qualquer órgão pode ser local das lesões, mas o abomaso, coração, linfonodos viscerais, periféricos e medula, são os órgãos mais comumente acometidos. Em bezerros, os linfonodos viscerais, baço e fígado

são os locais mais comuns (Blood & Radostist, 1991). O desenvolvimento das tumorações é lento nos gânglios linfáticos, em demais órgãos ou ambos (Cruz, 1988). Segundo Gomes et al. (1988), há aumento dos linfonodos superficiais (paratídeos, submaxilares, faringeanos, pré-escapulares, poplíteos, inguinais, ilíaco e pré-crurais) e dos linfonodos internos (retrobulbar esquerdo, mediastínico, mesentérico, hepáticos e renais). Estes linfonodos podem estar compostos de tecido normal e neoplástico, com consistência firme. Já os hemolinfonodos, podem estar infartados, mas isso não tem significado diagnóstico. A distribuição das tumorações é geralmente assimétrica e não generalizada (Cruz, 1988; Blood & Radostist, 1991). O abomaso apresenta várias úlceras hemorrágicas com parede espessada e desigual e com massa tumoral na submucosa, em particular na região pilórica. O coração apresenta-se com invasão tumoral no pericárdio, miocárdio e/ou endocárdio. O átrio direito encontra-se mais frequentemente afetado e pode haver hidropericárdio, hidrotórax. Ingurgitamento da veia jugular e anormalidades das bulhas cardíacas. Outros órgãos afetados podem ser os olhos, com tumorações dos folículos linfáticos retrobulbares. Frequentemente, há lesão na musculatura dos membros, ureter e genitália. No pulmão, há o espessamento da pleura parietal com intensa congestão e edema pulmonar. Geralmente, há tumorações no baço e no fígado (Cruz, 1988; Gomes et al., 1988; Blood & Radostist, 1991).

O diagnóstico histopatológico é obtido através de biópsia ou necrópsia. Segundo Gomes et al. (1988), a população de células neoplásicas pode ser agrupada em três tipos: células pouco diferenciadas com núcleo pequeno e rico em cromatina, arredondadas e com citoplasma escasso; células indiferenciadas com núcleo volumoso, cromatina delicada, dispersas e nucléolos bem evidentes, e células denominadas histiocíticas, com núcleo volumoso, irregular, com cromatina espessa. Observam-se infiltrações nodulares ou difusas nestas células mencionadas, mais frequentemente no abomaso, intestino delgado, linfonodo e medula espinhal. Os linfonodos apresentam indiferenciação entre a camada cortical e medular, e a medula espinhal com infiltração nodular no espaço epidural, produzindo compressão do tecido nervoso.

O VLB foi descoberto através de estudo de culturas de linfócitos oriundas de linfossarcoma de bovino (Miller et al., 1969). No Brasil, ao estudarem a ultra estrutura de linfócitos infectados pelo VLB, evidenciou-se pela primeira vez por microscopia eletrônica, a presença do vírus nestas células linfocitárias (Alencar Filho et al., 1982). Observa-se então, que a demonstração direta do vírus, cientificamente, não apresenta dificuldades, entretanto, esta técnica não pode ser considerada um método de diagnóstico de rotina em massa.

O isolamento do VLB também é possível em culturas de células adequadas, já que o vírus produz sincício. Com o anticorpo específico, esta produção de sincício pode ser inibida e desta forma seria a oportunidade para avaliar se o animal fora infectado ou não. Esta técnica é conhecida desde os anos 80 (Szent-Iványi & Mészáros, 1985), mas tal prova foi considerada como não apta para exames em massa, devido ser bastante dificultosa e necessitar de laboratórios especializados. Entretanto, mais recentemente, foi demonstrado (Johnson et al., 1998) que essa prova de inibição de sincício pode ser mais sensível que a IDAG ou o Western Blot, por isso a prova é bastante promissora.

Também foi avaliada em soros de bovinos com leucose e sem leucose a atividade da adenosina deaminase (ADA) afim de se pesquisar a possibilidade da ADA ser apta para diagnosticar a LEB. Foram examinados animais soronegativos, soropositivos sem sinais clínicos, e animais com leucose clínica. A atividade de ADA em animais com leucose clínica foi significativamente mais alta que em animais sem sintomas clínicos. Concluiu-se que a análise de ADA pode ser um método útil para diagnóstico e prognóstico da LEB (Yasuda et al., 1996)

Posteriormente, à descoberta do VLB (Miller et al., 1969), iniciou-se a elaboração de métodos de diagnósticos para demonstração da infecção baseados nas seguintes provas: imunofluorescência indireta, imunodifusão em gel de ágar com polipeptídeo (p 24) e glicoproteico (gp 51) do vírus (Miller et al., 1976; Hoff-Jorgensen, 1989). Com relação à interpretação de exames imunológicos, Lima et al. (1992), advertem que se deve ter muito cuidado e prudência na interpretação dos mesmos, pois se o diagnóstico clínico for de

certeza, a avaliação imunológica pouco acrescenta e, se normal, deverá ser revista, mas, se o diagnóstico clínico não for de certeza, os exames imunológicos por si sós não podem ser utilizados como confirmatório do diagnóstico, apesar de fornecerem alguma pista e justificarem a continuação da propedêutica.

Com o acúmulo dos conhecimentos e dados, surgiram possibilidades para a realização de estudos comparativos a respeito da sensibilidade dos métodos de diagnósticos, assim como, sobre a aplicabilidade dos mesmos. Desta forma, novas observações surgiram, como por exemplo: quando o antígeno P24 é utilizado através da IDAG, não mostra-se tão sensível quanto o FC (Johnson & Kaneene, 1992), porém, quando utilizado o antígeno GP 51, esse mostrou-se mais sensível que os anteriores (Miller et al., 1981). Os resultados obtidos através de ELISA e IDAG, foram diferentes. Alguns pesquisadores (Manz et al., 1981) consideraram o ELISA mais sensível que o FC, enquanto outros (Miller et al., 1981; Graves et al., 1982) acreditaram não existir diferença significativa na sensibilidade das referidas provas.

Levando-se em conta, que no caso de exames em massa pelo RIA e o IFI, o custo econômico é alto, quer pelos insumos empregados como pela quantidade de trabalho necessária, além da necessidade de aparelhos específicos que são de custo elevado tornando-os fatores limitantes para a sua utilização, assim, nas ultimas duas décadas, o ELISA e o IDAG, por serem mais econômicos tem sido utilizados para o diagnostico e erradicação da LEB.

Os resultados de IDAG, mostraram uma considerável variação no nível de anticorpos dos bovinos infectados com o VLB (Kono et al., 1982), pois em alguns casos, esta flutuação determina um resultado temporariamente negativo. Entretanto, outras pesquisas evidenciaram uma diminuição dos níveis de anticorpos relacionados às fases finais da gestação e do parto, assim como, uma negatividade transitória em alguns animais infectados (Bause et al., 1978; Bause & Schmidt, 1980; BurrIDGE et al., 1982). Tekes (1994), observou que 25 % das vacas analisadas foram negativas na prova de IDAG na época do parto, e constatou também, uma significativa diminuição nos títulos de anticorpos no teste de ELISA, embora todos os animais continuassem sendo positivos. Em uma outra pesquisa, observou-se que em nove animais com tumores típicos da

LEB, todos reagiram positivamente no ELISA e PCR, porém, três deles (33%) foram negativos no IDAG (Klintevall et al., 1993). Em virtude disso, os pesquisadores constataram que o IDAG não é uma prova suficientemente sensível para o diagnóstico da LEB em um único animal. Embora, inúmeros artigos demonstrem que o teste de ELISA seja mais sensível, que a IDAG, ambas as provas, atualmente, também são aceitas como método padrão (*standards*), tanto na emissão de atestados sanitários, como para fins comerciais, quer de exportação ou importação de animais; em aspectos forenses, bem como, em programas de erradicação de enfermidades (Hoff-Jorgensen, 1989; Johnson & Kaneene, 1992; Lucas 1996).

Atualmente, o avanço da genética molecular permite realizar testes diretos para demonstrar o DNA ou RNA. Destas técnicas, no diagnóstico da LEB, a PCR é a mais divulgada. Com a PCR, é possível detectar pequena quantidade de DNA ou RNA. Sendo o DNA resistente a condições ambientais e a PCR muito sensível, torna-se esse método bastante utilizado no diagnóstico da LEB (Jakobs et al., 1992; Klintevall et al., 1993) assim como, utilizando também para demonstrar o pró vírus do VLB nos ovinos (Brandon & Naif, 1991). Também pela PCR, foi demonstrado que, o VLB pode produzir uma infecção persistente nos coelhos. Esta infecção provoca nesta espécie uma disfunção do sistema imune e morte (Wyatt et al., 1989). Em algumas pesquisas, os resultados dos testes sorológicos foram obtidos de acordo com os da PCR (Sherman et al., 1992), em outras divergiram completamente (Murtaugh et al., 1991).

Em uma determinada pesquisa, 27 bovinos com linfoma, foram examinados pelas provas de IDAG, ELISA, *Southern Hibridization* e PCR. Nove deles tinham de um mês a dois anos de idade; e dezoito, de três a doze anos de idade. De nove animais jovens, sete deles, tinham a forma juvenil (bezerro) multicêntrica, e dois, tinham a forma tímica. Destes nove bezerros, três foram soropositivo no ELISA; dois na IDAG, e o pró vírus foi demonstrado em quatro casos de tumores pela PCR. Segundo estes pesquisadores, os dados sugerem que algumas vezes o VLB pode também causar as formas juvenis. Por outro lado, de dezoito bovinos com a forma enzoótica, cinco deles foram negativos pela PCR e, destes cinco, dois foram também soronegativos. Tais dados

sugerem que, nem todos os linfomas são causados pelo VLB nos bovinos adultos, ou então, os métodos aplicáveis atualmente, não são bastante sensíveis para diagnosticar todos os casos de LEB (Jacobs et al., 1992).

Em outro estudo, cinco vacas foram infectadas com o sangue de três animais soropositivos. As vacas soroconverteram entre três a cinco semanas, sendo comprovadas pelo IDAG e, pela PCR, diagnosticou-se a positividade em todas as vacas dentro de sete dias utilizando-se o DNA extraído de linfócitos sanguíneos (Kelly et al., 1992).

A PCR pode ser utilizada como excelente alternativa, pois possui alto nível de sensibilidade para detectar animais infectados e também pode distinguir bezerros infectados com o vírus, dos não infectados, mesmo àqueles que são soropositivos, pela presença de anticorpos colostrais (Ballagi-Pordány et al., 1992). A PCR mostrou-se útil para a verificação da infecção no tempo de nascimento dos bezerros (Agresti et al., 1993). Pesquisadores australianos acreditaram que a PCR seria uma alternativa para bio-ensaio em ovinos com VLB e também um complemento de testes sorológicos nos casos em que se tornasse necessário diagnosticar todos os animais infectados. Contudo, pensaram que por causa da possibilidade de surgirem reações falso-positivas, o uso desta técnica na prática de rotina não seria aconselhável para o diagnóstico da LEB (Eaves et al., 1994).

Foram examinados num determinado estudo, 18 animais em diferentes estágio da LEB para diagnosticar a presença de anticorpos, utilizando-se quatro diferentes *kits* de ELISA e IDAG. Em grande parte dos casos houve consonância entre as diferentes provas, primeiramente, com animais soronegativos. Diferenças foram observadas em animais fracamente positivos e em dois animais oriundos de vacas positivas. Nestes animais encontrou-se um número elevado de linfócitos, mas, foram negativos em IDAG e deram diferentes resultados no ELISA. Já a PCR, pode diferenciar entre reações falso-positivas e possivelmente falso-negativas. Os pesquisadores salientaram que era importante realizar exames comparativos entre os diferentes *kits* de ELISA afim de obterem resultados objetivos (Straub & Bruchhof, 1994).

O ELISA também foi utilizado para detectar anticorpos contra o VLB no leite, em latões. Foram coletadas amostras misturadas de 17 rebanhos e de 12 vacas, individualmente, de rebanhos pequenos. Os resultados foram comparados com os obtidos com exames de soros através da IDAG. Os resultados foram os mesmo nas duas provas, exceto, em quatro casos onde o ELISA no leite foi mais sensível que a IDAG com soros (Otachel-Hawranek et al., 1996). Sargeant et al. (1997), examinaram 97 rebanhos com 13 vacas em média por rebanho através de um ELISA comercial para exame de leite em latões, paralelamente com a IDAG, em soros examinados individualmente. O rebanho era considerado positivo quando um ou mais animais mostrava-se positivo para IDAG. A IDAG mostrou-se positiva em 52,3 % dos rebanhos. Já o ELISA, identificou como positivo 79,4 % dos rebanhos, e a sensibilidade e especificidade dele esteve entre 97 e 65 %, respectivamente. O ELISA no leite foi útil para identificação de rebanhos não infectados. Por causa da especificidade moderada, os rebanhos considerados positivos para a LEB neste ensaio com ELISA, deveriam ser examinados individualmente para afirmar a presença da doença.

Na Turquia, foram examinadas 1.022 amostras de soro sanguíneo e leite através da IDAG e ELISA. Para IDAG, 30 soros de sangue e 26 amostras de leite mostraram-se positivas; já no ELISA, 43 soros de sangue e 41 amostras de leite foram positivas. Treze amostras de soro sanguíneo e quinze amostras de leite mostraram-se positivas no ELISA e negativas na IDAG. De 53 (5,2 %), vacas positivas no ELISA, 31 deram reação positiva nas amostras de soro sanguíneo e leite; em 12 casos deu positivo somente o soro sanguíneo e em 10 casos somente o leite apresentou-se positivo. A prevalência mais alta foi nas vacas aos cinco anos de idade – 15/162 (Lyisan et al., 1997).

Brenner et al. (1994), realizaram um estudo comparativo entre IDAG e ELISA ao testar um rebanho de 167 vacas da raça Israeli-Hostein para detecção de anticorpos anti VLB numa fazenda experimental do Instituto Volconi. Eles aplicaram o ELISA em amostras de leite dessas vacas e obtiveram um resultado de 88 % de soropositividade, comprovando a eficácia deste método para teste de rebanhos em larga escala.

Pesquisadores tchecos (Rodák et al., 1997), idealizaram um ELISA utilizando um anticorpo monoclonal contra a p24, em que foi possível examinar soros sanguíneos misturados de 50 vacas e amostras de leites misturados de 40 vacas. Os pesquisadores acreditaram que o anticorpo monoclonal contra a p24 aumentou consideravelmente a especificidade e a sensibilidade do ELISA, sendo esta prova a mais sensível descrita até agora para demonstrar anticorpos contra a p24. Um ELISA Indireto foi idealizado também por pesquisadores argentinos (Ghezzi et al., 1997). Wawrzkievicz et al. (1989) modificaram a IDAG em diferentes maneiras e deste modo conseguiu-se aumentar a sensibilidade da mesma. Entretanto, o ELISA confirmou-se mais sensível que a sensibilidade da mesma. Entretanto, o ELISA confirmou-se mais sensível que a IDAG modificada (com 4,1 %) e a IDAG *standard* (com 5,25 %). Eles chegaram a conclusão que, a IDAG modificada, pode ser usada onde não existem possibilidades de se utilizar técnicas mais avançadas.

Pesquisadores alemães, ocuparam-se muito com o papel da PCR no diagnóstico da LEB e em vários trabalhos compararam a capacidade de diferentes técnicas (Fechner et al., 1996 e 1997; Blankenstein et al., 1998). Com exame de 90 amostras de soro sanguíneo, foram comparados os resultados obtidos nos testes de IDAG, ELISA e PCR. De 59 amostras oriundas de rebanhos infectados em nível baixo (prevalência menor que 5 %), 52 em PCR, 43 no ELISA e 37 na IDAG, foram positivas. De 18 animais importados, quatro mostraram-se positivos para PCR e somente um foi positivo na IDAG e no ELISA (os outros três foram negativos nestes dois últimos testes). A PCR foi adequada também para diferenciar os bezerros infectados dos soropositivos, devido aos anticorpos maternos. Um só animal foi soropositivo e negativo em PCR. Segundo estes pesquisadores seria inevitável utilizar este teste em processos de erradicação, e na importação de bovinos (Fechner et al., 1996). Estes resultados foram confirmados com outros exames também; e de 34 animais infectados somente 21 foram positivos no ELISA. (Blankenstein et al., 1998).

Em animais infectados experimentalmente, os anticorpos IgM alcançaram o mais alto título de 42 a 64 dias após a infecção, mas os

anticorpos IgG, apresentaram-se em quantidade máxima durante o último estágio de imunogênese entre 182 e 224 dias após a infecção. Não se encontrou diferença importante na quantidade de anticorpos IgG₂ durante o experimento (Kozaczynska et al., 1997).

Em um rebanho leiteiro infectado pelo VLB, foram examinadas 75 vacas através de PCR e ELISA. De 25 animais positivos em ELISA, 20 mostraram-se positivos no PCR e de 24 vacas soronegativas 8 deram reações positivas na PCR. Conclusão: a técnica PCR não foi adequada para o diagnóstico do VLB (Kubis et al., 1997). Em bezerros nascidos de vacas soropositivas a IDAG resultou positiva uma semana após a administração do colostro. Estes anticorpos maternos desapareceram com seis meses de idade. Três vacas infectadas deram reação falso-negativa na época do parto (Hübner et al., 1996).

Foram infectados nove bovinos soronegativos aos nove meses de idade com 100 µl de sangue de uma vaca infectada. Anticorpo gp 51 foi detectado através do ELISA em 30 dias e na IDAG em 60 dias após a inoculação. De três animais que fazia parte do controle e que foram colocados juntos com os infectados, um tornou-se infectado naturalmente (Islas et al., 1996)

1.8. Prevenção, controle e erradicação

Observou-se que o alto título de anticorpos previne a infecção oral em carneiros pelo VLB (Mammerickx et al., 1980). Baseado neste fato, várias pesquisas foram realizadas para examinar a possibilidade de prevenção da LEB através da vacinação. Em um experimento foi demonstrado que a gp 51 colocada em ISCOM (*immunostimulating complex*) produziu imunidade em alto nível (Merza et al., 1989). Novilhas foram vacinadas com três diferentes tipos de vacinas por duas vezes. Um mês após a segunda vacinação os animais foram inoculados com 10⁶ de linfócitos infectados com o VLB colhidos de uma vaca fortemente infectada. Colheu-se soros e linfócitos sanguíneos de animais vacinados e infectados regularmente durante seis meses. IDAG, ELISA e soroneutralização, foram utilizados para a detecção de anticorpos. Para

determinar o estágio viral das novilhas foram usados os testes de infecção de carneiros e de produção de sincícios. Diferenças foram detectadas em nível de anticorpos entre os grupos vacinados e não vacinados, entretanto, a resposta imunológica em alto nível nos grupos vacinados não pôde dar proteção contra a infecção de vírus (Cherney & Schultz, 1996). Em um outro experimento, cinco carneiros foram vacinados duas vezes com duas diferentes vacinas de proteínas do VLB e, duas semanas após a segunda vacinação, estes animais foram infectados com células mononucleares (5×10^5 , intramuscular) de uma vaca experimentalmente infectada. O título do vírus ascendeu a máxima quantidade em quatro semanas após a infecção. Em dois ovinos os títulos do vírus diminuíram gradualmente e um deles eliminou totalmente o vírus em 28 semanas após a infecção. Segundo os pesquisadores, é possível que utilizando-se vacina de peptídeos, possa se eliminar o VLB de animais portadores (Kabey et al., 1996). Entretanto, geralmente é aceito que a situação da LEB nunca será resolvida através de vacinação (Szent-Iványi & Mészáros, 1985).

Acredita-se que o sucesso na prevenção, controle e erradicação da LEB, esteja na adoção de práticas de manejo que reduzam as possibilidades de transmissão do agente, bem como, na identificação, separação e eliminação sobre a dinâmica da infecção em cada região. Estes são alguns procedimentos que devem ser considerados:

- Não usar instrumentos contaminados (agulhas, pistolas de vacinação, matérias e equipamentos cirúrgicos, etc.) com sangue de animais infectados em animais negativos, estes instrumentos devem ser desinfetados rigorosamente (Oliveira et al., 1994);
- Não usar sangue de animais soropositivos ou suspeitos em premunições ou transfusões;
- Realizar um exame geral para avaliar o estado de todos os rebanhos com relação à LEB e proibir a comercialização de rebanhos infectados para fazendas livres da doença, assim como, não introduzir animais soropositivos no rebanho (Tambasco et al., 1997);

- Para avaliar os rebanhos considera-se a IDAG como prova adequada, mas para avaliar um animal é melhor utilizar o ELISA e a PCR, paralelamente (Fechner et al., 1996);
- O controle dos insetos hematófagos, deve ser implantado na propriedade na medida do possível (Weiblen, 1991);
- Evitar a infecção dos bezerros através de suas mães. A respeito disso, as opiniões são diferentes. Segundo Oliveira et al. (1994), deve ser evitada a ingestão de colostro de vacas positivas pelos recém-nascidos, nas primeiras 48 horas. Segundo Mammerickx et al. (1980), e Szent-Iványi & Mészáros (1985), os bezerros podem receber o colostro nos primeiros três dias, porque o nível de anticorpos nos primeiros dias é muito alto e o vírus será neutralizado pelos anticorpos maternos, evitando deste modo a infecção de bezerros. Mas, o nível de anticorpos no leite diminui rapidamente, por isso, desde os três dias de idade os bezerros devem ser alimentados com leite de vacas não infectadas, ou aquecer o leite à 56° C durante 30 minutos antes de fornecê-lo aos bezerros (Cordeiro et al., 1994);
- Evitar a estreita convivência de animais velhos com jovens;
- Testar sorologicamente (se possível com ELISA) todos os animais do rebanho com idade superior a seis meses (Basílio et al., 1993; Tekes, 1994; Kubis, 1997);
- Em fêmeas gestantes, os testes sorológicos devem ser realizados até um mês antes do parto e um mês pós parto (Hübner et al., 1996)
- Os animais ao serem identificados como positivos devem ser marcados legivelmente;

Destinar os animais positivos para o abate, mas a eliminação dos animais deve ser gradativa nos casos de rebanhos com alta taxa de prevalência, devendo haver a reposição destes por animais negativos. Em rebanhos onde a eliminação é impraticável, a segregação com formação de grupos de animais positivos e negativos mantidos separados representa um método indicado para diminuir a disseminação da infecção (Weiblen, 1991).

1. 9. Objetivos

Demonstrar a evidência do BLV em bovinos localizados nas seis mesorregiões que compõem o Estado do Pará, através do método ELISA indireto, em amostras de sangue e leite, e, determinar a prevalência de anticorpos séricos anti VLB nestas amostras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram estudados 514 bovinos de diferentes raças, várias idades e em ambos os sexos. Os animais foram escolhidos aleatoriamente de rebanhos destinados à produção de carne, leite, e reprodução, localizados em 18 municípios distribuídos nas seis mesorregiões que compõem o Estado do Pará, conforme demonstrado na Tabela 1 e Figura 1.

Tabela 1. Distribuição dos rebanhos estudados de acordo com a mesorregião, microrregião e municípios.

Mesorregião	Microrregião	Município	Número de rebanhos	
Metropolitana de Belém	Castanhal	Castanhal	4	
		Igarapé-Açú	2	
		Santa Isabel do Pará	2	
Marajó	Ararí	Ponta de Pedras	1	
		Santa Cruz do Ararí	1	
		Capanema	2	
Nordeste Paraense	Bragantina	Tomé Açu	1	
Sudeste Paraense	Paragominas	Paragominas	2	
		Dom Eliseu	1	
		Rondon do Pará	2	
Sudoeste Paraense	São Félix do Xingú	Bannach	1	
	Marabá	Marabá	2	
	Redenção	Rio Maria	1	
	Conceição do Araguaia	Conceição do Araguaia	1	
	Itaituba	Itaituba	3	
Baixo Amazonas	Altamira	Altamira	2	
		Monte Alegre	1	
		Santarém	2	
Total	06	13	18	31

ESTADO DO PARÁ

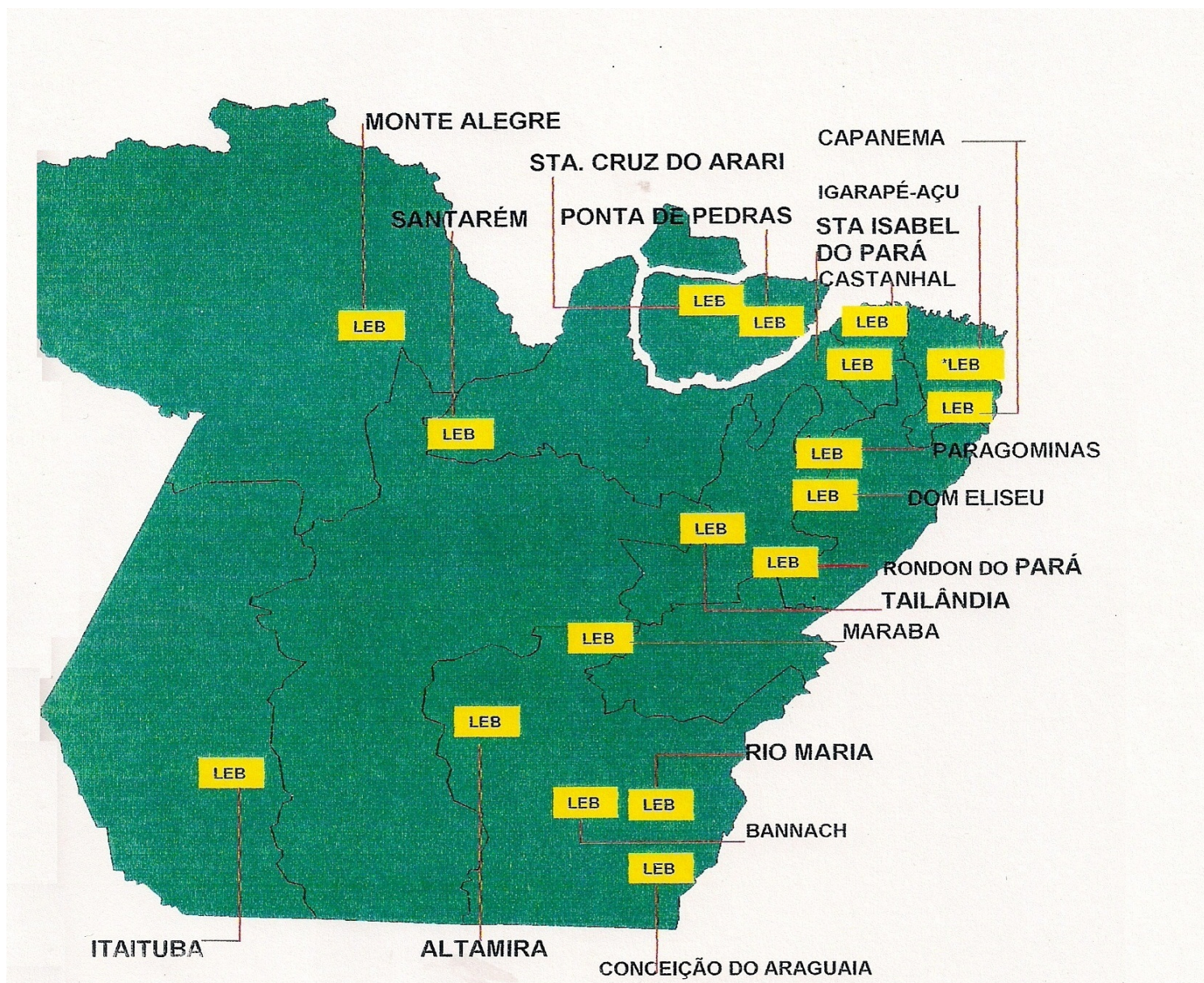


Figura 1. Mapa representativo dos municípios onde foram colhidas as amostras de sangue e leite para demonstração da evidência do VLB através do teste de ELISA Indireto.

*Um dos rebanhos (único) considerado reagente negativo

Os referidos animais eram criados em sistemas semi-intensivo e extensivo, e de conformidade com o manejo tradicional de cada região.

Em sua grande parte os rebanhos pertenciam à propriedades dotadas de boa infra-estrutura.

2.2. Amostras

Foram utilizadas 514 amostras de soro sanguíneo e 118 de leite.

2.2.1. Soro sanguíneo

As amostras de sangue foram coletadas por punção na veia jugular utilizando-se agulhas esterilizadas e descartáveis, de calibre 40 x 12 mm (Nipromedical); e tubos vacutainer (Becton Dickinson) com capacidade para 4ml. Essas amostras de sangue foram mantidas à temperatura ambiente até ocorrer a coagulação e retração do coágulo, para depois de separado o soro na centrifugação (3.000 rpm / 10 minutos), ser transferido para pequenos tubos de poliestireno, para conservação e armazenagem à uma temperatura de -20º C, até o momento da realização do teste de ELISA Indireto.

2.2.2. Leite

As amostras coletadas foram provenientes de 12 rebanhos leiteiros, dentre aqueles animais que foram submetidos à coleta de sangue para pesquisa do VLB, citados acima. Foram utilizados pequenos tubos de vidro com capacidade para 10ml, previamente esterilizados e postos em contato direto com a teta do animal para coleta do leite. Em seguida, as amostras foram levadas ao LIDEA-UFPa e colocadas a 4º C durante 16 a 20 horas. Na sequência, utilizando-se a pipeta de *Pasteur*, retirou-se abaixo da camada de gordura, cuidadosamente, 2ml de soro de leite e colocou-se em tubos para centrifugação (à 2.000 rpm / 20 minutos), depois colheu-se 1 ml do soro de leite da parte média do sobrenadante sem gordura, para ser examinado no ELISA Indireto.

2.3. Prova sorológica

Para o diagnóstico laboratorial foi utilizado o método ELISA Indireto, através do “BLV ELISA *kit*”, preparado pela *Animal Production Unit, FAO/IAEA, Agriculture and Biothechnology Laboratory, Agency's Laboratories Division, Seibersdorf, Austria*, apresentando as seguintes características:

Antígeno: para VLB, gp 51, liofilizado.

Soros Controle: C⁺⁺ anticorpo fortemente positivo, C⁺ anticorpo fracamente positivo e C⁻ anticorpo negativo. Os soros de leite positivo e negativo para controles foram provenientes de bovinos, liofilizados e conservados à 4º C.

Conjugado: feito a partir de anticorpo monoclonal de camundongo anti IgG1 bovina, conjugado com enzima de raiz forte (Horseradish peroxidase, HRPO) liofilizado.

Tampão para sensibilização das placas: 0,05 M carbonato/bicarbonato. pH: 9,6.

Tampão para lavagem: tampão de fosfato salino (PBS) + 0,05% (v/v) *Tween* 20, pH: 7,4

Substrato tampão: citrato de fosfatoda SIGMA P – 4809.

Substrato: hidrogênio peroxidase (H₂O₂).

Solução para parar a reação (“*Stopper*”): 2 M ácido sulfúrico (H₂SO₄)

Cromógeno: TMB (SIGMA T – 3405) 0,5 M.

Reconstituição do diluente: Água deionizada, destilada e autoclavada, com adição de um volume igual de glicerol (50% v/v)

Tampão para diluição : 0,01 M PBS + 0,05 % *Tween* 20.

Microplaca: *Nunc Microwell* (Cat. Nº 4-75094)

Soro bovino para testar : de sangue e leite

Método

1. Sensibilização de microplacas: colocação de 100µl nos 96 orifícios das microplacas de antígeno diluído em tampão carbonato/bicarbonato.

“Overnight” (ON) em 4º C, acondicionado em saco plástico.

2. Lavar três vezes com PBS

3. Soros controle e soro teste com diluição final de 1:26, localizados em placa segundo uma ficha (Figura 1). Agitar, incubar por 1h à 37º C, e acondicionar em saco plástico. Na presente pesquisa a prova sofreu modificação e as amostras tanto de sangue quanto de leite foram diluídas a 1:26.

4. Lavar três vezes com PBS;

5. Colocar 100µl do conjugado diluído, acondicionar e incubar por 1h à 37º C

6. Lavar três vezes com PBS

7. Acrescentar 100µl do substrato / cromógeno (2,2 mM TMB e 3,5 mM H₂O₂)

8. *Stop*: 50 µl de H₂SO₄ 2M

9. Leitura: D. O. 450 nm em espectrofotômetro.

Figura 2. Ficha de identificação dos soros a serem testados e controles.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cc	Cc	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
B	Cc	Cc	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
C	C ⁺⁺	C ⁺⁺	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
D	C ⁺⁺	C ⁺⁺	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
E	C ⁺	C ⁺	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
F	C ⁺	C ⁺	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
G	C ⁻	C ⁻	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
H	C ⁻	C ⁻	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40

Cc: controle do conjugado

C⁺⁺: soro controle fortemente positivo

C⁺: soro controle fracamente positivo

C⁻: soro controle negativo

3. RESULTADOS

Para examinar as 514 amostras de soro sanguíneo foram utilizados 15 lâminas do *kit* ELISA. Em todas as lâminas, foram examinadas por quatro vezes, o soro negativo, fraca e fortemente positivos, assegurados com o *kit* ELISA, de modo que cada um destes soros conhecidos por “*standard*” foram inspecionados 60 vezes. Os resultados destes exames estão mostrados no gráfico 1. O valor limite ou discriminantes (cut-off point) foi determinado, posteriormente, após a conclusão dos exames. Está evidente que o valor PP nunca ultrapassou o valor 18 no caso de soro negativo, e os valores PP do soro fracamente positivo, sempre ultrapassaram o valor 58. A frequência de valores PP está demonstrada no Gráfico 2. Os resultados mostram que o número de amostras com valores PP entre 30 e 60 (“títulos suspeitos”) estavam relativamente em nível baixo (50/ 514; 9,7%).

Gráfico 1. Os valores DO nm dos soros negativo, fraca e fortemente positivos assegurados com *kit* ELISA (*standards*).

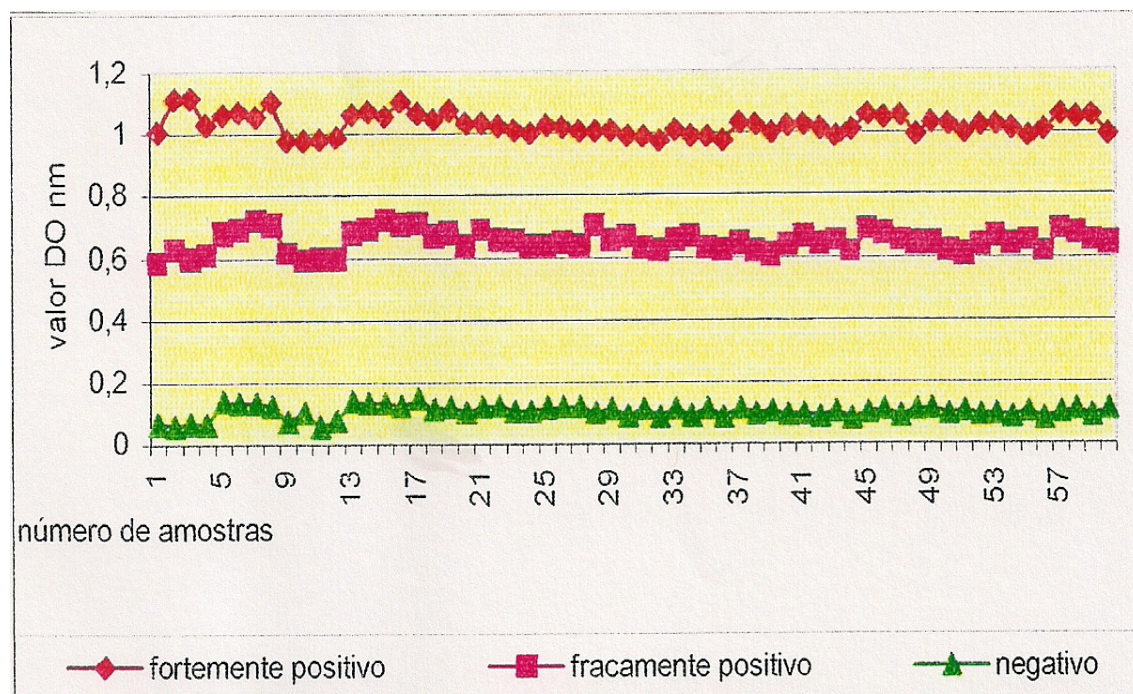
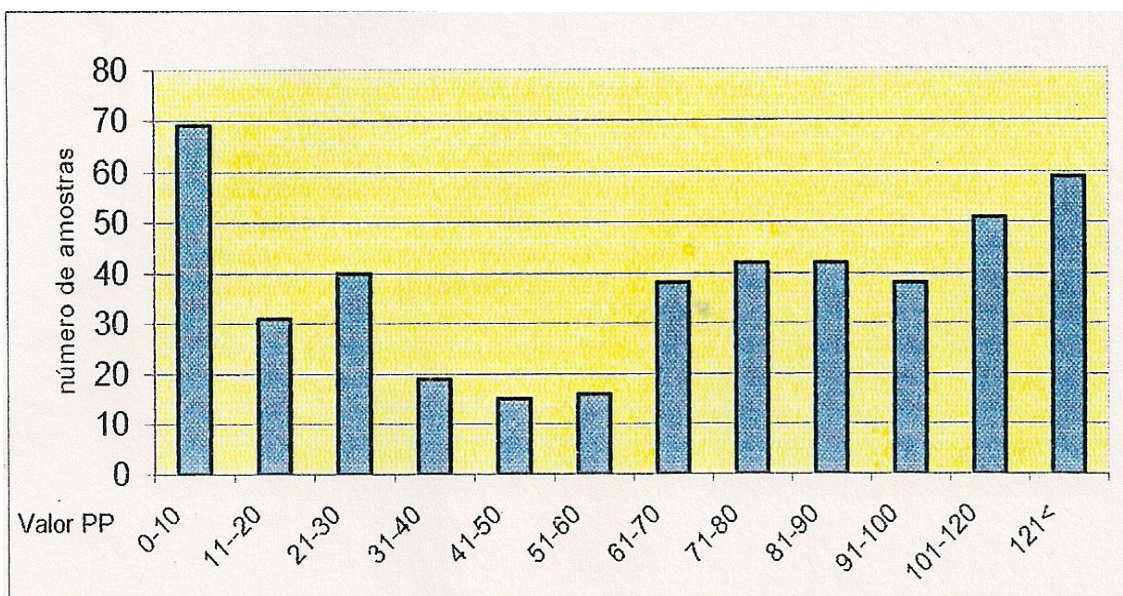


Gráfico 2. Frequência de valores PP dos soros examinados.



De 514 amostras de soro oriundas de 31 rebanhos distribuídos em 18 municípios do estado do Pará, resultaram positivas 364 amostras, o que representa 70,81 % de prevalência. Com exceção de apenas um rebanho, todos os outros encontravam-se infectados. Em sete rebanhos, a produção da infecção foi de 100 % e em apenas dois rebanhos a infecção encontrava-se em nível considerado baixo (Reb. 13 em 5 % e Reb. 5 em 6,25 %). Os resultados obtidos encontram-se sumariados na tabela 2.

Tabela 2- Resultados sumariados do teste de ELISA Indireto em amostras de soros sanguíneos de bovinos para a detecção do VLB.

Municípios	Rebanhos	Núm. Amostras	Positivas	
			Nº	%
Altamira	1	15	8	53,3
	2	15	10	66,6
Bannach	3	18	17	94,4
Capanema	4	16	13	81,2
	5	16	1	6,2
Castanhal	6*	7	7	100
	7*	10	9	90
	8	20	4	20
	9*	13	13	100
Conceição do Araguaia	10	15	15	100
Dom Eliseu	11	15	14	93,3
Igarapé - Açu	12*	37	--	0
	13*	20	1	5
Itaituba	14*	7	7	100
	15*	10	9	90
	16*	11	9	81,8
Marabá	17	24	20	83,3
	18	15	15	100
Monte Alegre	19	16	16	100
Paragominas	20	25	17	68
	21	25	19	76
Ponta de Pedras	22	13	12	92,3
Rio Maria	23	16	15	93,7
Rondon do Pará	24	15	7	46,6
	25	15	11	73,3
Santa Cruz do Arari	26	15	15	100
Santarém	29	16	15	93,7
	30	16	16	100
Santa Isabel do Pará	27	22	20	90,9
	28	16	13	81,2
Tailândia	31	20	16	80
Total	31	514	364	70,81

*Rebanho composto de animais importados da Alemanha e Dinamarca

A maioria das amostras originou-se de vacas na faixa etária entre 3 a 12 anos e apenas 37 soros de bovinos machos foram examinados. Praticamente, não se encontrou diferença marcante na porcentagem de sororeagentes entre os soros provenientes de vacas e touros (fêmeas: 343/477; 72,3 % e machos: 21/37 56,7 %). Com relação à idade não foi possível extrair conclusões concretas e definitivas devido a quantidade de amostras de soros de animais com menos de três anos de idade ter sido pequena. Muito embora é importante salientar que num rebanho altamente infectado (Reb. 22, com 12/13, 93,2 %), de cinco bezerros com uma ano de idade, quatro já eram sororeagentes. Em outro rebanho (Reb. 8), relativamente infectado em nível considerado baixo (4/20; 20 %), de 11 animais com dois anos de idade, três deram positivos ao teste, enquanto que, de novo outros animais entre três a cinco anos de idade, apenas um foi positivo

Com o ELISA Indireto foram examinados também 118 amostras de leite oriundas de 12 rebanhos leiteiros. Tais amostras foram colhidas entre os meses de janeiro e fevereiro de 1999, provenientes de vacas cujos soros sanguíneos foram também examinados nesta pesquisa para determinação de anticorpos séricos anti-VLB. Em 10 rebanhos as amostras de sangue foram coletadas entre os anos de 1997 e 1998, e, em dois rebanhos, sangue e leite foram coletados simultaneamente. Estes resultados estão sumariados na Tabela 3. Apenas o rebanho Reb. 12, dentre os demais, encontrou-se livre da infecção, e vale a pena mencionar que os valores PP das amostras deste grupo de animais, tanto para o soro quanto para o leite, ficaram próximo de zero. No rebanho 13, das 20 amostras de soro colhidas em 1997 apenas uma resultou positiva e de oito amostras de leite colhidas em 1999, cinco (62,5 %) resultaram em positivas. Nos outros rebanhos todas as amostras de leite resultaram em positivas, como também, a grande maioria das amostras de sangue correspondente aos mesmos animais.

Tabela 3. Resultados comparativos do ELISA Indireto utilizando-se amostras de soro sanguíneo e leite das mesmas vacas, em 12 rebanhos de 10 municípios.

Município/Rebanho Nº	Época da colheita de sangue	Número de amostras	Positivos			
			Soro sanguíneo		Leite *	
			Quantidade	%	Quantidade	%
Altamira / 2	1998	10	10	100	10	100
Capanema / 4	1999	10	9	90	10	100
Castanhal / 9	1997	10	10	100	10	100
Igarapé Açu / 12	1997	10	0	0	0	0
Igarapé Açu / 13	1997	8	0	0	5	62,5
Itaituba / 16	1997	10	8	80	10	100
Marabá / 17	1997	10	8	80	10	100
Monte Alegre / 19	1997	10	10	100	10	100
Paragominas / 20	1997	10	10	100	10	100
Santa Isabel do Pará / 27	1997	10	7	70	10	100
Santa Isabel do Pará / 28	1997	10	9	90	10	100
Tailândia / 31	1997	10	9	90	10	100
Total: 10/12	-	118	90	75,42	105	88,98

*Todas as amostras de leite foram coletadas em janeiro e fevereiro de 1999.

A amostragem de soro e leite foi colhida de forma simultânea em apenas dois rebanhos (Reb. 4 e Reb 19). Determinou-se o título sérico destas 20 amostras de leite oriundas destas duas fazendas e estes resultados comparativos estão indicados na tabela 4. Os dados demonstram que em seis animais (Reb. 4, animais 6, 7 e 8 Reb. 19, animais 6, 7 e 10) os títulos de soros de sangue e leite foram os mesmos e em 14 animais os títulos de amostras de leite foram mais altos que os títulos de soros.

Tabela 4. Títulos séricos das amostras de soro e leite colhidas de vacas simultaneamente (Janeiro de 1999).

Município	Número sérico	Título do soro	Título do leite
Capanema	1	<50	50
	2	50	200
	3	100	400
	4	50	400
	5	50	400
	6	400	400
	7	50	50
	8	100	100
	9	50	200
	10	200	400
Monte Alegre	1	200	400
	2	200	400
	3	100	200
	4	100	400
	5	200	400
	6	200	200
	7	200	200
	8	200	400
	9	200	400
	10	200	200

4. DISCUSSÃO

Para se estudar adequadamente os dados sorológicos, torna-se importante entender a conexão entre infecção e a técnica sorológica usada. Os testes sorológicos estão baseados no fato que após a infecção com um microorganismo (vírus, bactéria, protozoa, fungo), o hospedeiro emite uma resposta imunológica que, entre outros processos como a reação celular, se inclui também a produção de anticorpos. Estes anticorpos podem ser medidos através de provas sorológicas, utilizando-se mais frequentemente para este fim os soros sanguíneos, ou outras matérias como leite e secreções. O resultado de infecção pode ser muito diferente, dependendo de várias circunstâncias, como: tipo, quantidade e virulência do agente; assim como também a resistência do organismo infectado (resistência natural, imunidade específica e/ou natural, estresse, etc.). Em enfermidades agudas o resultado da infecção geralmente é a morte ou o restabelecimento total do organismo infectado. No caso de doenças crônicas o resultado de uma infecção pode ser muito diferente. Na LEB, o mecanismo de processa da seguinte maneira: após a infecção pelo VLB, o vírus se estabelece no organismo bovino para toda a sua vida e os bovinos infectados produzem anticorpos contra o vírus que aparecem no soro sanguíneo em quantidade demonstrável sorologicamente em três semanas, apresentando diferenças na sensibilidade entre as provas sorológicas (Szent-Iványi & Mészáros, 1985; Johnson & Kaneene, 1992; Tekes, 1994; Hübner et al., 1996).

Para avaliar os resultados recebidos em provas sorológicas, comumente são usadas as palavras “positivo”, “suspeito” e “negativo” para marcar os animais reativos, duvidosos e não reativos, respectivamente. Este modo é muito conveniente na prática, mas tal afirmação não tem sentido científico, pois um animal (ou uma amostra) não pode ser “negativo”, ou seja, menor que zero. Então, uma reação pode ser forte ou fraca, e a intensidade da reação é expressada como o “título” da amostra examinada (Burgess, 1994). Isso é válido especialmente para os testes de ELISA Indiretos que podem ser confirmados em várias maneiras para alcançar diferentes níveis de sensibilidade e especificidade (Burgess, 1994; Nielsen et al., 1995), ou seja, pode ser aumentada a sensibilidade da prova, entretanto, neste caso, é

inevitável que algumas amostras oriundas de animais não infectados recebam resultado “positivo”. Por outro lado, se queremos aumentar a especificidade da prova, pode ocorrer que algumas amostras de animais infectados escapem de ser avaliadas como “positivos” por causa do nível baixo de anticorpos.

Por está razão, a determinação do valor PP (valor discriminante, ou valor limiar, *cut-off point*) de soropositivo/soronegativo para ELISA é muito importante. Aumentando este valor, a especificidade também vai aumentar, porém, a sensibilidade irá diminuir. Para alcançar o valor mínimo ideal são necessários exames prévios que abrangem a investigação de soros colhidos em regiões de animais certamente não infectados, em rebanhos conhecidamente infectados e também o exame de soros conhecidos (“*stardad*”) como negativos, fraca e fortemente positivos. Infelizmente, no Estado do Pará nunca foram realizados exames para avaliar se os rebanhos estão infectados ou livres da infecção. Por isso, neste trabalho, foi possível determinar o valor discriminante apenas por exame de soros negativo, fraca e fortemente positivos assegurados pelo *kit* ELISA. O gráfico 1 mostra que os valores de soros negativos nunca ultrapassarem o valor 18, e o valor médio de 60 medições foi igual a 12. Segundo a FAO/IEEA, o valor discriminante tem de ser determinado pela média de absorbância dos soros negativos acrescida de dois e meio desvios-padrões. Por isso foi escolhido o valor 30 como descriminante. Certamente que, o soro fracamente positivo sempre deu valores entre 60 e 75 (Gráfico 1), caracterizando um intervalo em torno de 30 (entre 30 e 60) onde não encontrou-se nenhum caso, examinando os soros assegurados junto com o *kit* ELISA. Em casos semelhantes, sugere-se examinar as amostras em outra prova (no caso da LEB usar a IDAG). Por outro lado, já foi demonstrado em várias pesquisas (Manz et al., 1981; Strab & Bruchhof, 1994; Tekes, 1994) que os soros fracamente positivos no ELISA geralmente são negativos na IDAG, mas isso não significa que o animal não esteja infectado, logo, neste caso, aconselha-se coletar novamente outras amostras de sangue do animal suspeito para nova análise.

O diagnóstico direto da LEB em laboratório, se realiza com a demonstração do vírus em linfócitos tumorais, ou presente no sangue periférico, através de exame em microscopia eletrônica, como também, por

demonstração do pró vírus através da PCR ou do isolamento do vírus. Todos estes métodos são muitos valiosos, entretanto, bastante dificultosos, necessitando de equipamentos especiais e podem ser realizados somente em laboratório especializados. É certo que, o exame de uma amostra submetida à estas técnicas, além de ser de execução difícil, é bastante caro e, tais técnicas não estão disponíveis para exames em massa. Por outro lado, estas provas não são tão necessárias para avaliar uma situação epidemiológica.

Os levantamentos epidemiológicos sobre a prevalência de anticorpos séricos anti-VLB no Brasil, foram realizados através da IDAG (sumariados por Birgel Juniores et al., 1995). Em todos os 11 Estados brasileiros pesquisados, encontrou-se a infecção pelo VLB. A prevalência de anticorpos séricos variou entre amplos limites (de 4,1 % a 70,9 %). Em um exame realizado no Estado do Pará (Molnár et al., 1997) determinou-se a prevalência da infecção pelo VLB em 49,8 % no ELISA e 26 % na IDAG. Nesta atual pesquisa a percentagem da infecção foi de 70,81 %, logo, o nível de soropositividade foi o mais alto verificado no País. Dados semelhantes foram constatados somente em dois rebanhos em Minas Gerais: 70,1 % (141/201; Leite et al., 1980) e 70,9 % (136/230; Modena, 1981). Com relação ao percentual de soropositividade dos rebanhos, a situação foi muito semelhante: 96,77 % (30/31) foi positivo, mas resultados parecidos foram encontrados (Birgel Junior et al., 1995) em vários outros Estados (Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo).

As diferenças da prevalência encontradas nos diversos Estados brasileiros podem ser explicadas pelos diferentes tipos de manejo e tecnologia empregados. Geralmente, é aceito que se encontrem índices de infecção mais altos nos rebanhos com tecnologia mais sofisticada (vide introdução) provenientes de transferência do VLB para animais sensíveis mesmo por veiculação de uma ínfima quantidade de sangue (0,0005 ml) através de fômites (agulhas hipodérmicas, materiais cirúrgicos, aparelhos de descorna, brincos, tatuadores) e insetos hematófagos. Considerando que o VLB possui tropismo para as células epiteliais da glândula mamária (Buehring et al., 1994), bem como para monócitos e granulócitos (Schwarz et al., 1994) ficou compreensível que os bezerros podem infectar-se através do leite, como também os bovinos

de qualquer idade, através da palpação retal utilizando-se neste caso luvas contaminadas (Hopkins et al. 1997).

A prática de premunição contra hemoparasitas (***Anaplasma sp*** e ***Babesia sp***) têm se revelado a mais importante forma de disseminação da LEB, fato já demonstrado no início da década de 80 (Romero & Rowe, 1981; Birgel, 1982). Posteriormente, isto foi verificado em vários estudos. Flores et al. (1992), encontraram 21 (48,9 %) bovinos sororeagentes em 47 animais destinados à doação de sangue para premunição. Em um outro estudo, 94,4 % (17/18) dos bovinos de leite destinados a doação de sangue em uma premunição em Londrina, Paraná, manifestaram-se positivos (Beuttemüller et al., 1996).

Nossos resultados estão totalmente de conformidade com aqueles citados anteriormente. Uma pequena parte dos rebanhos (25,8 %) examinados nesta pesquisa, tiveram origem da importação de bovinos da Alemanha e Dinamarca, promovida por organismos oficiais do Estado do Pará conjuntamente com o ZVK, no final de 1994 (Reb. 6, 7, 9, 12, 13, 14, 15 e 16). Na tabela 2, verifica-se que estes animais encontram-se em grande parte infectados. Teoricamente, seria possível imaginar que os mesmos (ou grande número deles) foram infectados durante a sua chegada em nosso País, contudo, isso pode ser inimaginável, pois os animais do rebanho 6 foram importadas da Dinamarca e este País, pelo que se sabe através da literatura consultada, foi o primeiro que planejou a erradicação da LEB, no final da década de 50, porém só obteve êxito na década de 80.

No caso do rebanho 12, das 37 amostras de soro examinadas em 1997, todas reagiram negativamente (único rebanho livre de infecção) e as 10 amostras de leite coletadas em janeiro de 1999 também foram negativas. Quanto ao rebanho 13, a situação mostrou-se diferente: das 20 amostras de soro coletadas em 1997, apenas uma reagiu positivo e este foi o único rebanho com baixa (5 %) prevalência de infecção. Estes animais foram importados no final de 1994, e afirmar que eles chegaram no Brasil já infectados seria uma grande precipitação, e poderíamos presumir também que a infecção pudesse ter ocorrido aqui durante estes três anos de permanência em nosso Estado.

Todavia, tornar-se-ia interessante investigar o fato, pois de outo amostrar de leite colhidas em janeiro de 1999, cinco amostras apresentaram-se positivas. Sumariando os resultados recebidos destes dois rebanhos, imaginamos que, os proprietários desses animais obtiveram êxito com a premunição, à época da importação, e que esta deve ter sido realizada com sangue proveniente de animal não infectado, enquanto que, os bovinos das outras propriedades citadas, devem ter sido premunizados com sangue de animais já infectados pelo VLB.

Convém ressaltar que, a aplicação do ELISA no leite valorizou consideravelmente este trabalho. Acredita-se que os resultados obtidos por este método nos exames das amostras de leite, revestiram-se de grande importância para esta pesquisa, por ser a mesma pioneira no País. No Brasil, ainda não foram encontrados na literatura técnica resultados semelhantes e nem trabalhos técnicos enfatizando a realização de exames para o diagnóstico da infecção pelo VLB utilizando-se o ELISA no leite. Sendo a LEB uma enfermidade de maior importância nos rebanhos leiteiros, acredita-se que esta técnica ao ser utilizada em amostras de leite torna-se perfeitamente adequada e de grande importância para uso na prática por ser bastante sensível e específica. Notadamente, a colheita de leite, em qualquer situação, é muito mais fácil de executar que a de sangue, e pode ser realizada durante a ordenha, daí, por ser a referida prova bastante sensível, seria possível aplicá-la em apenas uma pequena amostra de leite de várias vacas proveniente de um mesmo latão, ou seja, da produção diária de um só lote de vacas.

Neste estudo, examinando-se 118 amostras de soros sanguíneo e leite de 12 rebanhos, não ocorreu divergências nos resultados entre ambos. O soro sanguíneo considerado positivo também apresentou o mesmo resultado para o leite (ambos do mesmo animal), mesmo levando em conta que amostras de leite de 98 vacas foram coletadas entre um à dois anos mais tarde que as amostras de sangue. O mesmo fato aconteceu com 20 amostras (de sangue e leite) que foram coletadas simultaneamente em duas propriedades (Reb. 4, e 19) onde 19 amostras de soros sanguíneos deram positivas, bem como, todas 20 amostras de leite (o valor discriminante da vigésima amostra de soro sanguíneo mostrou-se muito perto de ser positivo; este dado não está

demonstrado em tabelas). Por seis vezes os títulos de ambas as amostras foram exatamente os mesmos; e, em 14 casos, observou-se que os títulos de leite foram mais altos que os títulos de soros sanguíneos (Tabela 4).

As informações técnicas que acompanham o *kit* ELISA (SVANOVIR TM, BLV *Bovine Leukaemia Virus EIA, Test Kit for the detection of gp 51 specific antibodies in serum of milk Bovine Leukaemia Virus* (BLV – ab); EIA – 1:26 e no exame de leite sem diluição. No laboratório onde foram realizados os exames para esta pesquisa, modificou-se este processo, de maneira que, pudessem ser examinadas tanto as amostras de soro sanguíneo quanto as de leite na mesma diluição, ou seja, de 1:26, e apesar das dificuldades apresentadas para o processamento das amostras de leite com esta alteração houve em compensação, um grande aumento na sensibilidade da prova sem que houvesse modificação em sua especificidade, já que os soros sanguíneos reagiram também positivamente.

Neste estudo foram examinadas amostras de leite individualmente, pois a quantidade de amostras não era tão grande, daí não ser possível declarar unanimemente que esta prova modificada, descrita anteriormente, seja adequada para examinar as amostras de leite colhidas em lotes de diversas vacas, porém os resultados foram tão patentes que certamente a técnica modificada estará apta para este fim. Isto poderia ter grande importância nas regiões onde o número de rebanhos leiteiros é acentuado. Daí, se dividirmos um grande rebanho em pequenos lotes (obedecendo os critérios de seleção por idade, raça, produção, etc.) poderemos realizar esta prova sorológica, através de uma pequena amostra do leite, coletada em latões durante a ordenha, correspondentes à produção dos referidos lotes, identificando assim, se existem animais contaminados com o vírus ou não.

A colheita de sangue e leite realizou-se em diversas etapas. No caso do rebanho 13, de 20 amostras de soro sanguíneo colhidas em 1997, somente uma delas reagiu positivo e de oito amostras de leite colhidas em 1999, cinco reagiram positivas.

Durante a análise das amostras de leite e soro sanguíneo através do *kit* ELISA, observou-se no soro do leite um nível de anticorpos séricos anti VLB bem mais alto que o encontrado no soro sanguíneo. Este fato nos leva a questionar se a quantidade de anticorpos anti VLB contidas no leite diminuiria consideravelmente com o passar dos dias após o parto. Obviamente, que este questionamento só apresentará resposta após uma série de exames. Detectar se o leite contém anticorpos suficientes para neutralizar o vírus seria também outra grande descoberta que iria trazer grande contribuição às pesquisas em torno da LEB.

5. CONCLUSÃO

- O ELISA Indireto comprovou ser uma prova bastante sensível quando utilizado no diagnóstico da LEB, tanto em rebanhos, quanto em animais isolados, infectados ou não pelo VLB;
- A variação da prova para examinar o leite, provou ser viável e de grande utilidade;
- Com a modificação da prova para exame do leite, aumenta-se a sensibilidade da mesma, consideravelmente;
- A infecção pelo VLB está muito difundida no estado do Pará;
- Quanto a susceptibilidade à LEB, certamente que não existem diferenças consideráveis entre as raças;
- Apesar do alto índice de infecção pelo VLB encontrado nos rebanhos aqui estudados, não fora observada em nenhum momento, a forma tumoral da LEB nos mesmo;
- No caso de importação de animais, seria de suma importância que fossem coletadas e conservadas em congelação, amostras de soros desses animais, criando assim uma possibilidade das mesmas serem investigadas posteriormente, com um propósito de no futuro, seja por necessidade de estudo ou exigências de ordem sanitária (para elucidação de dúvidas no diagnóstico de quaisquer doenças de caráter infecto contagioso), vierem a ser utilizadas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRESTI, A., PONTI, W., ROCCHI, M., MENEVERI, R., MAROZZI, A., CAVALLERI, D., PERI, E., PLO, G., GINELLE, E. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leucemia virus infection in calves at birth. **Am. J. Vet. Res.** 54, 1993.
- ALENCAR FILHO, R., A., JULY, J., R., VIANNA, W. O., RODRIGUES, F. M. Estudo ultra estrutural de linfócitos de bovinos infectados pelo vírus da leucose. **O biol.** São Paulo. 48: 135-7 1982.
- ANGELO, N. J. O., BIRGEL, E. H., HAGIWARA, M. K., BENESI, F. I., D'ANGELINO, J. L., DAHMER, H. W. P. F., CARVALHO, R. P. S. Isolamento do vírus da leucose bovina de animais com leucocitose persistente. **Anais 13º Congr. Bras. Microbiologia.** São Paulo. p. 284.1985.
- BALLAGI-PORDÁNY, A., KLINTEVAL, K., MERZA, M., KLINGEBORN, B. BELÁK, S. Direct Detection of Bovine Leukemia Virus Infection: Practical Applicability of Double Polymerase Chain Reaction. **J. Vet. Med. B.** 39: 69-77. 1992
- BASILIO, J. I. M., TAVERA, F. J. Y., ALUJA, A. S., ESCAMILDA, R. M. G. Estudio comparativo entre las pruebas de ELISA e inmunodifusión em el diagnostico de la Leucosis Enzootica Bovina. **Vet. Mexico.** 24. 21-25 1993.
- BAUMGARTENER, L. E. & OLSON, C. Host range of bovine leukosis virus: preliminar report. **Cur. Top. Vet. Med. Anim. Res.** 15, 338-340. 1982.
- BAUSE, I. & SCHMITD, F. W. Zur Persistenz precipitierender Antikörpern im Blutseren leucoseinfizierter Rinder unter besonderer Berücksichtigung des Kalbezeitpunktes. **Tierärztl. Umschau,** 35, 642-649. 1980.

- BAUSE, I., MAAS-INDERWIESEN, F., SCHMIDT, E. W. Results of an epidemiological survey of enzootic bovine leucosis in the northern part of Lower Saxoni; and a preliminary communication of an examination into relationship between BLV-antibody development and calving. **Ann. Res. Vet.**, 9, 765-769. 1979.
- BEUTTEMMÜLLER, E. A.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; MÉDICE, K. C. Leucose Enzoótica Bovina: Frequência de soro-reagentes em grupo de animais com e sem sintomas clínicos. **XXIV Congr. Bras. Med. Vet.** Goiânia, 02 a 07 de junho, Nº 82. 1996.
- BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnósticos. In: Birgel, E. H. & Benesi, F. J. (ed). **Patologia Clínica Veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária., 249-60. 1982.
- BIRGEL, E. H. Prevalência da leucose enzoótica dos bovinos em zebuínos da raça nelore, criados no Estado de São Paulo. **Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Bahia**. Salvador. 17. 1994.
- BIRGEL, E. H., BENESI, F. J., D'ANGELINO, J. L., AYRES, M. C. C., COSTA, J. N., BARROS FILHO, J. R., BIRGEL JUNIOR. E.H. Prevalência da Leucose Enzoótica dos Bovinos em raça nelore, criados no Estado de São Paulo. **Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Bahia**. Salvador. p:55-66. 1994
- BIRGEL JUNIOR, E. H. O hemograma de bovino (*Bos taurus*, Linnaeus 1758) da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. Influência de fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose bovina. **Fac. Med. Vet. Zootec. USP**. São Paulo. 172 p. 1991.
- BIRGEL JUNIOR, E. H., D'ANGELINO, J. L., BENESI, F. J., BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo Vírus da Leucose dos Bovinos, em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.** 15. 93-99 1995.

- BLANKENSTEIN, P., FECHNER, H., LOOMAN, A. C., BEIER, D., ARQUARDT, O., EBNER, D. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of BLV provirus a practical complement for BLV diagnosis ?. **Berl. Münch. Tierärztl Wochenschr.** 111: 180-6. 1998.
- BRANDON, R. B., & NAIF, H. Early detection of bovine leucosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. **Res. Vet. Sci.** 50. 89-94. 1991
- BRENNER, J., MOSS, S., MOALEM, U. A comparative study of the ELISA and AGID techniques for detection of bovine leucosis virus antibodies in bovine serum and milk. **Isr. J. vet. Med.** 49:165-67. 1994.
- BUEHRING G. C., KRAMME, C. M., SCHULTZ, R. D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. **Lab. Invest.**, 71, 359-65. 1994.
- BURGESS, G. W. Serological monitoring of infectious diseases. In IAEA – TEC DOC – 736. Vienna, 1994.
- BURNY, A., BRUCK C., CHANTRENNE, H., CLEUTER, Y., DEKEGEL, D., GHYSDAEL, J., KELTMANN, R., LECLERCQ, M., LENNE, J., MAMMERICKX, M. OIRTETEKKE, D. In: Gklein (Ed.), Bovine leukemia virus, molecular biology and epidemiology. **Raven press**, New York, 88. 231-89. 1980.
- BURNY, A., BRUCK, C., CLEUTER, Y., CONEZ, D., DESCHAMPS, J., GREGORY, D. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leucosis. **Ondestepoort. J. Vet. Res.**, 52, 133-55. 1985.
- BURNY, A., CLEUTER, Y., KELTMANN, R., MAMMERICKX, M., MARBAIX, G., PORTETELLE, D., VAN DEN BROCKE, A., WILLEMS, L., THOMAS, R. Bovine leukaemia: facts and hypothesis derived from the study of an infectious cancer. **Vet. Microbiol.** 17. 197-218. 1988.

- BURRIDGE, M. J., THURMOND, M. C., MILLER, J. M., SCHMERR, M. J., VAN DER MAATEN, M. J., Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. **Can. J. Com. Med.**, 46, 270-71. 1982.
- CHERNEY, T. M., & SCHULTZ, R. D. Viral status and antibody response in cattle inoculated with recombinant bovine leukemia virus-vaccinia virus vaccines after challenge exposure with bovine leukemia virus infected lymphocytes. **Am. J. Vet. Res.**, 57. 812-18. 1996.
- CORDEIRO, J. L. F., DESCHAMPS, F. C., MARTINS, E., MARTINS, V. M. V. Identificação e controle de Leucose Enzoótica Bovina (LEB) em um rebanho leiteiro. **Pesq. Agropec. Bras.** 29. 1287-92. 1994.
- CORRÊA, W. M. & CORRÊA, C. N. M. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. 2ª ed. Ed. Médici. Rio de Janeiro. 1992.
- CRUZ, M. M. Leucose bovina. **Vet. Mexico.** 19. 151-59. 1988.
- DPELCHIN, A., LETESSON, J. J., LOSTRIE-TRUSSART, N., MAMMERICKX, M., PORTETELLE, D., BURNY, A. Bovine leukemia virus (BLV) infected B-cells express a marker similar to the CD 5 T-cell marker. **Immunol. Lett.** 20. 69-76. 1989.
- DOMKUS, J. W., MOLLOY, J. B., DIMMOCK C. K., EAVES, L. E. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. **Vet. Microbiol.** 39. 313-21. 1994.
- EAVES, J. W., MOLLOY, J. B., DIMMOCK, C. L., EAVES, L. E. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. **Vet. Microbiol.** 39. 313-21. 1994.
- EMANUELSSON, U., SCHERLING, K., PETTERSON, H. Relationships between herd bovine leukaemia virus infection status and reproduction, disease incidence and productivity in Swedish dairy herds. **Prev. Med. Vet.**, 12. 121-31. 1992.

- ERENO, D. Leucose Bovine. **Rev. Balde Branco**. 24. 19-21. 1988.
- FECHNER, H., BLANKENSTEIN, P., LOOMAN, A.C., ELWERT, J., GEUE, L., ALBRECHT, C., KURG, A., BEIER, D., MARQUARDT, O., EBNER, D. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. **Virology**. 237:261-9 1997.
- FECHNER, H., KURG, A., GUEU, L., BLANKSTEIN, P., MEWES, G., EBNER, D., BEIER, D. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection of naturally infection cattle. **J. Vet. Med. B**. 43. 621-30. 1996.
- FERREIRA, M. I. C., ROMERO, C.H., ROWE, C. A. Estudo comparativo entre as provas de imunodifusão em placa e em lâmina na detecção de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina. **Pesq. Vet. Bras**, 2: 49-53. 1982.
- FERREIRA, M. I. C., ROMERO, C. H., ROWE, C. Contagem linfocitária e anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos do Rio de Janeiro. **Pesq. Vet. Bras.**, 2: 99-104. 1982.
- FERRER, J. F., PIPER, C.E., ABT, D. A., MARSHAK, P. R., BHATT, D. Natural mode of transmission of the bovine-type leukemia virus. **Bibl. Haematol**. 43:235-7. 1976.
- FLORES, E. F., WEIBLN, R., OLIVEIRA, C., KREUTZ, L. C. Anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) em soros de bovinos provenientes da Replública Oriental do Urugai. **A hora Vet.**, 68: 5-8. 1992.
- FREI, W. **Patologia Geral ara Veterinária**. Fundação Calouste Gulbenician. 2ª ed., Lisboa. 1971.
- GALIERO, G. & FRAULO, P. Sero-epidemiologic survey on the antibodies against bovine leukaemia vírus (BLV) in cattle and buffalo herds in Solerno province. **Bubalus bubalis II-Italy**. 1998.

- GARCIA, M., BASTOS, P. A., BARROS FILHO, I. R., LIBERA, A. M. P. D., COUTINHO, S. D. A., RAMOS, M. C. C., LOURENÇO, A., SILVA, M. M. Efeito da infecção pelo vírus da leucose na ocorrência de mastite em bovinos. **A Hora Vet.** 88: 41-3. 1995.
- GARCIA, M., D'ANGELINO, J. L., BENESI, F. J., BIRGEL, E. H. & MARÇAL, W. S. A avaliação do leucograma de fêmeas da raça holandesa naturalmente infectadas pelo vírus da leucose bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, 11:61-4. 1991.
- GHEZZI, P. C., DOLCINI, G. L., GUTIÉRREZ, E. N. [Bovine leukemia virus (BLV): prevalence in the Cuenca Lechara Mar y Sierras from 1994 to 1995]. **Rev. Argent. Microbiol.** 29:3. 137-46. 1997.
- GOMES, M. J. P & FALLAVENA, L. C. B. Leucose Enzoótica em reprodutor bovino e a infecção em centrais de inseminação artificial no Rio Grande do Sul. Bol. **Inst. Pesq. Vet. "Desidério Finamor"**. 1. 29-35. 1988.
- GRAVES, D. C., DIGLIO, C. A., FERRER, J. F. A reverse transcriptase assay for detection of the bovine leukemia virus. **Am. J. Rev.** 38. 1739-44. 1977.
- HEINONEN, M., & ASSEFA, W. Some observations on bovine leucosis virus antibodies in Ethiopia. **Vet. Bull.** 66. 5305. 1996.
- HOFF-JORGENSEN, R. An international comparison of different laboratory tests for the diagnosis of bovine leucosis: Suggestions for international standardization. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 22, 293-97. 1989.
- HOPKINS, S. G., & DIGIACOMO, R. F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 13: 107-28. 1997.
- HUBNER, S.O., WEIBLEN, R., TOBIAS, F. L., CONCIAN, N., BOTTON, S. A., OLIVEIRA, M., FANINI, M. Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, 16. 87-90 1996.

- ISHIGURO, N., FURUOKA, H., MATSUI, T., HORIUCHI, M., SHINAGAWA, M., ASAHINA, M., OKADA, K. p53 mutation as a potential cellular factor for tumor development in enzootic bovine leukosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 55. 351-58. 1997.
- ISLAS, A., MONTES, G., LÓPEZ, J., ROJAS, K. Leucosis enzoótica bovina: induccion experimental de la infection com dos Fuentes del virus. **Arch. Med. Vet.** 28. 117-120. 1996.
- IYISAN, A. S., BITGEL, A., ÖZYÖRÜK, F. Serological survey of the prevalence of bovine leucosis in dairy cows in Istanbul province. **Vet. Bull.** 67. 4643. 1997.
- JACOBS, R. M., SONG, Z., POOM, H., HEENEY, J. L., TAYLOR, J. A., JEFFERSON, B., VERNAU, W. AND VALLI, V. E. O. Proviral Detection and Serology in Bovine Leukemia Virus-exposed Normal Cattle and Cattle with Lymphoma. **Can. J. Res.** 56: 349-352. 1992.
- JAKOBSEN, K. L., KANEENE, J. B., MILLER, J. M., BULL, R. Comparison of the commercial agar gel immunodiffusion test and radioimmunoprecipitation assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am. J. vet. Res.*, 46, 1430-33. 1985.
- JIMÉNEZ, C., BONILLA, J. A., DOLZ, G., RODRIGUEZ, L. R., HESSERO, L., BOLANOS, E., CORÉZ, M. R., MORENO, E. Bovine leukaemia virus infection in Costa Rica. **J. Vet. Med. B.** 42. 385-903. 1998.
- JOHNSON, M., ROMMEL, F., MOMÉ, J. J. Development of a syncytia inhibition assay for the detection of antibodies to bovine leukemia virus in naturally infected cattle; comparison with Western blot and agar gel immunodiffusion. **Viol. Methods.** 70:2. 177-82. 1998.
- JOHNSON, R. & KANEENE, J. B. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leucosis. **Vet. Bull.**, 62, 287-312. 1992.

- KABEYA, J., OHASHI, K., SUGIMOTO, C., AMANUMA, H., ONUMA, M. An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukaemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep. **Vaccine**. 14. 1118-22. 1996).
- KELLY, E.J., JACKSON, M. K., MARSOLAIS, G., MORREY, J. D., CALLAN, R. Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. **J. Am. J. Vet. Res.** 54. 1993.
- KLINTEVALL, K., BERG A., SVEDLUNG, G., BALLAGI-PORDÁNY, A., BELÁK, S. Differentiation between enzootic and sporadic bovine leukosis by use of serological and virological methods. **Vet. Rec.**, 133, 272. 1993.
- KOMORI, H., ISHIGURO, N., HORIUCH, M., SHINAGAVA, M., AINDA, Y. Predominant p53 mutations in enzootic bovine leukemic cell lines. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 52. 53-63. 1996.
- KONO, Y., SENTSU, H., MIYANITI, T., MOROZUMI, K., SAKAMOTO, Y. Changes in antibody titers in cattle infected clinically and subclinically with bovine leukemia virus. **Int. J. Cancer**, 30, 655-57. 1982.
- KOZACZYNSKA, B. Determination of IgG2 and IgM antibody titles in the sera of bovine leukaemia virus-infected cows using the modified indirect ELISA. **Vet. Bull.** 67. 4639. 1997.
- KUBIS, P., RULKA, J., KUR, J., DABROWSKI, S. PCR in the diagnosis of bovine leukaemia virus infection. **Vet. Bull.** 67 (8). 4640. 1997.
- LEITE, R. C., MODENA, C. M., MOREIRA, E. C., ABREU, J. J. Leucose enzoótica bovina em Minas Gerais. **Anais 17º Congr. Bras. Med. Vet.** Fortaleza, p.207. 1980
- LEWIN., H. A. Disease resistance and immune response genes in cattle: Strategies for their detection and evidence of their existence. **J. Dairy Sci.**, 72, 1334-48. 1989.

LIMA, A. O., SOARES, J. B., GRECO, J. B., GALLIZI, J., CANÇADO, J. R. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica – (Técnica e Interpretação)**. 7ª edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1992.

LUCAS, M. H. Enzootic bovine leukosis. In Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Manual of International Committee of the OIE. Paris, p. 276-280. 1996.

MAMMERICKX, M., PORTETELLE, D., BURNY, A. Experimental crosstransmissions of bovine leukemia virus (BLV) between several animal species. **Zbl. Vet. B.**, 27, 291-298. 1981.

MAMMERICKX, M., PORTETELLE, D.; BURNY, A. LEUNEM, J. Detection by immunodiffusion and radio-immunoassay of antibodies to bovine leukemia virus antigen in sera of experimentally infected sheep and cattle. **Zbl. Vet. Med. B**, 27, 291. 1980.

MANZ, D., WIEGAND, D., BEHRENS, F. ZIEGELMAIER, R. Vergleichende serologische Untersuchungen na Blut und Milch zur Diagnostic der enzootischen Leukose der Rinder. **Zbl. Vet. Med. B.**, 280-90. 1981.

MARÇAL, W. S. A doença que veio de for a. **Leite B**, 75: 21-23. 1993.

MERZA, M. S., LINNÉ, T., HÖGLUND, S., PORTETELLE, D., BURNY, A. MOREIM, B. Bovine leukaemia virus ISCOMs: biochemical characterization. **Vaccine**, 7, 22-28. 1989.

MÉSZÁROS, J., ANTAL, T., POLNER, A., SZABÓ, I., SZENTMIKLÓSSY CS. TEKES, L. Experiences of the eradication of bovine leucosis in Hungary (in hungarian, with English abstract.) **Magy. Áo. Lapja**, 41, 277-85. 1986.

MILLER, J. M., MILLER, L. D., OLSON, C. GILLETE, K. G. Virus like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. **J.Natl. Cancer Inst.**, 43, 1297-1305. 1969.

- MILLER, J. M., SCHMERR, J. F. VAN DER MAATEN, M. J. Comparison of four serologic testes for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. **Am. J. Vet. Res.**, 42, 5-8. 1981.
- MILLER, J., VAN DER MAATEN, M. J., PHILLIPS, M.: In Burny, A. (ed.) Bovin leucosis. Various methods of molecular virology. EEC, Luxemburg, 69, 1976.
- MIRSKY, M. L., OLMSTEAD, C. A., YANG D. A., LEVIN, H. A. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in periferial blood monuclear cells at two subclinical stages of infection. **J.Virol.**, 70. 2178-2183. 1996.
- MODENA, C. M. Leucose enzoótica bovina. I. Comparação entre métodos de diagnóstico. II. Evolução sorológica em bezerros III. Interferência com a vacina anti-febre aftosa. **Arqs. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais.** Belo Horizonte. 33:624-625. 1981.
- MOLNÁR, É., MOLNÁR, L., DIAS, H. T., VALE, W. G. Ocorrência da Leucose Enzoótica dos Bovinos no Estado do Pará, Brasil. 1997 (no prelo).
- MOLTENI, A., AGRESTI, A., MENEVERI, R., MASSOFI, A., MALKOVATI, M., BONIZZI, L., PLO, G., GINELLI, E. Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukaemia virus (BLV). **J. Vet. Med. B.** 43. 201-11. 1996.
- MORENO, E., DOLTZ, G., NONILLA, J. JIMENEZ, C., RODRIGUEZ, L., SALAZAR, I., RAMINEZ, M., BOLANOS, E., MORA, M., RAMINEZ. Serological studies on bovine leucemia virus (BLV) infection in Costa Rica by ELISA, immunodiffusion and Western blot tests. Regional network for Latin América on animal disease diagnosis using immunoassay and labelle DNA probe techniques. IAEA, Vienna, 99-114, IAEA-TECDOC 657. 1992.

- MORRIS, S. D., BRYSEN, N. R., WALL, D. T. DE., MATTHEE, O., PREEZ, E. R. DU., VUUREN, M. VAN KADISH, E. S. The possible role of two common three-host ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma hebraeum*, in the transmission of bovine leukosis virus. **J. South Afr. Vet. Ass.** 67. 128-150. 1996.
- MUCHALUAT, M. A. Leucose bovina em um rebanho do Estado de Minas Gerais. **Arq. Esc. Univ. Fed. Minas Gerais**, 23: 321-28. 1971.
- MURTAUGH, M. P., LIN, G. F., HAGGARD, D. L., WEBER, A. F., MEISKE, J. C. Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**. 33. 73-85. 1991.
- NIELSEN, K. H., KELLY, L., GALL, D., NICOLETTI, P., KELLY, W. Improved competitive enzyme immune assay for the diagnosis of bovine brucellosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 46. 285 – 291. 1995
- NODA GOMES, J., PEREZ, M., MARRERAS, M., ABELEDO, M.A. The use of ELISA and nucleic acid hybridization test in research and diagnosis of bovine leukosis virus. Regional network for Latin América on animal disease diagnosis using immunoassay and labeled DNA probe techniques. IAEA, Vienna, 85-91, IAEA-TECDOC-657. 1992.
- OLIVEIRA, A. P., IKUNO, A. A., MUELLER, S. B. K., BARRETO, C. S. F., SAAD, V. M. Leucose Bovina: Ocorrência de anticorpos em bovinos de várias faixas etárias. **Rev. Bras. De Med. Vet.**, 16, 46-50. 1994;
- OTACHEL-HAWRANEK, J. Eradication of enzootic leukaemia in dairy herds in the Wroclaw region. **Vet. Bull.**, 67 (5). 2636. 1997.
- OTACHEL-HAWRANEK, J., KORFANTY, E., SZACHNOWSKI, S., ERBERT, M., CISZEWSKI, G., JAKUBIAK, J. Use of ELISA in the detection of antibodies against bovine leukaemia in individual and bulk milk samples. **Vet. Bull.**, 66. 2520. 1996.

- PARRISH, C. R., OLIVER, R. E., WEDDELL, W., CORRIN, K. C. Bovine Leukaemia virus infection in New Zealand cattle. **New Zealand Vet. J.** 30. 56-58. 1982.
- PELZER, K. D. Economics of bovine leukaemia virus infection. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 13: 129-41. 1997;
- PIPER, C. E., FERRER, J. F., ABT, D. A., MARSHAK, R. R. Postnatal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. **J. Natl. Cancer Inst.** 62: 165-8. 1979.
- QIAO JIAN., CHEN WAN FANG. Cobalt, chromium, cadmium and lead and enzootic bovine leukemia. **Vet. Bull.** 67 (11). 6912. 1997.
- ROBERTS, D. H., LUCAS, M. H., SWALLOW, C. Comparison of the agar-gel immunodiffusion test and ELISA in the detection of bovine leukosis virus antibody in cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. **Immunol. Immunopathol.** 22, 275-281. 1989.
- RODÁK, L., GRANÁTOVÁ, M., VESELY, T., NEVORÁNKOVÁ, Z. Monoclonal antibody for the demonstration by ELISA of antibodies to protein p 24 of enzootic bovine leukosis virus in individual and pooled blood serum and milk samples. **Zbl. Vet. Med. B.** 44: 425-36. 1997.
- ROGERS, P. J., DIMMOCK, C. K., DE VOS, A. J. Bovine Leukosis virus contamination of a vaccine produced in vivo against bovine babesiosis and anoplasmosis. **Aust. Vet. J.** 65: 2885-7. 1988.
- ROMERO, C. H. & AGUIAR, A. A., ZANOCCHI, H. G., ABARACON, D., ROWE, C. A., SILVA, A. G. Susceptibility of the water of buffalo (*Bubalus bubalis*) to enzootic bovine leukosis virus. **Pesq. Vet. Bras.**, 1: 137-140. 1981.
- ROMERO, C.H., ZANOCCHI, H. G., AGUIAR, A. A., ABARACON, D., SILVA, A. G., ROWE, C. A. Experimental transmission of enzootic bovine leucosis virus with blood and milk in the tropics. **Pesq. Vet. Bras.**, 2:9-15. 1982.

- SAGATA, N., YASUNAGA, T., TSUZUKU-KAWAMURA, J., OHISHI, K., OGAWA, Y., IKAWA, Y. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukaemia virus: its evolutionary relationship to the other retroviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82. 677-81. 1996.
- SAMARA, S. J., LIMA, E. G., NASCIMENTO, A. A. Evolução da leucose enzoótica bovina no gado leiteiro da região de Pitangueiras (SP). **X Congr. Pan. Vet.**, Campo Grande, p. 161. 1996.
- SANTOS, J. A. **Patologia Especial dos Animais Domésticos** (mamíferos e aves). 2ª ed. Editora Interamericana. Rio de Janeiro. 1979.
- SANTOS, J. L., FARIA, J. E., RIBEIRO, M. F. B., SALCADO, J. H. P. Epidemiologia da leucose enzoótica bovina no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos na zona da mata. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 37: 359-368. 1985.
- SARGEANT, J. M., KELTON, D. F., MARTIN, S. W., MANN, E. D. Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. **Prev. Vet. Med.**: 3-4. 211-21. 1997 a.
- SARGEANT, J. M., KELTON, D. F., MARIN, S. W., MANN, E. D. Evaluation of a bulk-milk ELISA test for the classification of herd-level bovine leukemia virus status. **Prev. Vet. Med.**, 31. 223-30. 1997 b.
- SCHÖDEL, F., HAHN, B., HUBNER, R. HOCHSTEIN-MINTZEL, V. Transmission of bovine leukemia virus (BLV) to immunocompromised monkeys: evidence for persistent infection. **Microbiological**, 9, 163-69 1986.
- SCHOEPF, K. C., KAPAGA, A. M., MSAMI, H. M., HYERA, J. M. K Serological evidence of the occurrence of enzootic bovine leukosis (EBL) virus infection in cattle in Tanzania. **Vet. Bull.** 67 (8). 4642. 1997.

- SCHRAM, G., & ARAGON, A. Fallstudie über den Einfluss von Leukose und Leukosebekämpfungsmassnahmen auf die Produktions-und Reproduktionsleistung einer Milchviehherde in Costa Rica. **Tierärztl. Umschau.**, 49. 26-31. 1994.
- SCHWRTZ, I., BENSAD, A., POLACK, B., PERRIN, B., BERTHELEMY, M. LEVY, D. In vivo leucocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. **J. Virol.**, 68. 4589-96. 1994.
- SEIKI, M., HATTORI, S., HIRAYAMA, Y. YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 80. 3618-3622. 1983.
- SHERMAN, M. P., EHRLICH, G.D, FERRER, J.F. Amplification and analysis of specific DNA and RNA sequences of bovine leukemia virus from infected cows by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** 30: 185-191. 1992.
- SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Veterinária interna de Grandes Animais.** 2. Ed. Manole. São Paulo, 1100-03. 1993.
- SOUTHWOOD, L. L., PARISH, S. M., TYLER, J. W., HENRY, C. J. Atypical lymphosarcoma in a cow. **Vet. Rec.**, 138. 260. 1996.
- STRAUB, O. C., BRUCHHOF, B. R. Vergleichende Serumuntersuchungen mit ELISA-kits für der Antikörperrnachweis gegen das Bovine Leikose Virus. **Tierärztl. Umschau.** 49. 628-630. 1994.
- SZENT-IVÁYI, T., & MÉSZÁROS, J. **Doenças infecciosas dos animais domésticos. (In Hungarian),** Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 1985.
- TAMBASCO, A. J., TAMBASCO, D. D., OLIVEIRA. M. C. S. O vírus que enfraquece o gado. **Ver. Divulgação Científica da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência.** 22. 130. 56-7. 1997.

- TÁVORA, J. P. F. & BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose em rebanhos leiteiros criados na região do Polo Itabuna, Estado da Bahia. **Arq. Esc. Med. Vet. Univ. Fed. Bahia**. Salvador. 14: 164-183. 1991.
- TEKES, L. [Possibility for the eradication of bovine leucosis on farms where the infected and noninfected animals were housed in a common interior área]. **Magy. Áo. Lapja**, 44: 69-72. 1989.
- TEKES, L. Influence of management technology and parturition on antibody levels in cows with bovine leucosis. **Acta. Vet. Hung.**, 42, 57-67. 1994.
- TEKES, L., MÁTÉ ZS., RUSZKA GY. A serological survey on the distribution of leucosis in different cattle breeds in Hungary (In Hungary, with English abstract). **Magyar Áo. Lapja**, 39, 202-204. 1984.
- TODD, D., ADAIR, B. M., WIBBERLEY, G. An enzyme-linked immunosorbent assay for enzootic bovine leukosis virus antibodies. **Vet. Rec.** 107:124-26. 1980.
- VAN DER MAATEN, M. J. & MILLER, J.M. Virus Infections of Ruminants. Dinter Z. and Morien B. (ed). Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1990
- VASKE, T. T., GRUNERT, E., TEIXEIRA, J. S. A., SIQUEIRA, C. S., PIANÇA D. A ocorrência de leucose bovina num rebanho do Estado do Rio Grande do Sul. **Rev. Fac. Agron. Vet. R. G. Sul**. 7: 71-9. 1964.
- VERNON, W., JAKOBS, R. M., VALLI, V. E. O., HEENEY, J. L. The immunophenotypic characterization of bovine lymphomas. **Vet. Pathol.**, 34. 222-25. 1997.
- VILLOUTA, G., DURÁN, Y., CÉSPED, W., MONTES, G. Dinámica de la infección com el virus de la leucosis bovina em um prédio lechero de Chile. **Arch. Med. Vet.** 26. 2. 1994.
- VILTROP A., & LAHT, T. The historical background of the controlo f enzootic bovine leukosis in Estonia. **Vet. Sci. Tech**, 15 :, 1007-20. 1996.

WAWRZKIEWICZ, J., DZIEDZIC, B., KOZIOL, T., Sensitivity and specificity of a modified agar gel precipitation test and its application to the diagnosis of enzootic bovine leukosis. **Acta. Virol.** 33. 143-150. 1989.

WEIBLEN, R. A fatal leucose. **Sanidade do Gado Leiteiro.** Tortuga/Embrapa-CNGL. 1991.

WYATT, C. R., WINGETT, D., WHITE, J. S., BUCK, C. D., KNOWLES, D., REEVES, R., MAGNUSON, N. S. Persistent infection of rabbits with Bovine Leukemia Virus associated with development of immune dysfunction. **J. Virol.** 63: 4498-4506. 1989.

YASUDA, D., TANABE, T., HASHIMOTO, A., TOO, K. Adenosin deaminase (ADA) activity in tissues and sera from normal and leukaemic cattle. **Brit. Vet. J.**, 152. 485-88. 1996.

