

ARTUR CEZAR DE CARVALHO FERNANDES

AVALIAÇÃO DA LEUCOMETRIA NA IDENTIFICAÇÃO DA LEUCOSE
ENZOÓTICA DOS BOVINOS EM REBANHOS DO ESTADO DE
PERNAMBUCO

RECIFE, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ARTUR CEZAR DE CARVALHO FERNANDES

AVALIAÇÃO DA LEUCOMETRIA NA IDENTIFICAÇÃO DA LEUCOSE
ENZOÓTICA DOS BOVINOS EM REBANHOS DO ESTADO DE
PERNAMBUCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural
de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em
Ciência Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo

RECIFE, 2012

Ficha Catalográfica

F363a Fernandes, Artur Cezar de Carvalho
Avaliação da leucometria na identificação da leucose enzoótica dos bovinos em rebanhos do estado de Pernambuco / Artur Cezar de Carvalho Fernandes. – 2012.
61 p. : il.

Orientador (a): Lúcio Esmeraldo Honório de Melo.
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Medicina Veterinária, Recife, 2012.
Referências.

1. Bovino – Doenças 2. Leucometria 3. Leucose
enzoótica bovina 4. Saneamento 5. Avaliação de riscos de
saúde 6. Epidemiologia I. Melo, Lúcio Esmeraldo Honório de,
Orientador II. Título

CDD 636.08944

AGRADECIMENTOS

Em mais esta etapa de minha vida gostaria de agradecer primeiramente a Deus que sempre está presente em minha vida e em minhas decisões.

Agradecer aos meus pais Francisco Erialdo Pimentel Fernandes e Maria do Socorro de Carvalho Fernandes, que sempre me incentivaram mostrando que o estudo gera algo que nunca poderão nos tirar: O CONHECIMENTO.

Aos meus irmãos Livio e Diogo, sempre dispostos a me ajudar e dividir todos os momentos de nossas vidas. Sempre valorizando nossas conquistas.

À minha NOIVA, Talita Lins, que muito me ajudou a hoje estar seguindo em busca da docência, sempre compreensiva e passando juntos os momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Professor Lúcio, um mestre no meio acadêmico e um grande amigo pessoal que para a vida.

Aos amigos de orientação, Luiz e Tamyres que juntos dividimos momentos dos mais variados. Sempre crescendo.

Aos amigos de mestrado que juntos nos ajudamos neste complicado caminho.

Ao amigo Cláudio Fernando, que também sempre me incentivou e me orientou à nunca perder Deus diante de meus objetivos.

À FACEPE pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste estudo, bem como à UFRPE pelo conhecimento vindo de seus professores e funcionários.

RESUMO

A Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) é uma ameaça à saúde dos rebanhos bovinos do estado de Pernambuco e o aperfeiçoamento no uso de ferramentas epidemiológicas para identificação e eliminação de focos desta doença demanda atenção. O objetivo com a realização deste estudo foi avaliar a leucometria como um recurso auxiliar para a identificação de focos da LEB e saneamento dos rebanhos, a partir de ensaios realizados para estabelecer a prevalência dessa insidiosa retrovírose e da Tuberculose Bovina (TB) em rebanhos criados em vários municípios do estado. Foram submetidas ao sorodiagnóstico para LEB amostras de 1.000 bovinos procedentes de 33 rebanhos, sendo 920 deles submetidos previamente ao teste da tuberculina (TCC). Em aproximadamente 70% (694/1000) dos bovinos foram realizadas análises leucométricas, sendo desconsiderados das mesmas os animais com resultados inconclusivos aos dois testes diagnósticos e os positivos ao teste da tuberculina. Desta forma, 530 amostras foram distribuídas em dois grupos experimentais, em função dos resultados à IDGA: GI = leucogramas de 379 bovinos soronegativos; e GII = leucogramas de 151 bovinos soropositivos. As prevalências da LEB e TB foram 28% (282/1000) e 11% (99/920), respectivamente. Globalmente, os valores médios dos leucócitos foram: totais = $12,0 \pm 4,7$ e linfócitos = $8,1 \pm 5,4$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$). Considerando os grupos experimentais, os valores médios dos leucócitos do GI (totais = $11,5 \pm 3,8$ e linfócitos = $7,6 \pm 5,1 \times 10^3/\text{mm}^3$) foram significativamente menores ($p < 0,05$) do que os do GII (totais = $13,3 \pm 6,3$ e linfócitos = $9,1 \pm 5,9 \times 10^3/\text{mm}^3$). Dentre os bovinos examinados 30% (159/530) apresentaram leucocitose por linfocitose – LL (leucócitos totais e linfócitos maiores do que $12,1$ e $8,4 \times 10^3/\text{mm}^3$, respectivamente), tendo o GI maior frequência de animais (99/379) com esta disfunção linfoproliferativa do que o GII (60/151), contudo os valores leucométricos médios do GII (totais = $18,6 \pm 6,5$ e linfócitos = $14,0 \pm 6,7 \times 10^3/\text{mm}^3$) foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aos do GI (totais = $15,9 \pm 3,1$ e linfócitos = $12,1 \pm 8,0 \times 10^3/\text{mm}^3$). Analisando os bovinos portadores de LL e que apresentaram os valores leucométricos acima do limite tolerável de referência (totais = $15,0$ e linfócitos = $12,7 \times 10^3/\text{mm}^3$, respectivamente), não foi observada diferença significativa entre os grupos GI (totais = $19,9 \pm 3,5$ e linfócitos = $15,8 \pm 3,9 \times 10^3/\text{mm}^3$) e GII (totais = $23,2 \pm 7,4$ e linfócitos = $19,2 \pm 7,4 \times 10^3/\text{mm}^3$). Bovinos do GI (soronegativos) portadores de LL (totais $> 15,0$ e linfócitos $> 12,7 \times 10^3/\text{mm}^3$) foram considerados suspeitos, pois não apresentaram diferença leucométrica significativa com os do GII (soropositivos) portadores de LL. Conclui-se que, com a demonstração da interferência do VLB no leucograma dos bovinos examinados e com a identificação de bovinos suspeitos não detectados pela IDGA, a leucometria se presta como recurso auxiliar para a identificação de focos da LEB e saneamento dos rebanhos.

Palavras – chave: Leucose Enzoótica dos Bovinos, leucometria, identificação de focos; saneamento.

ABSTRACT

The Enzootic Bovine Leukosis (EBL) is a threat to the health of cattle herds in the state of Pernambuco and improvement in the use of epidemiological tools to identify and eliminate outbreaks of the disease demands attention. The aim of this study was to evaluate the leukocyte count as an aid in the identification of outbreaks of EBL and sanitation of livestock, from tests performed to establish the prevalence of this insidious retrovirus and Bovine Tuberculosis (BT) in cattle raised in several cities in the state. Were submitted for the EBL's serodiagnosis 1000 bovine samples originating from 33 herds, 920 of them being previously submitted to the tuberculin test. Approximately 70% (694/1000) of the bovine leukocyte counts were analyzed, and disregarded animals with inconclusive results to two diagnostic tests and the positive to the tuberculin test. Thus, 530 samples were divided into two experimental groups, according to the results of AGID: GI = white blood cell count of 379 seronegative cattle, and IGI = white blood cell count of 151 seropositive cattle. The prevalence of EBL and BT were 28% (282/1000) and 11% (99/920), respectively. Overall, the mean values of leukocytes were: total = 12.0 ± 4.7 and lymphocytes = 8.1 ± 5.4 ($\times 10^3/\text{mm}^3$). Considering the experimental groups, the mean values of leukocytes in GI (total = 11.5 ± 3.8 and = 7.6 ± 5.1 lymphocytes $\times 10^3/\text{mm}^3$) were significantly lower ($p < 0.05$) than those of GII (total = 13.3 ± 6.3 and = 9.1 ± 5.9 lymphocytes $\times 10^3/\text{mm}^3$). 30% (159/530) of cattle examined had leukocytosis due to lymphocytosis - LL (total leukocytes and lymphocytes larger than $\times 10^3/\text{mm}^3$ 12.1 and 8.4, respectively), with the higher frequency of GI animals (99/379) with this lymphoproliferative disorder than GII (60/151), however the average values of GII leukocyte (total = 18.6 ± 6.5 and lymphocytes = 14.0 ± 6.7 $\times 10^3/\text{mm}^3$) were significantly higher ($p < 0.05$) to GI (total = 15.9 ± 3.1 and lymphocytes = 12.1 ± 8.0 $\times 10^3/\text{mm}^3$). Analyzing the cattle with LL and that had leukocyte values above the reference standard deviation (total = $15.0 = 12.7$ $\times 10^3/\text{mm}^3$ and lymphocytes, respectively), there wasn't significant difference between GI (total = 19.9 ± 3.5 and 15.8 ± 3.9 lymphocytes $\times 10^3/\text{mm}^3$) and GII (total = 23.2 ± 7.4 and 19.2 ± 7.4 lymphocytes = $\times 10^3/\text{mm}^3$). Cattle GI (seronegative) with LL (total > 15.0 and lymphocytes > 12.7 $\times 10^3/\text{mm}^3$) were considered suspect because leukocyte counts did not differ significantly with those of GII (seropositive) with LL. It is concluded that with the VLB demonstration of interference in leukocyte counts of cattle examined and the identification of suspect cattle not detected by AGID, the leukocyte count lends itself as an auxiliary to the identification of outbreaks of LEB and sanitation of livestock.

Keywords: Enzootic Bovine Leukosis, leukocyte counts, identification of outbreaks, sanitation.

LISTA DE FIGURAS

| | | Pág. |
|----------|--|------|
| Figura 1 | Avaliação dos valores médios de leucócitos totais e linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) dos animais soronegativos e soropositivos em relação ao intervalo de confiança para a população estudada. | 38 |
| Figura 2 | Esquema estratégico a ser usado em programas sanitários para identificação de focos da LEB e saneamento dos rebanhos leiteiros no estado de Pernambuco. | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | | Pág. |
|----------|---|------|
| Tabela 1 | Distribuição da taxa de prevalência de vacas reagentes à IDGA para o diagnóstico da LEB, em rebanhos leiteiros do Estado de Pernambuco. | 35 |
| Tabela 2 | Distribuição da taxa de prevalência de vacas reagentes à tuberculinização, em rebanhos leiteiros do Estado de Pernambuco. | 36 |
| Tabela 3 | Valores leucométricos médios de bovinos soronegativos e soropositivos à IDGA. | 37 |
| Tabela 4 | Frequência e valores médios de leucócitos totais e linfócitos dos animais considerados portadores de Leucocitose por Linfocitose. | 39 |
| Tabela 5 | Frequência e valores médios de leucócitos totais e linfócitos dos animais portadores de LL, que apresentaram valores acima do limite tolerável do grupo controle. | 40 |
| Tabela 6 | Intervalo de confiança da média e individual dos leucócitos dos bovinos examinados em rebanhos leiteiros estado de Pernambuco. | 43 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | Pág. |
|-----------|---|------|
| Gráfico 1 | Frequência dos bovinos soropositivos e soronegativos portadores de leucitose por lifocitose. | 41 |
| Gráfico 2 | Frequência dos bovinos soronegativos portadores de LL com valores acima do limite tolerável (com base no grupo controle). | 42 |
| Gráfico 3 | Frequência dos bovinos soropositivos portadores de LL com valores acima do limite tolerável (com base no grupo controle). | 42 |

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| GI | Grupo de animais soronegativos |
| GII | Grupo de animais soropositivos |
| HTLV | Human T-lymphotropic virus |
| IDGA | Imunodifusão em Gel Ágar |
| IgM | Imunoglobulina M |
| LEB | Leucose Enzoótica dos Bovinos |
| LL | Leucocitose por linfocitose |
| MAPA | Ministério da Agricultura Pecuária e Abastacimento |
| ml | Mililitros |
| OIE | World Organisation for Animal Health |
| PCR | Reação em Cadeia de Polimerase |
| PNCEBT | Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose da Tuberculose Animal. |
| SPSS | Statistical package for the social sciences |
| TB | Tuberculose Bovina |
| TCC | Teste Cervical Comparativo |
| UFRPE. | Universidade Federal Rural de Pernambuco |
| UE | União Européia |
| VLB | Vírus da Leucose Bovina |
| VLTH-VLB | Vírus linfotrópico de células T Humanas + Vírus linfotrópico de células B |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 11 |
| 2. Revisão de Literatura | 14 |
| 2.1 Aspectos histórico-conceituais, epidemiológicos e etiopatogênicos da LEB | 14 |
| 2.2 Aspectos soropidemiológicos | |
| 2.3 Aspectos hematológicos | |
| 3. Metodologia | 31 |
| 3.1 Caracterização da amostra | 31 |
| 3.2 Diagnóstico da Tuberculose Bovina | 32 |
| 3.3 Diagnóstico da Leucose Enzoótica dos Bovinos | 32 |
| 3.4 Análises leucométricas | 33 |
| 3.5 Constituição dos grupos experimentais | 33 |
| 3.5 Análises estatísticas dos resultados | 34 |
| 4. Resultados e discussão | 35 |
| 4.1 Relacionados à prevalência da LEB e TB | 35 |
| 4.2 Relacionados às análises leucométricas | 37 |
| 4.3 Relacionados às análises estatísticas | 42 |
| 5. Considerações finais | 45 |
| 6. Conclusão | 47 |
| 7. Referência Bibliográfica | 48 |

1. Introdução

A Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) é uma doença transmissível, cosmopolita, caracterizada pela evolução crônica e de impacto socioeconômico internacional, sendo a notificação anual de sua ocorrência prevista nas normas zoosanitárias internacional por comprometer o desempenho produtivo dos rebanhos, estabelecer sucessivas condenações de carcaças em matadouros e restringir o comércio de animais, além de aumentar os custos com serviços veterinários (OIE, 2001).

A doença teve origem no Brasil pela introdução de animais infectados procedentes de áreas enzoóticas (países da Europa, Estados Unidos e Canadá) nos rebanhos do estado de Minas Gerais, sendo difundida progressivamente nas criações do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo (RANGEL e MACHADO, 1943; BUENO, 1958; MERKT *et al.*, 1959; SANTOS, 1959).

Historicamente, a relevância da hematologia como ferramenta clínico-epidemiológica estratégica no combate à LEB pode ser constatada desde os primórdios do século passado (TOIT, 1916 apud DOBBERSTEIN, 1934; KNUTH e VOLKMANN, 1916), cujo ápice foi alcançado com a elaboração, na Alemanha, da primeira chave leucométrica para avaliar a ocorrência da LEB nos rebanhos (GÖTZE *et al.*, 1954). Foi este o critério utilizado no combate à doença, antes mesmo da comprovação de sua natureza viral, que possibilitou a países do continente Europeu, como a Alemanha, de praticamente erradicar a LEB de seus rebanhos, mantendo, atualmente, apenas o monitoramento clínico e soro-epidemiológico das criações (STÖBER, 1970).

Diferentemente, estudos americanos voltaram-se prioritariamente à pesquisa do agente etiológico e à soroprevalência da LEB, resultando na elucidação de sua natureza viral, com o isolamento do Vírus da Leucose Bovina (VLB) em cultura celular de linfócitos bovinos (MILLER *et al.*, 1969), e na realização de sucessivos ensaios soroepidemiológicos, os quais, embora tivessem possibilitado a visualização da agnitude e dinâmica da infecção, não foram suficientes para erradicar ou mesmo controlar a ocorrência da doença nos rebanhos bovinos dos E.U.A.

Esse modelo americano parece ter sido aplicado pela ampla maioria dos pesquisadores brasileiros no reconhecimento da LEB no nosso país, pelo qual se

priorizou a investigação e ratificação do agente causal da doença no país, com o isolamento do VLB em material biológico de bovinos naturalmente infectados em cultura de fibroblastos de prepúcio humano (ÂNGELO *et al.*, 1985), em conexão com inúmeros estudos de soroprevalência (MODENA, 1981; BIRGEL *et al.*, 1988 a,b; D'ANGELINO, 1991; MELO, 1991; CARVALHO, 1994; TENÓRIO, 2003; FRANDOLOSO *et al.*, 2008; BARROS FILHO *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2011). Estudos hematológicos pioneiros (CAVALCANTE *et al.*, 1969), bem como outros mais recentes (MELO *et al.*, 1990; BIRGEL *et al.*, 2000; MENDES *et al.*, 2002) não têm sido devidamente considerados no combate à LEB no país.

A inexistência de um programa sanitário oficial no combate à LEB e a desestruturação progressiva de alguns serviços de sanidade animal, quer na esfera municipal, estadual ou federal, particularmente os sistemas de vigilância epidemiológica, tem interferido negativamente nas condições de saúde dos rebanhos bovinos de nosso país. Esta situação afeta principalmente os pequenos produtores por submeter seus animais a um manejo geral falho, particularmente em seus aspectos sanitários, propiciando o convívio íntimo e prolongado de bovinos doentes, fontes naturais e potenciais disseminadores de agentes infecciosos, expondo continuamente os animais sadios ao risco de infecções (MELO, 1991; MENDES *et al.*, 2008; RADOSTITS *et al.*, 2003; ROSENBERGER *et al.*, 1961).

Neste sentido, e com base nas evidências de que VLB compromete o estado imunitário dos bovinos infectados (WYERS, 1975; BURNY e MAMMERICKX, 1987; HEENEY *et al.*, 1992; USUI *et al.*, 2006; ERSKINE *et al.*, 2011), podendo atuar como fator de risco à ocorrência da Tuberculose (MENDES *et al.*, 2008; MENDES, 2002), e na possibilidade da detecção de disfunções linfoproliferativas específicas vinculadas à ação patogênica do VLB (MILLER *et al.*, 1969; FERRER *et al.*, 1979; ERSKINE *et al.*, 2011), admite-se que o reconhecimento do perfil leucométrico, em conexão com a pesquisa de anticorpos séricos específicos anti-VLB, potencializam e aperfeiçoam os procedimentos clínicos com vistas ao estabelecimento do diagnóstico e à implantação de estratégias de controle e profilaxia da LEB.

Diante do exposto, preservada a relevância dos aspectos nosológicos e anátomo-patológicos associados à LEB, e considerando as evidências de sua expansão desenfreada nos rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco, objetiva-se com este

estudo caracterizar a dinâmica leucométrica de bovinos submetidos ao sorodiagnóstico da LEB e avaliar a importância da leucometria como um recurso auxiliar para o monitoramento de rebanhos, com vista à identificação e eliminação de focos da doença, bem como possibilitar a implantação de estratégias mais eficazes de controle da ocorrência dessa insidiosa retrovirose nos rebanhos.

3 Revisão de Literatura

3.1 Aspectos histórico-conceituais, epidemiológicos e etiopatogênicos da LEB

A designação Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) é reconhecida universalmente (INTERNATIONAL COMMITTEE ON BOVINE LEUCOSIS, 1968) e a doença teve sua origem na Europa, de onde foi disseminada para outros continentes, através da introdução de animais europeus infectados em seus rebanhos (OLSON e MILLER, 1987; CASTRO *et al.*, 1988). O primeiro caso clínico de LEB foi reportado por LEISERING em 1861, ao descrever nódulos neoplásicos de origem linfóide em um baço de vaca (STOBER, 1970; OLSON e MILLER, 1987).

Apesar das evidências epidemiológicas, apenas em 1965 a natureza infecciosa do agente etiológico da LEB foi esclarecida por Bendixen. Posteriormente, ocorreu a identificação da etiologia viral da Leucose realizada por MILLER *et al.* (1969), que isolaram o vírus em cultura de linfócitos bovinos com sintomas aparentes ou não da doença, determinando, através da microscopia eletrônica, a frequência das partículas virais.

A LEB é causada por um retrovírus exógeno linfotrópico B que compromete primariamente o sistema linfóide do bovino infectado, determinando processos desorganizativos dos seus tecidos e órgãos, especialmente linfonodos, que perdem as características primárias e vão sendo progressivamente substituídos por um novo tecido, de natureza neoplásica, formador de linfossarcomas, podendo haver ou não leucemização (JAIN, 1993; MATSUOKA e JEANG, 2007).

Estudos citogenéticos e imuno-sorológicos, que demonstraram haver uma sequência nuclear homóloga entre o vírus da leucose bovina e viroses linfotrópicas T humanas, assim como, ocorrência de reações cruzadas de anticorpos entre soros bovinos e humanos infectados (MARUYAMA *et al.*, 1989; MATSUOKA e JEANG, 2007), levaram o Comitê Internacional sobre Taxonomia de Virose a incluí-lo no gênero VLTH-VLB (vírus linfotrópicos de células T Humanas + Vírus linfotrópicos de células B), espécie Vírus da Leucemia Bovina (FRANCKI *et al.*, 1991), designado mais apropriadamente de Vírus da Leucose Bovina (VLB).

Os primeiros estudos a cerca da etiopatogenia da doença no Brasil foram publicados por Rangel e Machado (1943), ao realizarem um levantamento sobre a

frequência de neoplasias em animais domésticos, no estado de Minas Gerais, e assinalarem, de forma inédita no país, a ocorrência de linfossarcoma em bovinos. Porém, Merkt *et al.* (1959) parecem sinalizar o primeiro diagnóstico autóctone da doença em rebanho brasileiro, apesar de haver relatos de que observações clínico-anatomopatológicas associadas à leucose, haviam sido realizadas, mas não publicadas, por Bueno (1958) em São Paulo e Santos (1959) no Rio de Janeiro.

A consolidação de anos de estudos voltados aos aspectos clínico-epizootiológicos e da etiopatogenia da leucose no Brasil ocorreu com o isolamento pioneiro do VLB por Angelo *et al.* (1985), em cultura primária de fibroblastos provenientes de prepúcios humanos, a partir de linfócitos de bovinos sororeagentes ao antígeno glicoprotéico do VLB.

Na cadeia epidemiológica da LEB infecção e doença representam o mesmo risco (BIRGEL *et al.*, 1982), aspecto este que torna os animais portadores do VLB, além de fonte natural, agentes de alta infecciosidade e precursores da gênese da leucose enzoótica em uma população de bovinos.

Observa-se uma maior disseminação do VLB entre animais de exploração leiteira, em relação aos animais destinados a produção de carne, nesse contexto, Lorenz e Straub (1987) associaram a maior susceptibilidade de bovinos leiteiros a infecção pelo VLB às variações de manejo e a maior permanência dos animais nos rebanhos.

Os aspectos de transmissibilidade do VLB têm sido exaustivamente estudados durante anos, demonstrando que a transmissão natural do vírus pode ocorrer horizontal ou verticalmente (GÖTZE *et al.*, 1956; ROSENBERGER, 1961 e 1968; FERRER e DIGLIO, 1976; VAN DER MAATEN e MILLER, 1979; MAMMERICKX *et al.*, 1978; WILESMITH, 1980; BUXTON *et al.*, 1982; BIRGEL *et al.*, 1982; BRIGHTLING e RADOSTITS, 1983; EVERMANN *et al.*, 1987; LORENZ e STRAUB, 1987). O fato das partículas virais livres serem bastante instáveis torna as células infectadas, como linfócitos-B, monócitos, macrófagos, etc, presentes no sangue ou leite, os principais veículos na transmissão natural do VLB (KETTMANN, 1994).

A transmissão horizontal do VLB é favorecida pelo convívio íntimo e prolongado de animais que vivem em constantes condições de estresse, como a rotineira mudança do pasto pra estabulação, podendo ocorrer quando expostos ao leite ou colostro de

animais infectados, secreções (salivar, nasal, genital) e excreções (urina e fezes) (ROSENBERGER, 1961 e 1968; MAMMERICKX *et al.*, 1978; WILESMITH *et al.*, 1980; SPRECHER *et al.*, 1991 apud TSUTSUI *et al.*, 2010).

A transmissão iatrogênica é, certamente, a via mais preocupante e de maior difusão do VLB, sendo necessários, apenas 2.500 linfócitos (0,05µl de sangue) para, através de inoculação, determinar-se a infecção (VAN DER MAATEN e MILLER, 1979). Normas inadequadas de palpação retal, vacinação, tratamento sistêmico utilizando injeções intramusculares, subcutâneas ou intravenosas contaminadas com sangue, colheitas ou transfusões de sangue, incluindo o processo de premunição contra anaplasmose e babesiose a que são submetidos, rotineiramente, os animais importados, além de fômites contaminados usados em castrações e descornas, podem difundir intensamente a infecção pelo VLB em um rebanho (BIRGEL *et al.*, 1982; BRIGHTLING e RADOSTITS, 1983; LORENZ e STRAUB, 1987; KOHARA *et al.*, 2006).

Verticalmente, por via placentária, o VLB pode infectar linfócitos fetais, o que caracterizaria uma infecção intra-uterina, que ocorre entre 8 e 20% dos casos de contágio estando associado a uma imunossupressão temporária que ocorre na vaca durante a prenhez, e com riscos maiores para bezerros nascidos de vacas com linfocitose persistente (FERRER, 1976; EVERMANN, 1987; AGRETI, 1993). A transmissão vertical via colostro também é citada na literatura como possível (SPRECHER *et al.*, 1991 apud TSUTSUI *et al.*, 2010). Porém, Nagy *et al.* (2007) ao estudarem a transmissão por esta via sugeriram que bezerros alimentados com colostro de vacas VLB positivas apresentaram uma menor taxa de infecção. A discussão quanto ao papel do colostro na transmissão ou prevenção de retrovírus também é feita na medicina humana em relação ao VLTH tipos I e II (READ, 2003; ILIFF, 2005).

A maioria dos animais infectados pelo VLB não apresentam sintomatologia clínica, cerca de 30% destes apresentam um quadro de linfocitose persistente e apenas 1 a 5% desenvolvem linfossarcoma (KOHARA *et al.*, 2006). No contexto da transmissão do VLB tanto os animais assintomáticos quanto os que desenvolvem sintomatologia merecem atenção. O primeiro por se caracterizar como uma fonte silenciosa de transmissão no rebanho e o segundo, por apresentar elevada carga viral com maior chance de transmissão (KOHARA *et al.*, 2006; JULIAREMA *et al.*, 2007).

Estudo realizado por Kobayashi *et al.* (2010), em rebanhos com diferentes taxas de infecção, ressalta a importância de conhecer os fatores de risco na transmissão do VLB para se estabelecer eficientes medidas de controle. Neste trabalho ficou evidente que o sistema de criação, a realização de procedimentos cirúrgicos, como por exemplo, a descorna, sem cuidados com a higiene, a presença de *Tabanídeos* no verão, o uso de luva de palpação em vários animais e a reutilização de agulha na vacinação influenciam na disseminação do vírus dentro de uma propriedade elevando as taxas de infecção.

A partir do primeiro contato vírus~hospedeiro uma forte mas aparentemente ineficiente resposta imunológica (humoral e citotóxica) é produzida (FLORINS, 2007). Nesse contexto, a infecção recente pelo VLB provoca resposta imunológica orgânica, caracterizada pela exacerbação do número de linfócitos B, considerando-se como base os padrões de referência para a raça e o grupo etário e, conseqüentemente, aparecimento de anticorpos séricos específicos anti-VLB, os quais possibilitam a detecção precoce dos animais sororeagentes nos rebanhos, sendo o período de tempo entre a infecção e a soro-conversão de, aproximadamente, três meses (MUSCOPLAT *et al.*, 1974; FERRER *et al.*, 1979; CASTRO *et al.*, 1988).

O estabelecimento do complexo antígeno-anticorpo (VLB~linfócitos B) promove a sensibilização imunológica dos linfócitos, que sofrem modificações em sua morfologia e assumem aspecto de linfoblastos ou imunoblastos, células mais jovens, dotadas de grande capacidade de mitose. Adicionalmente, o VLB impõe condição de imunossupressão que inibe ou reduz a ação ou produção de anticorpos, particularmente IgM, imunoglobulina precursora da ativação de enzimas do plasma, responsáveis pela lise celular e outros fenômenos da resposta imune primária, inibindo, inclusive, a atividade fagocitária de neutrófilos, prejudicando o sistema imuno-celular. Esse comprometimento da integridade do sistema imunitário orgânico propicia ao VLB, desprovido de envelope, de penetrar no citoplasma linfocitário onde, sob ação da transcriptase reversa, converte-se de RNAvírus mono-cromossomal a DNAvírus duplo-cromossomal para incorporar-se no genoma celular do linfócito por tempo indeterminado, às vezes anos, o que pode promover o aparecimento de falsos negativos nos testes sorológicos. O estresse do hospedeiro, advindo da produção (lactação, ganho de peso rápido) e principalmente de doenças intercorrentes, parece ser elemento importante no desencadeamento da replicação de VLB, cujas partículas deixam o núcleo

celular e, no citoplasma, reverterem-se à condição primária de RNAvírus (“retrovirus”, do lat. retro = para trás), deslocam-se até a membrana citoplasmática, adquirem forma de “C” (vírus tipo C) e, por gemelação, replicam-se intensamente, caindo na corrente sanguínea em sua forma madura (CHEVRIER, 1975; WYERS, 1975).

A resposta humoral pós-infecção é um dos primeiros sinais de que a infecção está instalada (RADKE *et al.*, 1990; KONNAI *et al.*, 2006). Os anticorpos são produzidos em níveis elevados, reconhecendo epítopes da estrutura viral (gp51 - envelope e p24 - capsídeo) e proteínas reguladoras (Tax e Rex). Alguns desses anticorpos possuem ação lítica direta sobre células infectadas reconhecidas como produtoras de partículas virais (NAGY *et al.*, 2002). Quase que simultaneamente ao período de soro-conversão, linfócitos-T citotóxicos específicos para proteína TAX e para epítopes do envelope viral migram para o sangue periférico resultando na permanente ativação da linhagem CD4 T-helper durante a infecção (STONE *et al.*, 2000; OLDSTONE, 2006).

Assim, a resposta humoral e citotóxica tem início logo após a infecção com a perspectiva de intensificar-se e persistir durante toda a vida do animal, o que indica que o sistema imune encontrar-se-á permanentemente estimulado pelo VLB. A associação das respostas humoral e citotóxica, de forma permanente, torna o animal vulnerável impossibilitando-o de responder a desafios imunológicos posteriores, por encontrar-se imunologicamente comprometido (BURNY e MAMMERICKX, 1987; USUI *et al.*, 2006; MENDES, *et al.*, 2008; ERSKINE *et al.*, 2011).

3.2 Aspectos soroepidemiológicos

Diferentes pesquisadores estabeleceram que o diagnóstico nosológico (pelas manifestações clínicas), hematológico (pela ocorrência de leucocitose por linfocitose associadas a atipia destas células) e imunológico (pela determinação sorológica de anticorpos anti-VLB) são necessários na determinação do diagnóstico da leucose bovina em um rebanho ou indivíduo (GÖTZE *et al.*, 1954; ROSENBERGER *et al.*, 1961 e 1968; MAMMERIKX *et al.*, 1976; RESSANG *et al.*, 1976).

Os testes sorológicos recomendados para o diagnóstico da LEB são a prova de imunodifusão em gel de ágar e o ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) (MILLER e OLSON, 1972; MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; TRONO, 2001; OIE, 2008; EL-HAFEIZ, 2010). Estudos mostram a importância do uso de ambos os

testes diagnósticos na rotina, com o ELISA apresentando uma maior sensibilidade em relação ao IDGA, sendo bem aplicado em casos de baixos títulos de anticorpos (TRONO, 2001; OIE, 2008; EL-HAFEIZ, 2010). A imunodifusão é considerada uma técnica na rotina laboratorial para a identificação de bovinos portadores de anticorpos séricos específicos anti-VLB, pela alta especificidade, adequada sensibilidade e grande praticidade, sendo pouco dispendiosa. (MAMMERICKX *et al.*, 1976; MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; SHETTIGARA *et al.*, 1986; EVERMANN *et al.*, 1987; MAMMERICKX *et al.*, 1987). Destaque-se que, desde 1980, a utilização desta prova tornou-se obrigatória na importação e exportação de gado, sendo adotada como teste oficial de diagnóstico da Leucose Enzoótica dos bovinos pela Comunidade Econômica Européia (MILLER, 1980).

Além dos testes sorológicos, métodos diretos de identificação do agente etiológico estão sendo utilizados no diagnóstico da LEB. Nesse contexto insere-se, dentre outros, o isolamento viral (OIE, 2008) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (CAMARGOS *et al.*, 2005; MOHAMMADABADI *et al.*, 2011). Apesar do elevado custo para realização de PCR, e de não ter sido desenvolvida para substituir os testes sorológicos, esta técnica pode ser utilizada de forma complementar, como por exemplo, para identificar precocemente animais que ainda não soroconverteram ou no diagnóstico de bezerros alimentados de vacas VLB-positivas (CAMARGOS, 2001; CAMARGOS *et al.*, 2005).

O estudo da prevalência da Leucose Enzoótica dos Bovinos, através de inquéritos soro-epidemiológicos, empregando-se a imunodifusão dupla em gel de ágar como recurso diagnóstico na detecção de bovinos reagentes ao antígeno glicoproteico (gp51) extraído do envelope do VLB vem sendo aplicado em todo mundo. A determinação da taxa de prevalência, índice considerado como sendo o parâmetro mais comumente usado para a avaliação da dimensão da infecção pelo mencionado vírus em uma população, proporciona uma visão epidemiológica mais abrangente e significativa da doença (LORENZ e STRAUB, 1987; ACAITE *et al.*, 2007; LOPEZ *et al.*, 2010; MOHAMMADI *et al.*, 2011).

Na Europa, continente mencionado como sendo o local de origem dessa insidiosa doença, a União Européia - UE (European Union, 2010) declarou que boa parte dos países membros são livres da leucose bovina. Contraditoriamente, relatórios da OIE

(2011) mostram que países como Alemanha, França, República Checa, tidos como livres para a UE, apresentaram casos de leucose entre os anos de 2010 e 2011. Além desses, países como Hungria, Itália, Polônia, Romênia e Rússia destacaram-se pela elevada incidência neste mesmo período (OIE, 2011).

Estudo realizado entre 1995 e 2005 em Portugal registrou uma diminuição na prevalência e incidência da LEB no país, e reforçou que a maior incidência da doença ocorreu em rebanhos leiteiros, como já se é conhecido. Para atingir esse resultado, durante o período do estudo, quando a prevalência ultrapassava 5% dos animais reprodutores, os animais infectados ou suspeitos eram isolados ou abatidos (POETA *et al.*, 2008)

Na Bélgica o uso de normas profiláticas adequadas, praticamente erradicou a Leucose Enzoótica dos Bovinos de seus rebanhos, onde taxas de prevalência como a encontrada por MAMMERICKX *et al.* (1978), de 28,57% (90/315), reduziram-se, atualmente, a índices praticamente nulos, não sendo oficialmente registrados casos entre 2007 e 2011 (OIE, 2011).

A Finlândia, aproveitando a baixa prevalência da LEB, que nunca superou os 5%, adotou um programa de controle e erradicação a partir de 1991 que consistiu, dentre outras medidas: no sacrifício de animais positivos e de bezerros nascidos de vacas infectadas, na interdição da propriedade até a destruição dos animais infectados e considerando propriedades livres aquelas sem sinais clínicos e sorológicos durante dois anos. Como resultado, entre 1997 e 2001 a Finlândia não registrou casos da doença em seus rebanhos leiteiros e de carne (NUOTIO *et al.*, 2003).

A LEB vem sendo registrada também em países asiáticos como Iran, Israel, Japão e Coreia (OIE, 2011). Dentre esses países, destacam-se Iran e Japão pelas marcantes prevalências de 29% e 28%, respectivamente. Estudos realizados no Iran ressaltaram que rebanhos em situação sanitária precária e com elevada densidade populacional apresentaram uma maior prevalência em relação aos rebanhos não submetidos a essas situações (MOHAMMADI *et al.*, 2011; MURAKAMI *et al.*, 2011).

No Canadá, estudo realizado em 2000 na região leste do país envolvendo 2.604 vacas leiteiras, identificou anticorpos séricos em 70% das propriedades e em 20,8% dos animais. Foram considerados rebanhos positivos aqueles que apresentaram pelo menos

um animal positivo. Nos rebanhos positivos a prevalência média foi de 30,9% (VANLEEuwEN *et al.*, 2001).

No México Suzan *et al.* (1983) examinaram bovinos pertencentes a 452 rebanhos e obtiveram taxas de prevalência de 36,1% (541/1.498), nos rebanhos leiteiros e de 4,0% (51/1.271), nos rebanhos de corte.

Na América Central, a ocorrência da Leucose Enzoótica dos bovinos foi detectada na Costa Rica, onde Ducreux *et al.* (1987), em 34 rebanhos, determinaram uma taxa de prevalência global de 2,5% (23/938), sendo 1,4% (13/902) e 27,8% (10/36) as taxas encontradas, respectivamente, em 30 rebanhos de corte e quatro leiteiros.

Na América do Sul, destacam-se os levantamentos soro-epidemiológicos da Leucose Enzoótica realizados na Venezuela, Argentina, Colômbia e Brasil.

Na Venezuela, Marin *et al.* (1978) apresentaram um amplo estudo epidemiológico, realizado em várias regiões do país, verificando uma taxa global de 34,3% (5.837/17.029), sendo de 49,1% (3.967/8.081), no gado leiteiro e de 20,9% (1.870/8.948), no gado de corte.

Trono *et al.* (2001) ao analisar 10.432 amostras séricas de 363 rebanhos leiteiros na Argentina identificaram uma prevalência individual de 32,85% dos bovinos infectados, e 84% dos rebanhos analisados apresentaram pelo menos um animal infectado pelo VLB. Estes resultados evidenciam uma intensidade média de animais soropositivos, porém, uma elevada prevalência de rebanhos infectados, que vem crescendo nos últimos 15 anos, indicando que o VLB deve ser considerado com um sério problema sanitário nos rebanhos leiteiros da Argentina (TRONO *et al.*, 2001).

Na Colômbia, a taxa de prevalência da infecção pelo VLB foi menor do que as referidas até aquele momento na América do Sul com 49,3% dos rebanhos (36/73) apresentando animais infectados e taxa de prevalência de 14,5% (97/670) (PEÑA *et al.*, 1985).

Dados sobre a prevalência da LEB na Bolívia são escassos, porém, estudo realizado por Lopez *et al.* (2010) demonstra que o país apresenta prevalência de 29%, equivalente a zonas endêmicas como Argentina e Brasil.

No Brasil, a avaliação da prevalência da infecção pelo VLB foi iniciada nos rebanhos dos estados da Região Sudeste do país, por Alencar Filho (1979) que detectou

anticorpos anti-VLB através da prova de imunodifusão em gel de ágar, em rebanhos leiteiros criados em São Paulo, com taxa de prevalência de 60,0% (24/40). A seguir, Alencar Filho *et al.* (1979), encontraram taxa de prevalência de 35,6% (361/1.013); nos rebanhos onde relatava-se a ocorrência de formas clínicas caracterizadas por neoplasias a taxa de prevalência variava de 40 a 80,0%; a taxa de prevalência em rebanhos de bovinos da raça Holandesa (puros ou cruzados) foi igual a 44,8% (184/411); em animais de outras raças de origem européia a taxa foi 34,1 (123/361); os zebuínos das raças Nelore, Guzera e Gir, apresentaram taxa menor - 28,6% (4/14). Birguel Junior (2006), identificou em animais da raça Simental, criados no estado de São Paulo, uma prevalência de 9,24% (44/476), onde 85% (6/7) das propriedades analisadas apresentaram animais reagente ao VLB.

Birgel *et al.* (1988a,b), ao realizarem inquérito sorológico para avaliar a prevalência da infecção pelo VLB em bovinos leiteiros criados no estado de São Paulo, determinaram taxas de prevalência de 52,6% (243/462) em amostras colhidas na bacia leiteira de Campinas-SP e 44,9% (774/1.722), em amostras procedentes de 16 municípios do mencionado estado. Estudo semelhante, voltado para a ocorrência da LEB na microrregião de Botucatu, ainda no estado de São Paulo, revelou 52% (620 / 1.193) dos animais positivos, onde desses, 94,7% eram animais da raça Holandesa (MEGID *et al.*, 2003).

Birgel Júnior *et al.* (1990) obtiveram 45,3% (393/868) como taxa de prevalência global para a infecção pelo VLB em rebanhos bovinos da raça Jersey criados em diversos municípios paulistas, sendo: 38,9% (35/90), 11,8% (8/68) e 15,5% (13/84), respectivamente, em bezerros com idade de até três meses, entre 3 e 6, 6 e 12 meses; nas novilhas e garrotes, com idade variando de 12 e 24 meses, a taxa de prevalência foi de 22,8% (31/136); em animais com 24 a 48 meses de idade, 46,0% (81/176); em animais com idade entre 48 e 72 meses, 65,0% (89/137) e nos animais com idade maior do que 72 meses, 86,4% (108/125), a taxa de prevalência obtida nas fêmeas (47,1% - 360/764) foi expressivamente maior do que a observada nos machos (9,6% - 5/52).

D'angelino (1991), avaliou a performance produtiva e reprodutiva de bovinos infectados e não infectados pelo VLB em um rebanho produtor de leite B, em Campinas, São Paulo, estabelecendo em quatro oportunidades, prevalências de 54,8% (114/208), 53,2% (158/297), 53,5% (138/258) e 52,6% (113/215), respectivamente no

período de 1980 a 1989 que formaram um índice global de 53,5% (523/978) de bovinos reagentes, destacando que vacas com anticorpos anti-VLB apresentaram uma média diária de produção leiteira significativamente menor (11%) quando comparadas com as não reagentes, sendo essa a dinâmica produtiva predominante com o desenvolvimento etário ou aumento de lactações das vacas.

No Estado do Rio de Janeiro, Romero e Rowe (1981) detectaram uma taxa de prevalência da infecção pelo VLB de 53,3% (769/1.444), com prevalência de soro-reagentes ligeiramente maior nas fêmeas (54,3%) do que nos machos (42,2%); destacando-se, ainda, que a prevalência de animais sororreagentes foi diretamente proporcional ao desenvolvimento etário.

No Estado de Minas Gerais, Modena (1981) realizou inquérito soropidemiológico prospectivo em um rebanho com antecedentes clínicos de Leucose Enzoótica dos Bovinos, constituído por 230 animais da raça Holandesa, entre os quais, alguns bovinos importados; a taxa de prevalência global foi de 70,9% (163/230) e, ao ser estudada a evolução da dinâmica sérica dos anticorpos anti-VLB durante o desenvolvimento etário, constatou-se que na maioria dos bezerros de vacas positivas (83,3% - 10/12) houve desaparecimento dos anticorpos, passivamente transferidos pelo colostro, em até 180 dias. Modena *et al.* (1983) estudaram a ocorrência da infecção pelo VLB em um lote de 40 vacas prenhes, com idade variando entre 18 e 35 meses, procedente de um rebanho de 100 animais recém-importado dos Estados Unidos e Canadá. Destes animais, importados com o objetivo de promover o melhoramento genético do rebanho nacional, 12,5% (5/40) eram reagentes ao antígeno glicoproteico do VLB, no momento da chegada ao Brasil e, cinco meses após, mesmo mantidos em condições de isolamento, o índice de animais soro-reagentes aumentou para 80,0% (28/35). Foi atribuído o aumento do referido índice ao longo período de incubação do VLB e conseqüente soro-conversão, de forma lenta, dos animais que tinham se infectado no país de origem, antes da exportação.

Leite *et al.* (1984), complementando os estudos clínico-epidemiológicos iniciados por Modena (1981) e Modena *et al.* (1983), verificaram que 1,7% (4/230) dos animais do rebanho anteriormente descrito apresentaram a forma neoplásica da Leucose Enzoótica; observaram também o aumento das taxas de prevalência com o desenvolvimento etário.

Modena *et al.* (1984) concluíram que, provavelmente, a LEB encontra-se distribuída em todas as regiões do estado de Minas Gerais e que a taxa de prevalência da infecção dos bovinos criados em oito regiões deste estado foi de 26,7% (781/2.926), sendo de 40,7% (519/ 1.274) em rebanhos leiteiros e 15,4% (254/1.652) em rebanhos de corte. Estes resultados foram confirmados por SANTOS *et al.* (1985) em 317 amostras de soro de bovinos procedentes de rebanhos criados em sete regiões deste Estado. A taxa de prevalência da infecção pelo VLB referida nesta pesquisa foi de 28,4% (90/317), alcançando em um rebanho o valor de 52,4%.

A correlação entre biotecnologia da reprodução e a infecção dos bovinos pelo VLB, foi investigada por Castro (1988), ao determinar a prevalência da mencionada infecção em vacas doadoras e receptoras de embriões, procedentes de 11 rebanhos mineiros. A taxa global de prevalência na população de vacas estudadas foi de 23,0% (104/451): sendo 30,8% (40/130) no grupo de doadoras e 19,9% (64/321) no de receptoras; comprovando a ampla disseminação da infecção pelo VLB numa amostragem representativa da população de vacas utilizadas nos processos de transferência de embriões em Minas Gerais. Foram ainda ressaltadas as possíveis conseqüências econômicas e sanitárias do comércio de embriões, e a perspectiva desta situação para limitar futuras exportações brasileiras, particularmente para países que possuam exigências sanitárias rigorosas.

Kantek *et al.* (1982) realizaram inquéritos sorológicos para avaliar a infecção pelo VLB em animais criados no estado do Paraná. Nesta oportunidade, em um lote de vacas da raça Holandesa, foi registrada a ocorrência da infecção, com taxa de prevalência de 18,3% (11/60). Kantek *et al.* (1983) avaliaram o número de bovinos portadores de anticorpos anti-VLB, em nove regiões do estado do Paraná. Nos 184 rebanhos examinados, verificou-se que 75 apresentavam animais soro-reagentes (40,8%), com taxa de prevalência de 20,7% (144/ 695), sendo 12,1% (7/58), 21,7% (74/341), 19,0% (44/232) e 29,7% (19/64), respectivamente, as taxas de prevalência da infecção nas faixas etárias de 0 a 24, 25 a 60, 61 a 96 e acima de 96 meses de idade.

Carvalho (1994) estabeleceu em 7% (69/985) a prevalência de anticorpos séricos anti-VLB em bovinos das raças Holandesa criados no pólo regional de Londrina, estado do Paraná, sendo maior nos rebanhos produtores de leite B (27,4%) em relação aos de leite C (8,5%), não encontrando soro-reagentes no gado da raça Nelore.

Estudo realizado por Barros Filho *et al.* (2010) demonstraram uma prevalência de 56,4% (151/268) em animais criados na região metropolitana de Curitiba. Neste estudo também foi observado que dentre os animais positivos, 60,32% eram da raça Jersey, 60% Holandesa Preta e Branca e 22% pardo Suíço, e nenhum animal mestiço, além de demonstrar um aumento significativo da prevalência com o desenvolvimento etário dos animais. Nesse contexto, Barros Filho *et al.* (2010) relacionam a elevada prevalência da LEB em rebanhos leiteiros da região metropolitana de Curitiba à falta de programa de controle para a doença e à falta de informações de técnicos e produtores quanto aos prejuízos do VLB em rebanhos leiteiros.

Gomes *et al.* (1985), no estado do Rio Grande do Sul, demonstraram que a infecção acometia 32,6% (229/702) dos bovinos examinados. Entretanto, estes resultados não foram confirmados por Flores *et al.* (1990), que obtiveram uma taxa de prevalência menor no gado leiteiro examinado, pois, em 639 bovinos adultos, apenas, 91 eram soro-reagentes aos antígenos do VLB (14,2%), embora quase metade dos rebanhos avaliados apresentassem bovinos portadores de anticorpos anti-VLB. A seguir, Flores *et al.* (1990), em amostragem de maior magnitude, obtiveram taxa de prevalência de 20,6% (214/1.038). Nos 106 rebanhos da região central do Rio Grande do Sul, as taxas de prevalência, segundo as faixas etárias foram estudadas: 3 a 4 anos - 22,8% (13/57); 4 a 5 anos - 28,8% (19/66); 5 a 6 anos 26,8% (26/97); 6 a 7 anos - 33,3% (32/96); 7 a 8 anos 47,0% (24/51); 8 a 9 anos - 46,7% (14/30) e mais de 9 anos - 55,1% (27/4). Recentemente, na região Nordeste do estado do Rio Grande do Sul, em 26 rebanhos leiteiros da região foi identificada uma prevalência de 61,5% para o VLB (FRANDOLOSO *et al.*, 2008)

Fernandes *et al.* (2009), ao estudar a soroprevalência da LEB na região norte do estado do Tocantins examinaram 881 amostras séricas, de 38 rebanhos leiteiros e contraram uma prevalência de 37% (326/881). A elevada prevalência observada, foi considerada pelos autores consequência da reformulação pela qual os rebanhos leiteiros da região passaram, para atender as exigência do mercado, e com isso houve uma expressiva e negligente incorporação de animais de áreas endêmicas como Centro-Oeste (Goiás) e Sudeste (São Paulo e Minas), sem critérios sanitários, o que favoreceu a disseminação do VLB.

Távora (1990), avaliando aspectos clínico-epidemiológicos da infecção pelo VLB em gado leiteiro, em rebanhos predominantemente das raças zebuínas, criados no Pólo de Itabuna-BA, estabeleceu a prevalência em 16,1% (174/1.084), maior nas fêmeas (23,0% - 156/678) do que nos machos (4,4% - 18/406), aumentando significativamente com o desenvolvimento etário.

Matos *et al.* (2005) avaliaram a prevalência da LEB em cinco micro-regiões do estado da Bahia, examinando sorologicamente 796 bovinos das raças Jersey, Holandesa, Girolando, Pardo Suíço, Simental e mestiços ou cruzadas, o que resultou em uma prevalência de 41% (326/796) de animais soropositivos ao VLB, onde a maior frequência da infecção ocorreu em animais com mais de 24 meses de idade.

No Ceará, Abreu (1993) descreveu a ocorrência da doença na bacia leiteira de Fortaleza estabelecendo uma prevalência de anticorpos anti-VLB de 10,5% (62/590).

Simões (1988) estabeleceu a prevalência de reagentes na população bovina de 24 rebanhos distribuídos em 12 municípios do Estado da Paraíba, como sendo de 8,3% (65/780).

Melo (1991) estabeleceu em 15,1% (67/443) a prevalência da infecção pelo VLB em rebanhos leiteiros do Agreste Meridional de Pernambuco, apresentando os rebanhos submetidos a manejo de relativa sofisticação tecnológica e que tiveram a introdução de bovinos das regiões Sul e Sudeste do Brasil as maiores taxas de prevalência, associadas progressivamente ao desenvolvimento etário; a raça Holandesa apresentou índices maiores do que bovinos cruzados com predominância de caracteres fenotípicos de raças zebuínas.

Estudo retrospectivo a cerca da situação da LEB no estado de Pernambuco entre 1991 e 2011, demonstrou uma prevalência de 24% (343/1.421), considerada a maior na região Nordeste, e que demonstra o estado de enzootia em que a doença se encontra, com sérios riscos da perpetuação do VLB nos rebanhos leiteiros de Pernambuco (FERNANDES, 2011). Foi observado neste estudo, que a dinâmica da infecção apresentou-se estável entre 1991 (MELO, 1991) e 2003 (TENÓRIO, 2003), com taxas de 15% e 16%, respectivamente, em seguida, recrudescer com taxas de prevalência de 33,4% (MENDES *et al.*, 2008) e 30,9% (MELO *et al.*, 2010).

3.3 Aspectos hematológicos

Diversos autores se dedicaram a entender a dinâmica leucocitária em bovinos de diferentes raças e em diferentes estágios etários. Nestes estudos, preservando-se as peculiaridades raciais, foi observado que, de uma forma geral, nos primeiros meses os leucócitos totais apresentam valores elevados, que tendem a estabilizar aos 12 meses de idade. O perfil leucocitário apresenta predominância de neutrófilos sobre os linfócitos em animais jovens, porém, ocorre a inversão deste quadro com o avançar da idade, atingindo o padrão linfocítico dos bovinos adultos (TENNANT, 1974; ROSAL, 1982; BIRGUEL JUNIOR, 1991; BIONDO, 1996).

Um conceito bastante difundido em hematologia de bovinos é o de que as condições ambientais, climáticas e de manejo interferem significativamente nos constituintes sanguíneos (BIRGUEL JUNIOR, 1991). Nesse sentido, entende-se que devem ser determinados valores padrões de referência para diferentes regiões (ALENCAR FILHO, 1970¹ apud BIRGUEL JUNIOR *et al.*, 2001).

A influência dos fatores etário e edafoclimático evidenciam a importância da determinação de valores de referências regionais, como pode ser observada no relato de Alencar Filho em 1970 (apud BIRGUEL JUNIOR *et al.*, 2001) a cerca da possibilidade de que bovinos infectados com VLB teriam sido importados para São Paulo, após indicação de animais com leucocitose por linfocitose através do uso das chaves leucométricas idealizadas na Europa. Tal situação gerou grande repercussão entre os criadores brasileiros, pela interdição de algumas propriedades pelo Ministério da Agricultura, resultando na vinda de importantes hematologistas como Bendixen e Gaede. Ao analisarem os animais e a situação a que os mesmos estavam submetidos concluíram que as alterações leucométricas observadas eram consequência de variações mesológicas e de influencia de doenças inexistentes no país de origem. Com isso, ficou evidente a inutilidade no Brasil das chaves leucométricas de diagnóstico da LEB utilizadas na Europa, bem como a necessidade de se conhecer valores de referência para bovinos criados no país, para utilização de chaves leucométricas regionais (BIRGUEL JUNIOR, 2001).

¹ ALENCAR FILHO, R. A. Leucograma de bovinos nacionais e estrangeiros com vistas ao estudo da leucose. **O Biológico**, v. 36, n. 7, p. 181-184, 1970.

Nesse contexto, a leucometria pode ser um critério confiável para a detecção precoce dos bovinos infectados pelo VLB, incluindo aqueles importados e já adaptados às condições subtropicais e que, constantemente, são submetidos à influência da premunicação contra os agentes etiológicos da Tristeza Bovina.

Todavia ao se avaliar a necessidade de se conhecer o quadro leucocitário padrão dos bovinos criados no Brasil, elaborando-se chaves leucométricas regionais, Garcia (1989), Birgel et al. (1982), Birgel Junior (1991), Melo et al. (1996a; 1996b), Mendes *et al.* (2002), dentre outros pesquisadores, buscaram reafirmar e consubstanciar os estudos sobre a hematologia da LEB no Brasil.

Garcia (1989) elaborou a chave leucométrica de 797 fêmeas bovinas da raça Holandesa (PB) encontrando nos reagentes à imunodifusão para LEB uma leucometria global de $19.505/\text{mm}^3$ (± 8.998) e nos não reagentes $15.869/\text{mm}^3$ (± 6.113), demonstrando evidente influência da infecção pelo VLB sobre o leucograma dos bovinos examinados. Os valores da linfometria, que também foram afetados pela infecção, foram: $14.233/\text{mm}^3$ (± 8.639) reagentes e $10.844/\text{mm}^3$ (± 5.447) não reagentes.

Birgel Junior (1991) demonstrou que há influência da infecção pelo VLB sobre o leucograma de bovinos da raça Jersey, criados no estado de São Paulo, caracterizada por um quadro de leucocitose por linfocitose, com significativo aumento de linfócitos atípicos do tipo Gumprecht, monocitóide e com núcleo duplo. Os valores da leucometria global (leucócitos/ mm^3 de sangue) em fêmeas adultas clinicamente sadias foram: de $10.564/\text{mm}^3$ (± 1.647) a $11.643/\text{mm}^3$ (± 3597). Linfometria: de $6.857/\text{mm}^3$ (± 1.326) a $8.120/\text{mm}^3$ (± 2.953). Considerando o exame à imunodifusão, o pesquisador encontrou uma leucometria global significativamente superior nos sororeagentes – $15.285/\text{mm}^3$ (± 7148), do que nos não reagentes – $11.704/\text{mm}^3$ (± 3.298). A linfometria revelou que os reagentes, com $12.359/\text{mm}^3$ (± 6.520), apresentaram os valores de seus linfócitos significativamente maiores do que os não reagentes, que apresentaram $8.361/\text{mm}^3$ (± 2.901) células. Predominaram os linfócitos típicos (pequenos sobre os grandes), porém, os sororeagentes apresentaram mais linfócitos atípicos (principalmente gumprecht, monocitóide e núcleo duplo) do que os não reagentes.

Melo *et al.* (1996a; 1996b) estudaram a influência dos fatores sexual e etário e estabeleceram os valores referenciais do leucograma de uma população de 133 bovinos leiteiros, clinicamente sadios, criados no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco. Os

animais eram sororeagentes para o VLB e os valores leucométricos das fêmeas e dos machos foram, respectivamente, $9.927/\text{mm}^3$ (± 316) e $10.142/\text{mm}^3$ (± 570). Predominaram os linfócitos típicos (pequenos sobre os grandes), embora tenham sido observadas várias células atípicas (linfócitos monocitóides, Gumprecht, núcleo duplo e Türk). Os valores linfocitários/ mm^3 de sangue nas fêmeas e nos machos foram, respectivamente, 6.106 ($\pm 67-201$) e 6.728 ($\pm 157-370$).

Mendes *et al.* (2002) avaliaram a interferência do VLB em 265 bovinos leiteiros de rebanhos localizados na Região Metropolitana do Recife e Agreste Pernambucano. Os bovinos reagentes ao VLB apresentaram um valor médio de leucócitos totais de 14.783 (± 7.242) e 10.628 (± 6.403) linfócitos, enquanto que os animais soronegativos apresentaram um valor médio de leucócitos totais de 11.398 (± 3.967) e 7.803 (± 3654) linfócitos. Outra observação foi que 53,8% (21/39) dos bovinos reagente apresentaram leucocitose por linfocitose, enquanto que 35,8% (81/226) dos soronegativos apresentaram o mesmo quadro. Os autores reafirmaram a importância e confiabilidade dos aspectos sorológicos e hematológicos como ferramentas auxiliares para o estabelecimento do diagnóstico precoce da LEB em um indivíduo e/ou rebanho.

A resposta linfoproliferativa do organismo à infecção, denominada linfocitose persistente, representa uma alteração hematológica associada à LEB, sendo conhecida desde o início do século (KNUTH e VOLKMANN, 1916; TOIT, 1916). Este conhecimento permitiu, a partir da década de 50, o estabelecimento das chaves leucométricas (GOTZE *et al.*, 1954), podendo a linfocitose persistente ser definida como um aumento duradouro e com magnitude de até 3 vezes, em valores absolutos, do número de linfócitos, considerando-se como base os padrões de referência para a raça e o grupo etário dos bovinos (INTERNATIONAL COMMITTEE ON BOVINES LEUKOSIS, 1968). Esta alteração deve persistir por mais três meses, em geral, anos, ocorrendo em até 29% dos animais infectados (FERRER *et al.*, 1979). Historicamente a leucocitose por linfocitose tem sido considerada como um importante aspecto clínico da Leucose Enzoótica dos Bovinos (TOIT, 1916, GÖTZE *et al.*, 1954; MAMMERICKX *et al.*, 1976; BIRGEL, 1982; GARCIA, 1989; BIRGEL JÚNIOR, 1991; ERSKINE *et al.*, 2011).

Muscoplat *et al.* (1974) admitiram que os linfócitos infectados pelo VLB são funcionalmente deficientes, quer do ponto de vista imunológico ou metabólico, ressaltando, inclusive, uma hiperatividade de síntese dos linfócitos de vacas acometidas

pela Leucose Enzoótica. Castro *et al.* (1988) afirmaram que bovinos soropositivos, com linfocitose persistente, demonstram aneuploidia com aberrações cromossômicas.

Grimold *et al.* (1983) afirmaram que o aumento de linfócitos, associados à soroc conversão, poderia representar uma resposta linfoproliferativa benigna do organismo à infecção, havendo relação destes resultados com avaliações histopatológicas, que demonstraram, através da microscopia eletrônica, nos linfossarcomas, similaridade entre células neoplásicas e células linfóides imaturas. A resposta ou reação orgânica do animal infectado e, conseqüentemente, a manifestação clínica, dependerá da condição imunológica individual e da localização da tumoração, da velocidade de crescimento e do grau de disseminação do processo neoplásico, não havendo modificação da resistência orgânica com o aumento da idade. Os casos clínicos caracterizados por linfossarcomas, que constituem massas neoplásicas de grande poder de infiltração, têm ocorrência significativamente menor do que a relacionada com a taxa de prevalência dos animais que apresentam anticorpos anti-VLB; descreveram-se, inclusive, atuações de rebanhos infectados que nunca apresentaram casos de linfossarcoma, podendo-se, entretanto, afirmar-se que até 10% dos bovinos infectados desenvolvem neoplasias no decurso de suas vidas (FERRER *et al.*, 1979; ALENCAR FILHO *et al.*, 1979; SAMAGH e KELLAR, 1982).

Atualmente, a linfocitose persistente em bovinos infectados com o VLB vem sendo considerada, por alguns autores, como uma estratégia do próprio retrovírus que interfere no processo de apoptose celular resultando na permanência do vírus no hospedeiro (GURTLER *et al.*, 2009; ERSKINE *et al.*, 2011).

Apesar do tropismo do VLB pelos linfócitos B, há indícios de que o vírus também o tenha por outras células do sistema imunológico, como as da linhagem monócito-macrófago (HEENEY *et al.*, 1992; DOMENECH *et al.*, 2000). Além da utilização dessas células, pelos vírus como reservatório, foram identificadas alterações na atividade fagocítica e no metabolismo oxidativo das mesmas, o que demonstra o comprometimento funcional deste grupo celular (DOMENECH *et al.*, 2000; AZEDO *et al.*, 2008; AZEDO *et al.*, 2011).

3. Metodologia

3.1 Caracterização da amostra

O universo amostral deste estudo foi definido com base em sucessivos ensaios de campo, realizados no período de 2002 a 2011, para estimar a prevalência da LEB e da TB, em conformidade com os procedimentos preconizados por Astudillo (1979).

$$n' = \frac{p(100-p)g^2}{(\rho\alpha/100)^2}$$

Em que: n' = número de amostras a serem testadas em uma população infinita;

p = taxa de prevalência estimada da enfermidade em questão;

g = fator determinante do grau de confiança ($1,962 \cong 4$);

α = margem de erro admissível.

Admitindo-se que a prevalência da TB na população estudada seja menor do que a da LEB tomou-se como referência para definir o tamanho da amostra a ser trabalhada a prevalência estimada da TB em 11%, com uma margem de erro de 20% e depositando nos resultados um grau de confiança de 95%. Desta forma, obteve-se que:

$$n' \cong 809 \text{ amostras}$$

Com o propósito de aumentar a confiança nos resultados foram submetidas ao sorodiagnóstico para LEB amostras de 1.000 bovinos procedentes de 33 rebanhos, sendo 920 deles submetidos previamente ao teste da tuberculina (Teste Cervical Comparativo - TCC). Em aproximadamente 70% (694/1000) dos bovinos foram realizadas análises leucométricas, sendo desconsiderados das mesmas os animais com resultados inconclusivos aos dois testes diagnósticos e os positivos ao teste da tuberculina.

Os rebanhos foram selecionados em função da homogeneidade do sistema de produção, onde predominava o regime semi-extensivo, da semelhança nas condições edafo-climáticas e da alta rotatividade de animais. Foram considerados na amostragem apenas bovinos adultos, com idade entre 4 a 10 anos, com aptidão leiteira e predominância do padrão fenotípico da raça Girolanda. Os mesmos localizavam-se nos seguintes municípios do estado de Pernambuco: Arcoverde, Belo Jardim, Bom

Conselho, Brejo da Madre de Deus, Caetés, Camaragibe, Canhotinho, Correntes, Garanhuns, Gravatá, Iati, Jaboatão dos Guararapes, Lajedo, Nazaré da Mata, Paudalho, Recife, Sanharó, São João, São José do Egito, São Lourenço da Mata, Serrinha, Tacaimbó, Terezinha e Vitória de Santo Antão.

As amostras sanguíneas foram processadas e examinadas no Laboratório de Pesquisa em Clínica de Grandes Animais, do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

3.2 Diagnóstico da Tuberculose Bovina

O teste da tuberculina foi aplicado como teste diagnóstico e de triagem, sendo desconsideradas das análises leucométricas as amostras procedentes de animais reagentes para se evitar uma possível interferência da tuberculose bovina (TB) no leucograma dos bovinos.

Os animais foram submetidos ao Teste Cervical Comparado (TCC), seguindo as normas estabelecidas no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT (BRASIL, 2006).

3.3 Diagnóstico da Leucose Enzoótica dos Bovinos

As amostras sorológicas foram submetidas ao Teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) para pesquisa de anticorpos séricos específicos anti-VLB. Utilizou-se a técnica da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony, em conformidade com os procedimentos classicamente preconizados (MILLER e VAN DER MAATEN, 1975; MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; BIRGEL *et al.*, 1982). Consistiu basicamente em um substrato de difusão gelatinoso, utilizando o antígeno glicoprotéico (gp 51)², extraído do envelope do Vírus da Leucose Bovina(VLB). Uma vez montado o sistema da imunodifusão, a leitura era realizada 72 horas após, utilizando incidência de luz artificial (lanterna) na porção inferior da placa de petri, sendo consideradas sororreagentes as amostras que apresentarem linha de precipitação na zona de contato antígeno-anticorpo idênticas as estabelecidas entre os poços controle e antígeno.

² Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR.

3.4 Análises leucométricas

Os leucogramas dos bovinos considerados neste estudo foram confeccionados utilizando-se métodos e técnicas classicamente publicados na literatura (FERREIRA NETO *et al.*, 1978; BIRGEL *et al.*, 1982; COLES, 1984; JAIN, 1993).

Inicialmente, para a contagem dos leucócitos totais foi adicionado 0,4 mililitros do líquido de Turk em tubos de cinco mililitros; após homogeneização da amostra de sangue, aspirou-se o mesmo com a pipeta automática de 20 microlitros, para então colocá-lo no tubo contendo o líquido de Turk; posteriormente procedeu-se o preenchimento da câmara de Neubauer. Após breve repouso do sistema montado, contaram-se os leucócitos contidos nos quatro milímetros angulares da câmara. O valor encontrado foi multiplicado por 50^3 e expresso o resultado em leucócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$ de sangue.

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada confeccionando-se esfregaços sanguíneos dos bovinos examinados. A técnica utilizada foi a de coloração rápida empregando-se o conjunto de corantes Instant Prov⁴, que é um corante panóptico para coloração diferencial dos elementos figurados do sangue (COLES, 1984).

Procedimentos: as lamínas foram submersas, uma a uma, no corante Instant prov I, pelo tempo de 15 segundos; em seguida, de forma semelhante, foram submersas sucessivamente no Instant prov II (por 10 segundos) e no Instant prov III (por 20 segundos). Finalmente, os esfregaços corados foram submetidos à lavagem em água corrente, estando preparadas para serem lidas.

3.5 Constituição dos grupos experimentais

Com o objetivo de avaliar a influência do VLB nos leucócitos e em função dos resultados obtidos nos testes diagnósticos (TCC e IDGA), 530 amostras⁵ foram efetivamente consideradas para a realização dos leucogramas, sendo as mesmas distribuídas em dois grupos experimentais:

- GI – leucograma de 379 bovinos não portadores de anticorpos anti-VLB (soronegativos) – grupo controle.

³ Fator de Multiplicação = $PC \times D \setminus AC = 10 \times 20 \setminus 4$; PC = Profundidade da Câmara (10); D = Diluição (1:20) e AC = Área Contada (4).

⁴ Newprov Produtos para Laboratório Ltda.

⁵ Foram considerados bovinos reagentes à IDGA e não reagentes ao TCC, sendo desconsiderados os animais reagentes ao TCC e inconclusivos aos dois testes diagnósticos.

- GII – leucograma de 151 bovinos portadores de anticorpos anti-VLB (soropositivos);

Para efeito da análise dos grupos experimentais foi considerado um animal portador de Leucocitose por Linfocitose (LL), aquele que apresentou valor acima do intervalo de confiança da média, com base no grupo controle. Posteriormente foi avaliada a participação de animais com valores leucométricos acima do limite tolerável (desvio padrão) apresentado pelo grupo controle, dentre os animais portadores de LL.

3.6 Análises estatísticas dos resultados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas SPSS 15.0 for Windows Evolution Version (Teste *t* de Student) e o Microsoft Office Excel 2007 (Teste de Aderência pelo Qui-quadrado, segundo distribuição Poisson) (SAMPAIO, 2007).

O teste *t* de Student foi aplicado em duas situações: 1) Para analisar a associação entre ser portador de anticorpos anti-VLB e apresentar alterações linfocitárias; e 2) Para estabelecer o intervalo de confiança das médias leucométricas. Sempre considerando um grau de confiança de 95%.

O teste de aderência pelo qui-quadrado foi aplicado para estabelecer o intervalo de confiança dos leucócitos dos bovinos (individual). Neste caso, testou-se a possibilidade de haver semelhança entre a distribuição de frequência dos leucócitos observada na amostragem e a frequência esperada segundo o modelo de Poisson. Através do teste de aderência utilizando o modelo estatístico citado foi possível estabelecer, com 95% de confiança, o intervalo de confiança dos leucócitos de um animal submetido às condições relatadas neste estudo.

4 Resultados e discussão

4.1 Relacionados à prevalência da LEB e TB

Os ensaios da prevalência da LEB e da TB demonstraram que das 1.000 amostras submetidas ao sorodiagnóstico da LEB, 282 (28%) reagiram positivamente, enquanto que em relação à TB, dos 920 bovinos submetidos ao teste da tuberculina 99 (12%) reagiram positivamente (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Distribuição da taxa de prevalência de vacas reagentes à IDGA para o diagnóstico da LEB em rebanhos leiteiros do Estado de Pernambuco. Recife, 2012.

| <i>Rebanhos</i> | <i>Municípios</i> | <i>Resultados da IDGA</i> | | | <i>Total</i> |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|--------------|
| | | <i>Positivos (%)</i> | <i>Suspeitos (%)</i> | <i>Negativos (%)</i> | |
| R1 | Paudalho | 47 (38,8) | - | 74 (61,1) | 121 |
| R2 | Arcoverde | 12 (32) | - | 26 (68,4) | 38 |
| R3 | Arcoverde | 1 (8) | - | 12 (92,3) | 13 |
| R4 | Arcoverde | 2 (33,3) | - | 4 (67,0) | 6 |
| R5 | Arcoverde | 1 (50) | - | 1 (50,0) | 2 |
| R6 | Belo Jardim | 19 (59,4) | - | 13 (40,6) | 32 |
| R7 | Arcoverde | 1 (20) | - | 4 (80) | 5 |
| R8 | Arcoverde | 1 (14,3) | - | 6 (86,0) | 7 |
| R9 | Arcoverde | 4 (31) | - | 9 (69,2) | 13 |
| R10 | Arcoverde | 0 (0,0) | - | 7 (100) | 7 |
| R11 | Camaragibe | 19 (35,2) | - | 35 (65,0) | 54 |
| R12 | Recife | 2 (16,7) | - | 10 (83,3) | 12 |
| R13 | Camaragibe | 15 (22,4) | - | 52 (78,0) | 67 |
| R14 | Serrinha | 22 (48,9) | - | 23 (51,1) | 45 |
| R15 | Canhotinho | 0 (0,0) | - | 17 (100) | 17 |
| R16 | Canhotinho | 8 (24,2) | - | 25 (76,0) | 33 |
| R17 | Vitória de Santo Antão | 0 (0,0) | - | 31 (100) | 31 |
| R18 | Belo Jardim | 48 (47,5) | - | 46 (45,5) | 94 |
| R19 | Belo Jardim | 5 (45,4) | 2 (18,2) | 4 (36,4) | 11 |
| R20 | Gravatá | 17 (24,6) | 9 (13) | 43 (62,3) | 69 |
| R21 | Nazaré da Mata | 2 (15,4) | 0 (0,0) | 11 (84,6) | 13 |
| R22 | Belo Jardim | 8 (20) | 1 (2,5) | 31 (77,5) | 40 |
| R23 | Belo Jardim | 7 (35) | 1 (5) | 12 (60) | 20 |
| R24 | Tacaimbó | 5 (25) | 0 (0,0) | 15 (75) | 20 |
| R25 | Ipojuca - Arcoverde | 4 (28,6) | 0 (0,0) | 10 (71,4) | 14 |
| R26 | São Lourenço da Mata | 4 (30,8) | 1 (7,7) | 8 (61,5) | 13 |
| R27 | Tacaimbó | 5 (25,0) | 1(5,0) | 14 (70,0) | 20 |
| R28 | Sanharó | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 20 (100,0) | 20 |
| R29 | Jaboatão dos Guararapes | 2 (16,6) | 0 (0,0) | 10 (83,4) | 12 |
| R30 | Brejo da Madre de Deus | 1 (4,0) | 0 (0,0) | 26 (96,0) | 27 |
| R31 | Vitória de Santo Antão | 9 (36,0) | 0(0,0) | 16 (64,0) | 25 |
| R32 | São José do Egito | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 60 (100) | 60 |
| R33 | Camaragibe | 11 (28,0) | 4 (10,0) | 24 (61,0) | 39 |
| <i>Total (%)</i> | | 282 (28) | 19 (2) | 699 (70) | 1000 |

Tabela 2 - Distribuição da taxa de prevalência de vacas reagentes à tuberculinização em rebanhos leiteiros do Estado de Pernambuco. Recife, 2012.

| <i>Rebanhos</i> | <i>Municípios</i> | <i>Resultados da tuberculinização</i> | | | <i>Total</i> |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------|----------------------|------------------------|-------------------|
| | | <i>Positivos (%)</i> | <i>Suspeitos (%)</i> | <i>Negativos (%)</i> | |
| R1 | Paudalho | 36 (30) | 17 (14,0) | 68 (56,2) | 121 |
| R2 | Arcoverde | 10 (26,3) | 5 (13,1) | 23 (60,5) | 38 |
| R3 | Arcoverde | 2 (15) | 4 (31,0) | 7 (53,8) | 13 |
| R4 | Arcoverde | 2 (33,3) | 1 (17,0) | 3 (50) | 6 |
| R5 | Arcoverde | 0 (0) | 0 (0,0) | 2 (100) | 2 |
| R6 | Belo Jardim | 1 (3,1) | 2 (6,25) | 29 (91,0) | 32 |
| R7 | Arcoverde | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 5 (100) | 5 |
| R8 | Arcoverde | 0 (0,0) | 0 (0) | 7 (100) | 7 |
| R9 | Arcoverde | 0 (0,0) | 2 (15,3) | 11 (85,0) | 13 |
| R10 | Arcoverde | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 7 (100) | 7 |
| R11 | Camargibe | 0 (0,0) | 6 (11,1) | 48 (88,9) | 54 |
| R12 | Recife | 1 (8,3) | 2 (16,7) | 9 (75) | 12 |
| R13 | Camargibe | 12 (17,9) | 0 (0,0) | 55 (82,0) | 67 |
| R14 | Serrinha | 9 (20) | 0 (0,0) | 36 (80) | 45 |
| R15* | Canhotinho | - | - | - | - |
| R16* | Canhotinho | - | - | - | - |
| R17 | Vitória de Santo Antão | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 31 (100) | 31 |
| R18 | Belo Jardim | 11 (10,9) | 11 (10,9) | 79 (78,2) | 101 |
| R19 | Belo Jardim | 0 (0,0) | 1 (9,09) | 10 (90,9) | 11 |
| R20 | Gravatá | 2 (2,89) | 5 (7,25) | 62 (89,85) | 69 |
| R21 | Nazaré da Mata | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 13 (100) | 13 |
| R22 | Belo Jardim | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 40 (100) | 40 |
| R23 | Belo Jardim | 0 (0,0) | 1 (5) | 19 (95,0) | 20 |
| R24 | Tacaimbó | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 20 (100) | 20 |
| R25 | Ipojuca - Arcoverde | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 14 (100) | 14 |
| R26 | São Lourenço da Mata | 2 (15,4) | 0 (0,0) | 11 (84,6) | 13 |
| R27 | Tacaimbó | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 20 (100) | 20 |
| R28 | Sanharó | 3 (15,0) | 3 (15,0) | 14 (70,0) | 20 |
| R29* | Jaboatão dos Guararapes | - | - | - | - |
| R30 | Brejo da Madre de Deus | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 27 (100,0) | 27 |
| R31* | Vitória de Santo Antão | - | - | - | - |
| R32 | São José do Egito | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 60 (100) | 60 |
| R33 | Camargibe | 8 (20,0) | 8 (20,0) | 23 (59,0) | 39 |
| <i>Total (%)</i> | | <i>99 (11)</i> | <i>68 (7)</i> | <i>753 (82)</i> | <i>920</i> |

* rebanhos R15, R16, R29 e R31 não foram tuberculinizados.

O resultado da IDGA demonstrou a situação de enzootia em que a LEB se encontra nos rebanhos leiteiros examinados, onde a ampla maioria deles (81% - 27/33) deve ser considerada focos de infecção apresentando em conjunto 28% (282/1.000) dos bovinos VLB positivos.

Ao avaliar historicamente a situação da LEB no estado nos últimos 20 anos, observa-se sua expansão desenfreada de um patamar de 15% (MELO, 1991; TENÓRIO,

2002), perpassando por 33,4% (MENDES *et al.*, 2008), aos valores consubstanciados neste estudo.

Analisando a postura de países como Finlândia (NUOTIO *et al.*, 2003), Lituânia (ACAITE *et al.*, 2007) e Portugal (POET *et al.*, 2008), dentre outros, que adotaram programas de controle e erradicação da LEB, faz-se necessário reconhecer a importância e necessidade da implantação de programas sanitários específicos para o Brasil, sobretudo no estado de Pernambuco.

Em relação à tuberculose, a prevalência de 11% (99/920) para o estado de Pernambuco, quando comparada aos registros anteriores de 15,2% (MENDES *et al.*, 2008) e 11,5% (MELO *et al.*, 2010), representa uma magnitude expressiva, tão preocupante quanto à situação da LEB no estado, principalmente em se tratando de uma zoonose com grande impactação na saúde pública.

4.2 Relacionados às análises leucométricas

As análises leucométricas realizadas nas 530 amostras resultaram nos seguintes valores globais médios: leucócitos totais = $12,0 \pm 4,7$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$), linfócitos = $8,1 \pm 5,4$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$), neutrófilos segmentados = $3,0 \pm 2,3$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$), eosinófilos = $0,8 \pm 0,8$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$), bastonetes = $0,1 \pm 0,2$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e monócitos = $0,2 \pm 0,3$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$).

Considerando os grupos experimentais em relação aos resultados obtidos através da IDGA e das análises leucométricas foram obtidos os seguintes resultados em valores médios: GI (soronegativos) - leucócitos totais = $11,5 \pm 3,8$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e linfócitos = $7,6 \pm 5,1$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$); GII (soropositivos) - leucócitos totais = $13,3 \pm 6,3$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e linfócitos = $9,1 \pm 5,9$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$), estando os leucogramas dos dois grupos experimentais consolidados na tabela 3. Depreende-se desses resultados que os valores médios dos leucócitos totais e linfócitos do GI foram significativamente menores ($p < 0,05$) do que os do GII.

Tabela 3 - Valores leucométricos médios de bovinos soronegativos e soropositivos à IDGA. Recife, 2012.

| Grupos Experimentais | Leucócitos Totais* | Linfócitos* | Segmentados* | Eosinófilos* | Bastonetes* | Monócitos* |
|----------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| GI (379/530) | 11,5 ($\pm 3,8$) a | 7,6 ($\pm 5,1$) a | 3,2 ($\pm 2,9$) a | 0,8 ($\pm 0,8$) a | 0,1 ($\pm 0,2$) a | 0,2 ($\pm 0,3$) a |
| GII (151/530) | 13,3 ($\pm 6,3$) b | 9,1 ($\pm 5,9$) b | 3,1 ($\pm 2,3$) a | 0,9 ($\pm 0,8$) a | 0,1 ($\pm 0,2$) a | 0,2 ($\pm 0,3$) a |

GI = bovinos soronegativos (grupo controle); GII = bovinos soropositivos. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entres os grupos. *Valores médios de leucócitos totais e linfócitos expressos em células $\times 10^3/\text{mm}^3$.

A diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos GI (soronegativos) e GII (soropositivos), observada na tabela 3, evidencia a interferência do VLB elevando a contagem de leucócitos totais dos bovinos soropositivos, por influência direta dos linfócitos, como citado por Ferrer *et al.* (1979), Dequiedt *et al.* (1998), Mendes *et al.* (2002) e Nicolas Gillet (2007). Os demais tipos celulares não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais.

Dequiedt (1998) coloca a proliferação sem controle de linfócitos infectados como consequência da perturbação da homeostase celular, definida como resultado da relação crítica entre proliferação celular e apoptose. Associam-se este quadro de linfoproliferação à capacidade de células infectadas “escaparem” da apoptose, estando este fenômeno associado a fatores genéticos do hospedeiro (GURTLER *et al.*, 2009; ERSKINE *et al.*, 2011).

Ainda sobre o efeito do VLB no leucograma dos bovinos, depreende-se da figura 1 que os bovinos soropositivos (GII) apresentaram valores médios de leucócitos totais ($13,3 \times 10^3/\text{mm}^3$) e linfócitos ($9,1 \times 10^3/\text{mm}^3$) acima do intervalo de confiança da média da população estudada, evidenciando a marcante interferência do VLB sobre o leucograma dos bovinos examinados.

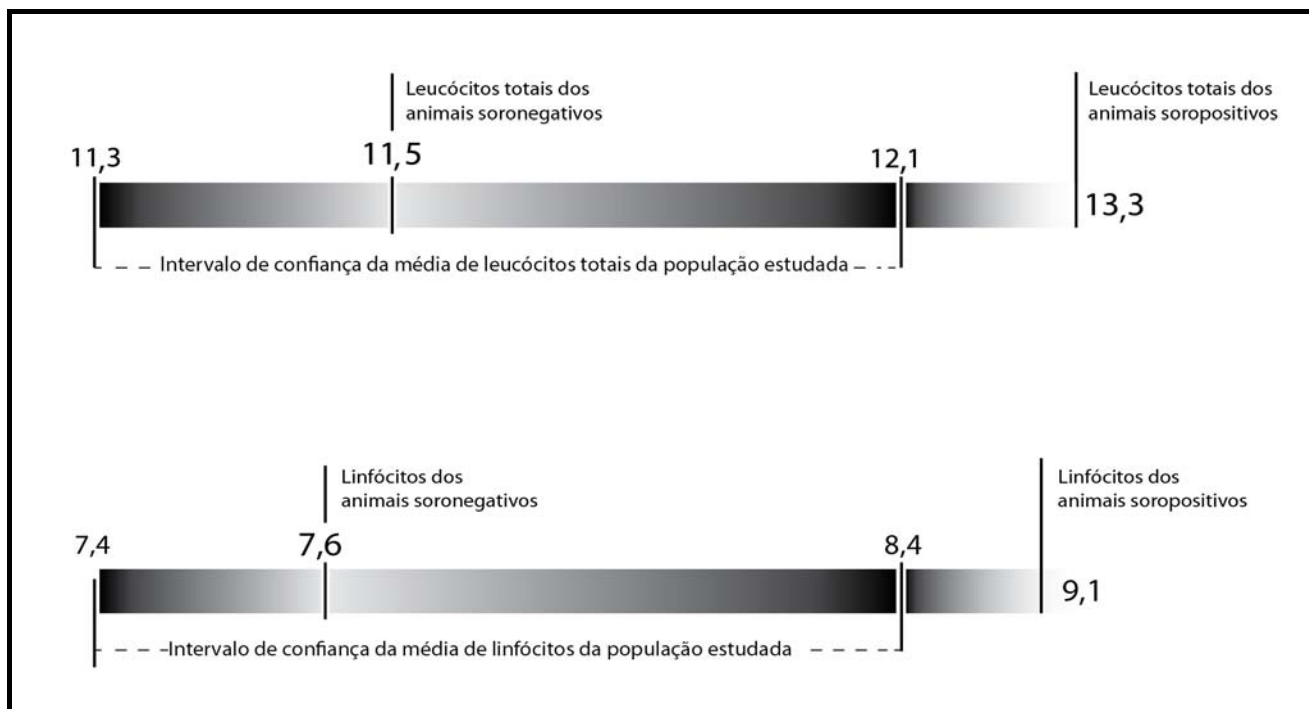


Figura 1 – Avaliação dos valores médios de leucócitos totais e linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) dos animais soronegativos e soropositivos em relação aos intervalos de confiança para a população estudada.

Com o objetivo de caracterizar leucocitose por linfocitose (LL) na população estudada, tomou-se como referência os valores leucométricos do GI (soronegativos), cujo intervalo de confiança da média⁶ foi de $11,3 \times 10^3/\text{mm}^3$ a $12,1 \times 10^3/\text{mm}^3$ leucócitos totais e $7,4 \times 10^3/\text{mm}^3$ a $8,4 \times 10^3/\text{mm}^3$ linfócito. Desta forma, bovinos com valores acima de $12,1 \times 10^3/\text{mm}^3$ leucócitos totais e $8,4 \times 10^3/\text{mm}^3$ linfócitos foram considerados portadores de LL. Posteriormente, foram considerados entre os portadores de LL os bovinos com valores acima do limite tolerável, também com base no GI, apresentando valores acima de $15,3 \times 10^3/\text{mm}^3$ leucócitos totais e $12,7 \times 10^3/\text{mm}^3$ linfócitos.

A análise dos resultados leucométricos associados à IDGA, considerando os animais portadores de LL, demonstrou que os valores médios de leucócitos nos grupos experimentais foram: GI (soronegativos) - leucócitos totais = $15,9 \pm 3,1$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e linfócitos = $12,1 \pm 8,0$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$); GII (soropositivos) - leucócitos totais = $18,6 \pm 6,5$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e linfócitos = $14,0 \pm 6,7$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$) (Tabela 4). A análise desses resultados demonstrou que os valores médios de leucócitos totais e linfócitos dos bovinos do GI, foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) em relação aos do GII.

Tabela 4 – Frequência e valores médios de leucócitos totais e linfócitos dos animais considerados portadores de Leucocitose por Linfocitose. Recife, 2012.

| Grupos Experimentais | Leucócitos Totais* | Linfócitos* |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| GI (26% - 99/379) | 15,9 ($\pm 3,1$) a | 12,1 ($\pm 8,0$) a |
| GI (40% - 60/151) | 18,6 ($\pm 6,5$) b | 14,0 ($\pm 6,7$) b |

GI = bovinos soronegativos (grupo controle); GII = bovinos soropositivos. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entres os grupos. *Valores médios de leucócitos totais e linfócitos expressos em células $\times 10^3/\text{mm}^3$.

Os bovinos portadores de LL foram avaliados, ainda, levando-se em consideração aqueles com valores de leucócitos totais e dos linfócitos acima do limite tolerável, estabelecido com base no grupo controle. Os resultados obtidos foram: GI - leucócitos totais = $19,9 \pm 3,5$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e linfócitos = $15,8 \pm 3,9$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$); GII - leucócitos totais = $23,2 \pm 7,4$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e linfócitos = $19,2 \pm 7,4$ ($\times 10^3/\text{mm}^3$). Nesta situação, embora não tenha sido observada diferença significativa entre os grupos

⁶ Determinado pelo teste *t* de Student

experimentais (Tabela 5), constatou-se que 43% (26/60) dos animais do GII apresentaram valores acima do limite tolerável, enquanto que 19% (19/99) dos bovinos do GI apresentaram esta disfunção linfoproliferativa.

Tabela 5 - Frequência e valores médios de leucócitos totais e linfócitos dos animais portadores de LL, que apresentaram valores acima do limite tolerável. Recife, 2012.

| Grupos Experimentais | Leucócitos Totais * | Linfócitos * |
|----------------------|---------------------|----------------|
| GI (19% - 19/99) | 19,9 (± 3,5) a | 15,8 (± 3,9) a |
| GII (43% - 26/60) | 23,2 (± 7,4) a | 19,2 (± 7,4) a |

GI = bovinos soronegativos (grupo controle); GII = bovinos (soropositivos). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entres os grupos. *Valores médios de leucócitos totais e linfócitos expressos em células $\times 10^3 / \text{mm}^3$.

As análises progressivas dos resultados demonstraram, inicialmente, que 30% (159/530) dos animais examinados apresentaram LL. Desses, a maior parte (62% - 99/159) eram soronegativos (GI), enquanto que 38% (60/159) eram soropositivos (GII), como era esperado (Gráfico 1). Por ter sido observada diferença significativa na contagem de leucócitos totais e linfócitos dentre os grupos (GI e GII), onde o GII apresentou valores superiores em relação ao GI, avalia-se que: a LL dos animais soronegativos pode ser consequência de condições purulentas crônicas como abscessos hepáticos, peritonite, pericardite traumática, pneumonia com a formação de abscessos ou outras infecções frequentes em gado de leite (DIRKSEN & HANS-DIETER, 1987), bem como, podem ainda estar presentes neste grupo, animais infectados pelo VLB, que ainda não soroconverteram.

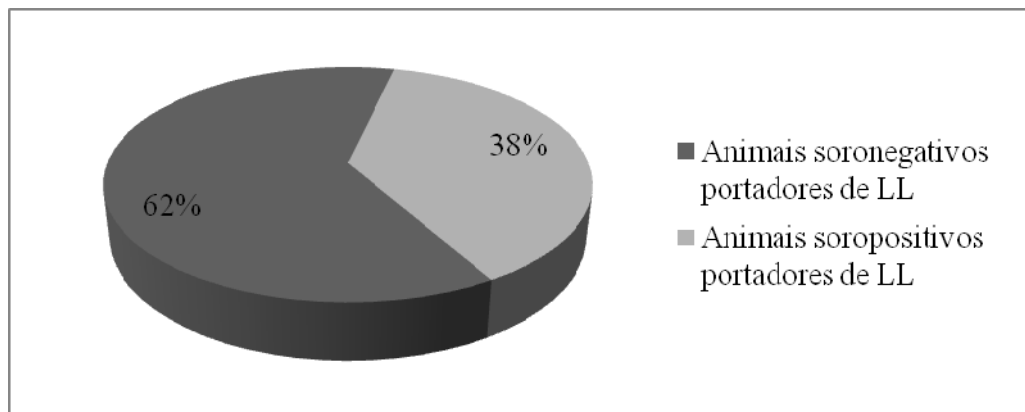


Gráfico 1 – Frequência dos bovinos soropositivos e soronegativos portadores de leucitose por linfocitose.

Dando continuidade à filtragem realizada foi observado no GI que, dentre os 99 bovinos soronegativos portadores de LL, 19% (19/99) deles apresentaram valores leucométricos acima do limite tolerável apresentado pelo grupo controle (Gráfico 2), enquanto que dentre os 60 bovinos soropositivos portadores de LL, uma maior parcela correspondendo à 43% (26/60) apresentou valores acima do limite tolerável (Gráfico 3). Assim, com base na frequência expressiva de animais soropositivos, dentre os portadores de LL, que apresentaram valores leucométricos acima do limite tolerável, associada ao fato de que não houve diferença significativa entres os grupos GI e GII nesta situação, é possível propor que além dos animais soropositivos, já assim considerados desde o sorodiagnóstico, os animais do GI (soronegativos) com valores acima desse limite tolerável podem ser considerados, para efeito de saneamento dos rebanhos, como suspeitos ou até inseridos em um grupo de animais positivos, mas que ainda não soroconverteram. Sendo assim, estes animais devem ser submetidos aos cuidados necessários como se infectados fossem, até que os testes sorodiagnósticos reafirmem a condição de serem soronegativos e/ ou os leucogramas apresentem valores inferiores, configurando uma leucocitose por linfocitose transitória, e não persistente, como é característica da LEB.

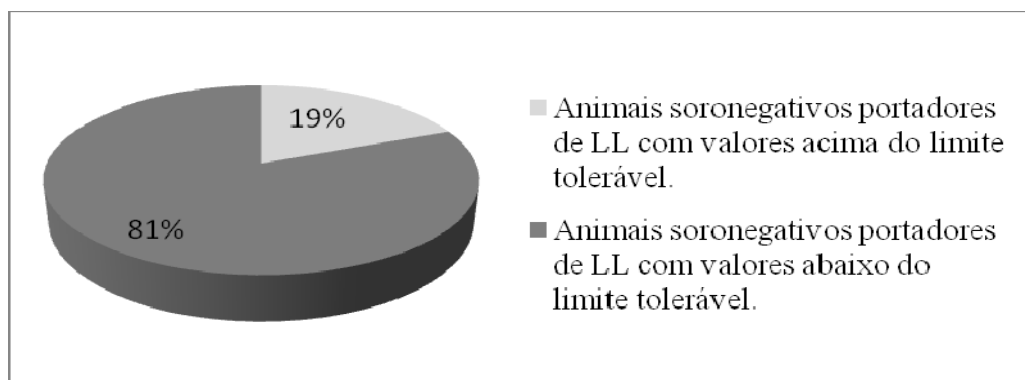


Gráfico 2 – Frequência dos bovinos soronegativos portadores de LL com valores acima do limite tolerável (com base no grupo controle).

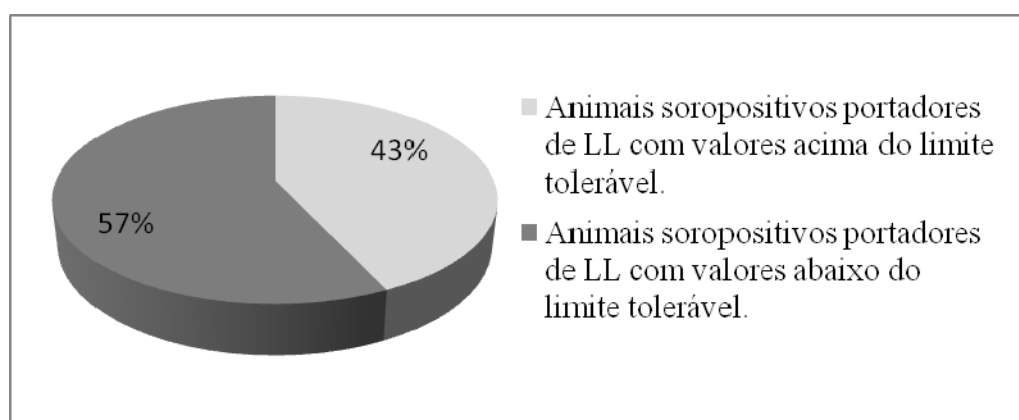


Gráfico 3 – Frequência dos bovinos soropositivos portadores de LL com valores acima do limite tolerável (com base no grupo controle).

Considerando a discussão realizada e sugerindo que o leucograma assume um importante papel no estudo da LEB, podendo ser utilizada como ferramenta auxiliar no monitoramento da mesma e no saneamento de rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco, ao aplicar o leucograma da forma proposto ao final deste estudo, teríamos que dos 718 bovinos que não reagiram positivamente à IDGA, 36 deles estariam em situação suspeita e deveriam ser submetidos a um manejo com maiores cuidados, evitando assim que possíveis 36 focos se espalhem pelos rebanhos do estado.

4.3 Relacionados às análises estatísticas

O teste *t* de Student possibilitou determinar o intervalo de confiança da média da população estudada, demonstrando com 95% de confiança, que uma população sadia submetida às mesmas condições deste estudo deverá apresentar valores médios de leucócitos totais entre 11,3 – 12,1 ($\times 10^3/\text{mm}^3$) e de linfócitos entre 7,4 – 8,4

($\times 10^3/\text{mm}^3$). O intervalo de confiança leucométrico médio para população estudada pode ser observada de forma detalhada na tabela 6.

Tabela 6 – Intervalo de confiança médio e individual dos leucócitos dos bovinos examinados em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco. Recife, 2012

| IDGA | Leucócitos Totais* | Linfócitos* | Segmentados* | Eosinófilos* | Bastonetes* | Monócitos* |
|--|--------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|------------|
| Intervalo de confiança da média populacional | 11,3 - 12,1 | 7,4 – 8,4 | 2,9 – 3,4 | 0 – 0,8 | 0 – 0,1 | 0 - 0,8 |
| Intervalo de confiança individual | 4,0 - 17,0 | 3,0 – 12,0 | 0,5 – 7,3 | 0 – 2,8 | 0 – 0,7 | 0 – 0,8 |

*Valores de leucócitos totais e linfócitos expressos em células $\times 10^3/\text{mm}^3$.

Ao aplicar o teste de aderência pelo teste qui-quadrado foi possível determinar o intervalo de confiança de um bovino (individual) apenas para as variáveis leucócitos totais e linfócitos, tendo em vista que as variáveis neutrófilos, eosinófilos, bastonetes e monócitos não apresentaram aderência. Para estabelecer o intervalo de confiança para as variáveis que não aderiram à Poisson recorreu-se à distribuição não-paramétrica (proveniente dos próprios dados). Entende-se desta forma, que 95% dos animais considerados sadios neste estudo apresentaram valores entre os intervalos apresentados na Tabela 6.

A não aderência observada do modelo de Poisson para os tipos celulares neutrófilo, eosinófilos, bastonetes e monócitos dos animais soronegativos (GI), ao teste qui-quadrado, evidencia a necessidade de estudos mais aprofundados em relação aos modelos estatísticos que possam ser aplicados na determinação desses valores.

Na tentativa de estabelecer, para os animais soropositivos, o intervalo de confiança individual dos leucócitos, também foi aplicado o teste de aderência pelo teste qui-quadrado à Poisson. Porém, não houve aderência entre as frequências observadas e esperadas. Desta forma, tendo em vista que no GI (soronegativos) foi observada aderência dos leucócitos totais e linfócitos ao modelo estatístico aplicado, a não aderência desses mesmos grupos celulares dos bovinos do GII (soropositivos) sugere a interferência da infecção pelo VLB de forma à modificar a distribuição de frequência

desses tipos celulares, impossibilitando a aderência ao modelo proposto para animais livre da infecção.

5 Considerações finais

Pode-se considerar que, apesar de não substituir a imunodifusão no diagnóstico da LEB, a leucometria apresentou importante papel na identificação de animais suspeitos, que não reagiram à IDGA. Coloca-se ainda, como vantagem da utilização da mesma no monitoramento da LEB em rebanhos leiteiros, a praticidade e o pouco tempo gasto utilizando as máquinas de contagem de células automáticas, associado a um baixo custo para o produtor.

Outro aspecto importante que justifica a utilização das análises leucométricas da forma proposta refere-se ao fato de que uma vez um animal submetido ao sorodiagnóstico for apontado como soronegativo, considerando a não obrigatoriedade do teste, dificilmente esse animal será retestado. Assim, ao considerar suspeitos os animais soronegativos com valores acima do limite tolerável, como proposto neste estudo, os mesmos podem ser monitorados de forma a evitar que potenciais fontes de infecção fiquem transitando entre os rebanhos.

Sendo a leucocitose por linfocitose persistente (LLP) um marcante aspecto da infecção pelo VLB, que ocorre em aproximadamente 30% dos animais infectados (FERRER et al, 1979), caracterizada pelo aumento duradouro dos números de linfócitos, (INTERNATIONAL COMMITTEE ON BOVINES LEUKOSIS, 1968), em associação com procedimentos considerados como diagnóstico da LEB por laboratórios credenciados no MAPA (TECSA, 2010), sugere-se proceder para identificação de focos da LEB e saneamento dos rebanhos leiteiros, com base na leucometria, da seguinte forma: bovinos soronegativos com valores acima do limite tolerável da população estudada devem ser submetidos a três análises leucométricas com intervalos de um mês dentre elas (FERRER *et al.*, 1979; TECSA, 2010), e não havendo restabelecimento dos valores leucométricos normais, caracteriza-se a LLP, devendo estes bovinos serem descartados do rebanho (figura 2).

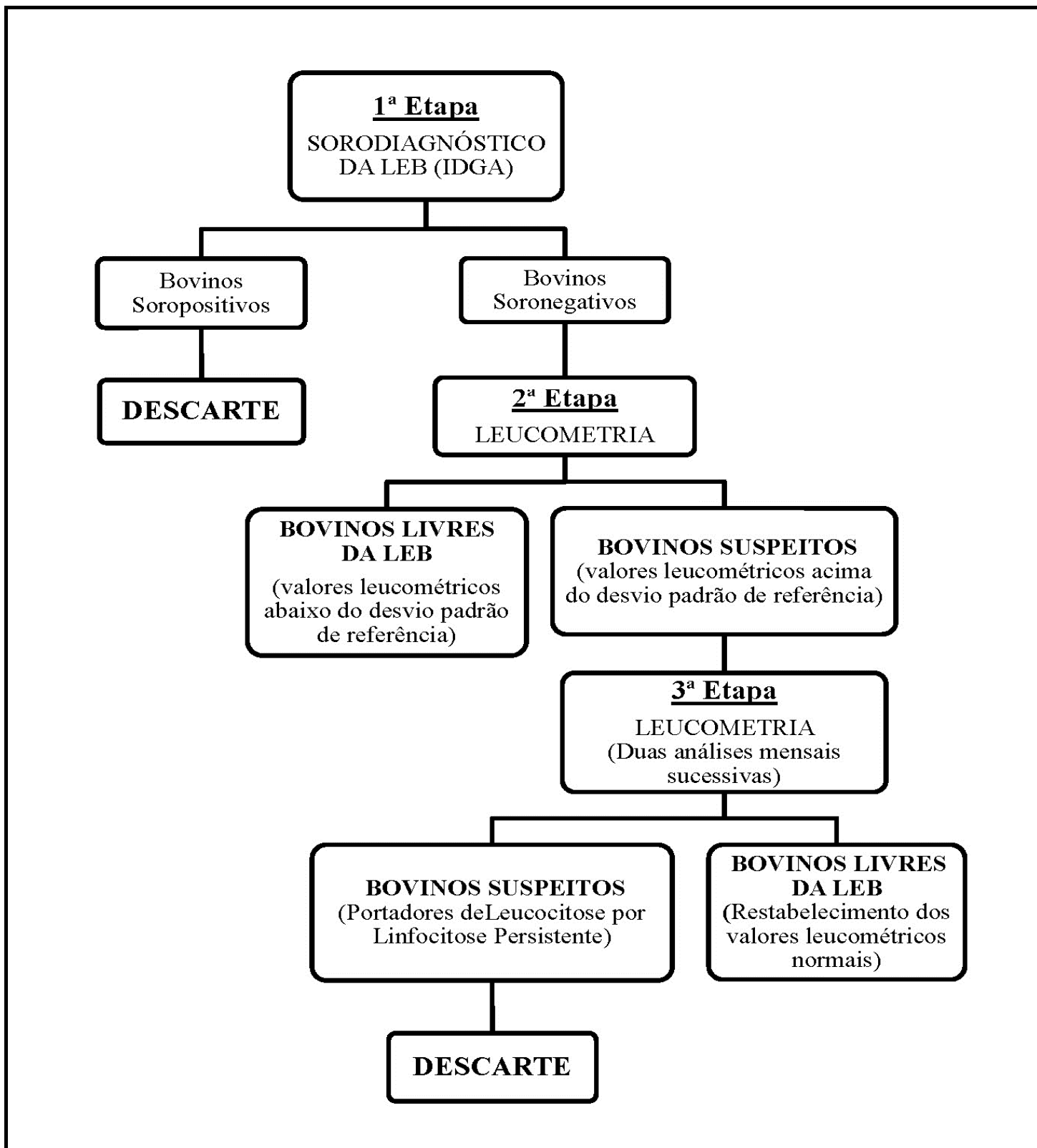


Figura 2 – Esquema estratégico a ser usado em programas sanitários para identificação de focos da LEB e saneamento dos rebanhos leiteiros no estado de Pernambuco.

6 Conclusão

Conclui-se que, com a demonstração da interferência do VLB no leucograma dos bovinos examinados e com a identificação de bovinos suspeitos não detectados pela IDGA, a leucometria se presta como recurso auxiliar para a identificação de focos da LEB e saneamento dos rebanhos, caracterizando-se como uma importante ferramenta clínico-epidemiológica a ser usada em programas sanitários voltados ao controle e erradicação da LEB nos rebanhos bovinos do estado de Pernambuco.

7 Referência Bibliográfica

ABREU, J.M.G. **Leucose Enzoótica dos bovinos. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina em animais criados na bacia leiteira de Fortaleza.** 1..p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 1993

ACAITE J. *et al.* The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. **Preventive Veterinary Medicine.** 15;82 (1-2):83-9. 2007

AGRESTI, A. *et al.* Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. **Am. J. Vet. Res.** 1993, 54, 373–378.

ALENCAR FILHO, R. A. *et al.* Quadro hemático de bovinos Jersey - aclimatados. **O Biológico**, v. 38, n. 1, p. 21-24, 1972.

ALENCAR FILHO, R. A. *et al.* Levantamento preliminar da infecção pelo vírus da leucemia linfática crônica (L.L.C.) dos bovinos no Estado de São Paulo. **O Biológico**, v.45, n.3/4, p. 47-54, 1979.

ALENCAR FILHO, R.A. Leucose dos bovinos. **O Biológico**, v.47, p.207-12, 1981.

ANGELO, M.J.O. *et al.* Isolamento do vírus da leucose bovina de animais com linfocitose persistente. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 13, São Paulo, 1985. **Anais....** São Paulo, USP, Instituto de Ciências Biomédicas, 1985. p.289.

ASTUDILLO, V.M. **Encuestas por muestreo para estudios epidemiológicos en poblaciones animales.** Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Febre Aftosa, 1979. p.35. (Série de Manuales Didáticos nº 12)

AZEDO, M.R. *et al.* Avaliação funcional de monócitos de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.5, p.1131-1140, 2011

AZEDO, M. R. *et al.* Influência da leucose enzoótica bovina na função fagocítica de leucócitos circulantes em animais manifestando linfocitose persistente. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 45, n. 5, 2008.

BARROS FILHO, I. *et al.* Prevalência da leucose enzoótica em bovinos leiteiros criados na região metropolitana de Curitiba – Paraná. **Ciência Animal Brasileira.** Suplemento 1, 2009 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria.

BENDIXEN, H.J. Bovine enzootic leukosis. **Adv. Vet. Sci.** 1965, 10, 129–204.

BIONDO, A.W. **Hemograma de bovinos (*Bos indicus*) sadios da raça Nelore no primeiro mês de vida, criados no Estado de São Paulo: influência dos fatores etários e sexuais.** Santa Maria-RS, 1996. 76p. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 1996.

BIRGEL, E.H. et al. Estudo preliminar sobre a ocorrência da Leucose dos Bovinos adultos criados na Região de Campinas. In: Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 43., 1988, Campinas, SP. Resumos. Campinas: **SPMV**, 1988a. p. 30.

BIRGEL, E.H. et al. Ocorrência da infecção causada pelo vírus da Leucose Bovina em gado leiteiro criado no Estado de São Paulo. Avaliação pela detecção de anti-corpos séricos por imunodifusão com antígeno viral. In: Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 43., 1988b, Campinas, SP. Resumos. Campinas: **SPMV**, 1988. p.31.

BIRGEL JUNIOR, E.H. et al. Prevalência da leucose enzoótica dos bovinos adultos, em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. In: Congresso Mundial de Buiatria, 16, Salvador, 1990. **Anais.** Salvador, Associação Mundial de Buiatria, 1990. p.789-93.

BIRGEL, E.H. Leucose linfática enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnóstico. In: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária. Patologia clínica veterinária. São Paulo, 1982. p. 249-60.

BIRGEL JÚNIOR, E.H. **O hemograma de bovinos *Bos taurus* (Linnaeus, 1758) da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da Leucose Bovina.** São Paulo, 1991. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

BIRGEL JUNIOR, E. H. et al. Valores de referência do leucograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 136-141, 2001.

BIRGEL JUNIOR, E. H. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em animais da raça Simental, criados no Estado de São Paulo. **ARS veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 2. p. 122-129, 2006.

- BRIGHTLING, P.; RADOSTITS, O.M. Bovine leukosis virus infection in a dairy herd in Saskatchewan. **Canadian Veterinary Medicine**, v. 44, p. 168-75, 1983.
- BURNY, A.; MAMMERICKX, M. Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus. **Developments in Veterinary Virology. Boston** (Series III), 1987. 282p.
- BUXTON, B.A.; HINKLE, N. C.; SCHULTZ, R. D. Role of insects in transmission by mosquitoes. **American Journal, of Veterinary Research**, v.43, p.1458-9, 1982.
- CAMARGOS, M. F. et al. Testes de diagnóstico para o vírus da leucemia bovina. Comunicação Científica. **Rev. bras. Ci. Vet.**, v. 12, n. 1/3, p. 149-150, jan./dez. 2005
- CAMARGOS, M. F. **Padronização de uma PCR para o diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina e sequenciamento parcial do gene env**. Dissertação Mestrado na Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. 2001.
- CARVALHO, L. **Leucose enzoótica dos bovinos. Prevalência de anticorpos séricos antivírus da leucose bovina em bovinos da raça Holandesa Preto e Branca e zebuínos da raça Nelore, criados no Pólo Regional de Londrina, Estado do Paraná**. São Paulo, 1994. p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- CASTRO, N.H.C. et al. Cytogenetics study of cattle affected by persistent lymphocytosis. **Journal of Veterinary Medicine**, v.35, p.380-4, 1988.
- CAVALCANTE, M.I. et al. Sobre a ocorrência da leucose bovina no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, p. 225-7, 1969.
- CHEVIRER L. Aspect hématologique de la Leucose Bovine application au dépistage hématologique. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 151, n.3, 1975
- COLES, E. H. Patología Clínica Veterinaria. 3. Ed. São Paulo: Manole, 1984. 914 p.
- COSTA, Joselito Nunes *et al.* Fatores etários no leucograma de fêmeas zebuínas sadias da raça Nelore (*Bos indicus*). **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, June 2000 .
- D'ANGELINO, J.L. **Leucose enzoótica dos bovinos. Estudo retrospectivo da performance produtiva e reprodutiva de animais infectados e não infectados**. São Paulo, 1991. 1...p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo..

DEQUIEDT, F.; CANTOR, G.H.; HAMILTON, V.T, et al. Bovine Leukemia Virus-Induced Persistent Lymphocytosis in Cattle Does Not Correlate with Increased Ex Vivo Survival of B Lymphocytes. **Journal of virology**, 1999, p. 1127–1137.

DIRKSEN, G. & HANS-DIETER G. **Rosemberg - Exame Clínico dos Bovinos** 2ª Ed. Guanabara Koogan, 3ª ed. 429p. 1987.

DOBBERSTEIN, J. Betrachtungen Uberdie Lymphadenose des Rindes (Rinderleukose). **Deutsch. tierarztL Wchnschr.**, 42:289-95,1934.

DOMENECH, A.; GOYACHE, J.; LLAMES, L. et al. In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. **J. Gen. Virol.** v.81, p.109-118, 200. 2000

DUCREUX, F., ARRIETA, E., JIMINEZ, C., MORENO, E. AND RODRIGUEZ, L. Estudios sobre leucosis viral bovina en ganado Bos indicus en Costa Rica. **Ciências Veterinárias**, 9, 95-99. 1987

EL-HAFEIZ, Y.G.M; METIAS, K.N; ABRAHIM, I.G.A. Comparative Serological Detection of Enzootic Bovine Leukosis Virus (EBLV) in cattle sera. **Global Veterinaria** 4 (3); 267-270, 2010.

ERSKINE, R. J, BARTLETT, P. C, SABO, K. M, AND SORDILLO, L. M. Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. **Veterinary Medicine International**, vol. 2011, Article ID 915747, 5 pages, 2011. doi:10.4061/2011/915747

ERSKINE, R. J, BARTLETT, P. C, SABO, K. M, AND SORDILLO, L. M. Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. **Veterinary Medicine International**, vol. 2011, Article ID 915747, 5 pages, 2011. doi:10.4061/2011/915747

EUROPEAN UNION, Annual Report on notifiable diseases of bovine animals and swine. 2010 OIE World Animal Health Information Database (WAHID Interface), Version 1.4. Available online: http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_detail (acessado em 07 Dezembro 2011).

EVERMANN, J.F. *et al.* Bovine leukosis virus: understanding viral transmission and the methods of control. **Veterinary Medicine**, v. 82, p.1051-8, 1987.

FAHEY, J. L.; MCKELVEY, E.M. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. **The Journal of Immunology**. v. 04, n. 01, p.84 – 94, 1964.

FERNANDES, A. C. C. et al. Leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos: estudo retrospectivo e prospectivo da ocorrência em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco. **Vet. e Zootec**. São Paulo, 18 (4 Supl. 3): 728 – 732. 2011.

FERNANDES, C.H.C. et al. Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região norte do estado do Tocantins, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.76, n.3, p.327-334, jul./set., 2009.

FERRER, J.F.; DIGLIO, C.A. Development of an in vitro infectivity assay for the C type bovine leukemia virus. **Cancer Research**, v.36, p.1068-73, 1976.

FERRER, J.F.; MARSHAK, R. R.; ABT, D. A.; KENYON, S. J. Relationship between lymphosarcoma and persistente lymphocytosis in cattle: a review. **Journal of the American Medical Association**, v.175, p.705-8, 1979.

FERRER, J.F.; PIPER, C.E.; ABT, D.A.; MARSHAK, R.R.; BHATT, D.M. Natural mode of transmission of the bovine C type leukemia virus (BLV). **Bibl. Haematol.**, 43, 235–237, 1975

FLORES, E.F. *et al.* Aspectos epidemiológicos da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB) na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **A Hora Veterinária**, n.58, p.25-9, 1990.

FLORINS, A.. et al. Cell dynamics and immune response to BLV infection: A unifying model. **Frontiers in Bioscience**, 12 (4), pp. 1520-1531, 2007

FRANCKI, R.I.B. et al. Classification and nomenclature of viruses. supplementum de **Archives of Virology**, New York, v.2 , p.47-298, 1991.

FRANDOLOSO, R.; ANZILIERO, D.; SPAGNOLO, J.; et al. Prevalência de leucose enzoótica bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e neosporose bovina em 26 propriedades leiteiras da região nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1102-1106, 2008.

GARCIA, M. **Avaliação do leucograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa branca e preta, naturalmente infectadas pelo vírus da leucose bovina**. São Paulo. 67p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 1989

GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUS, .M. et al. Mechanisms of eukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, 4:18. 2007.

GOMES, M. et al. Detecção de anticorpos séricas contra o vírus da leucose enzoótica bovina (VLEB) em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.13, p.15-22, 1985.

GOTZE, R.; ROSENBERGER, G.; ZIEGENHAGEN, G. Die Leukose des Rindes: Ihre hamatologische und klinisclie Diagnosis. **Monatshefte für Veterinarmedizin**, v.9, p.517-26, 1954.

GRIMOLDI, M.G. et al. Karatype analysis of lymphocytes from cattle at different stages of bovine leukemia virus infection. **British Veterinary Journal**, v.139, p.240-6, 1983.

GURTLER, G. et al. Influência do estresse oxidativo na apoptose leucocitária de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina. **Ciência Animal Brasileira**, 2009.

HEENEY, J. L.; VALLI, P. J.; JACOBS, R. M.; et al. Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. **Laboratory Investigation**, v.66, n.5, p.608-1, 1992.

ILIFF PJ, PIWOZ EG, TAVENGWA NV, et al. Early exclusive breastfeeding reduces the risk of postnatal HIV-1 transmission and increases HIV-free survival. **AIDS**, 19 (7): 699–708, 2005.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON BOVINE LEUKOSIS. **Journal of the National Cancer Institute**, v.41, p.243-63, 1968.

JAIN, N.C. Essentials of Veterinary Hematology. Lea & Febiger. Philadelphia, 1993. 348p.

JULIARENA MA, GUTIERREZ SE, CERIANI C. Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. **Am J Vet Res**. 2007 Nov;68(11):1220-5.

- KANTEK, C.E. et al. Prevalência do vírus da leucose enzoótica bovina no rebanho leiteiro do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.3, n.4, p125-9, 1983.
- KETTMANN, R.; BURNY, A.; LEVY, J.A. Bovine leukemia virus. In the retroviridae; Ed.; **Plenum Press**: New York, NY, USA, 1994; Volume 3, pp. 39–81.
- KNUTH, P. VOLKMANN, O. Untersuchungen über die Lymphomatose des Rindes. Zeitschrift für Infektionskrankheiten **Parasitäre Krankheiten und Hygiene**, v.17, p.393-4679, 1916.
- KOBAYASHI, S. et al.. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. **BMC Veterinary**, 7; 6 – 11, 2010.
- KOHARA J, KONNAI S, ONUMA M. Experimental transmission of bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. **Jpn J Vet Res**. 2006;54(1):25-30.
- KONNAI S. et al. Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. **Microbes and Infection**, 8(8): 2163-2171, 2006.
- LEITE, R.C. et al. Evolução clínica da leucose enzoótica bovina. Arquivo Brasileiro de **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.6, p.47-17, 1984.
- LOPEZ, R. et al. Seroprevalence against bovine leukaemia virus in dairy cattle in Bolivia **International Journal of Dairy Science**, 5 (4), pp. 271-275, 2010.
- LORENZ, R. J. et al. The epidemiology of enzootic bovine leukosis. In: ed. Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus. Boston, **Martinus Nijhoff**, p.51-68, 1987.
- MAMMERICKX, M. et al. Diagnostic tests of bovine leukemia. Comparison between hematological test and the serological diagnosis. **European Journal of Cancer**, v.12, p.433-9, 1976.
- MAMMERICKX, et al. The immunodiffusion tests for the detection of bovine leukemia virus infected animals. In: Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus. Boston, **Martinus Nijhoff**, 1987. p.195-200.
- MAMMERICKX, M. Eradication of enzootic bovine leukosis based on the detection of the disease by the GP immunodiffusion test. **Annales de Recherches Veterinaires**, v.9, p.885-94, 1978.

- MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v.2, p.235-254.1965
- MARÍN, C. et al. Epidemology of bovine leukemia in Venezuela. **Ann. Rech. Vet.**, 9:743-746. 1978.
- MARUYAMA, K.; FUKUSHIMA, T.; MOCHIZUKI, S. Cross-reactive antibodies to BLV and HTLV in bovine and human hosts with retrovirus infection. Amsterdam. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.22, p.265-73, 1989.
- MATOS, P. F. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre os resultados do teste de ELISA e da imunodifusão em gel de ágar. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 42, n. 3, 2005
- MATSUOKA, M.; JEANG, K.T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nat. Rev. Cancer** 2007, 7, 270–280.
- MEGID J. et al. Ocorrência de Leucose Enzoótica Bovina na microrregião da Serra de Botucatu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.5, p. 645-646. 2003.
- MELO, L.E.H. **Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco**. São Paulo, 1991. 102p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- MELO, L.E.H. et al. Influência do fator sexual no leucograma de bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias , 15, 1996a. **Anais**.
- MELO, L.E.H. et al. Influência do fator etário no leucograma de bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS , 15, 1996b. **Anais**.
- MELO, L.E.H. **Avaliação da Intercorrência entre Leucose Enzoótica, Tuberculose e Leptospirose dos bovinos em rebanhos produtores de leite C do Estado de São Paulo**. USP, 1999, São Paulo – Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo.

MELO, L.E.H. et al. Estudo Retrospectivo e Prospectivo da Intercorrência entre Leucose Enzoótica e Tuberculose dos Bovinos em Rebanhos Leiteiros do Estado de Pernambuco. In: **Anais** do Seminário Nacional Sobre Brucelose e Tuberculose Animal (SNBTA); 2010, Belo Horizonte – MG; 2010.

MENDES, E. I. **Aspectos Sorológicos e Hematológicos como recursos auxiliares ao diagnóstico da Leucose Enzoótica dos Bovinos em rebanhos leiteiros de Pernambuco**. Recife, 47p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2002.

MENDES, E. I. et al. Aspectos sorológicos e hematológicos como recursos auxiliares ao diagnóstico da leucose enzoótica dos bovinos (LEB) em rebanhos leiteiros de Pernambuco. **Anais** do Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. 09 a 12 de Setembro de 2007 - Santos - SP, 2002..

MENDES, E.I. et al. Prevalência da leucose enzoótica e da tuberculose dos bovinos em rebanhos leiteiros do estado de pernambuco. In: **Anais** do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet); 2008; Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária; 2008.

MERKT, H. et al. Leucose bovina: concepção moderna e primeira verificação da doença no Rio Grande do Sul. **Revista da Escola de Agronomia e Veterinária do Rio Grande do Sul**, v.2, n.3, p.7-19, 1959.

MILLER, J.M. et al. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v.43, p.1297-305, 1969.

MILLER, L.D. Export testing for enzootic bovine leukosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.177, p.620-2, 1980.

MILLER, J. M.; OLSON, C. Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 49, p.1459-62, 1972.

MILLER, J.M.; van der MAATEN, M.J. Use of glycoprotein antigen in the imunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. **European Journal of Cancer**, v.13, p 1369-75, 1977.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Brasil. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Brasília: MAPA; 2001.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, 2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.

MODENA, C.M. Leucose enzoótica bovina. I- Comparação entre métodos de diagnósticos. II- Evolução sorológica em bezerros. III - Interferência com a vacina anti-febre aftosa. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**. v.33, n.3. p. 624-5, 1981.

MODENA, C.M. et al. Ocorrência de Infecção pelo vírus de Leucose enzoótica bovina em animais importados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.35, p. 565-7, 1983.

MODENA, C.M. et al. Leucose enzoótica bovina. I - Prevalência em rebanhos de alta linhagem no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.36, p.39-45, 1984.

MOHAMMADABADI M.R. et al. Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle. **Genetics and Molecular Research**. 27;10(4):2658-63, 2011

MOHAMMADI, V. et al. Seroprevalence of bovine leukemia virus in some dairy farms in Iran. **Global Veterinaria**, 7 (3), pp. 305-309. 2011.

MORAES, P. M. et al. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da Leucose Bovina nos rebanhos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 257-262, 1996.

MURAKAMI, K. et al. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. **Veterinary Microbiology**, 148 (1), pp. 84-88. 2011.

MUSCOPLAT, C.C. et al. Characteristics of lymphocyte responses to phytomitogens: comparison of responses of lymphocytes from normal and lymphocytotic cows. **American Journal of Veterinary Research**, v.35, p.1053-5, 1974.

NAGY, D.W. et al. Association between the strength of serologic recognition of bovine leukosis virus and lymphocyte count in bovine leukosis virusinfected cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 220:1681-1684. 2002

NAGY, D.W.; TYLER, J.W.; KLEIBOEKER, S.B. Decreased periparturient transmission of bovine leukosis virus in colostrums fed calves. **J. Vet. Int. Med.** 21, 1104–1107. 2007.

NUOTIO, L. et al. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. **Preventive Veterinary Medicine.** 30;59(1-2):43-9. 2003

OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. CÓDIGO ZOOSANITÁRIO INTERNACIONAL. 11ª edição, 2001. Disponível em: <http://www.oie.int> , Acesso em 20 Dez. 2010, on line.

OIE, World Animal Health InformationDatabase (WAHID Interface), Version 1.4. Available online: http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_detail (acessado em 07 Dezembro 2011).

OIE, Manual Terrestre. 2008. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf , (acessado em 07 Dezembro 2011).

Oldstone MBA: Viral persistence: Parameters, mechanisms and future predictions. **Virology** 2006, 344:111-118.

OLSON, C. e MILLER, I. History and terminology of enzootic bovine leukosis. In: Boston, **Martinus Nijhoff**, 1987, p. 3-11.

PENA, N.E.B. et al. Prevalência serológica de leucosis bovina en ganaderias lecheras del centro de Caldas durante 1983. **Revista ICA**, 20, 106-115. 1985.

POETA, P.; COELHO, A.C.; RODRIGUES, J. Epidemiological survey of enzootic bovine leukosis in Portugal from 1995 to 2005 [Situação Epidemiológica da leucose bovina enzoótica em Portugal entre os anos de 1995 e 2005] **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, 60 (5), pp. 1250-1254. 2008.

RADKE, K; GROSSMAN, D; KIDD, L.C. Humoral immune response of experimentally infected sheep defines two early periods of bovine leukemia virus replication. **Microb Pathog**, 9:159-171, 1990.

RANGEL, N.M. e MACHADO, A..V. Contribuição à oncologia comparada em Minas Gerais. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária do Estado de Minas Gerais**, v.1. p.83-96, 1943.

READ, J.S. Human milk, breastfeeding, and transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the United States. **Pediatrics**, 112:1196–1205, 2003.

RESSANG, A.A. et al. Studies on bovine leukaemia. II - Haematological, serological, virological and electron microscopical diagnosis. **Zentralblatt furVeterinarmedizin**, v.23, p.566-79, 1976.

ROMERO, C.H. e ROWE, C.A. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.13, p.107-11, 1981.

ROSAL, E.R. *et al.* Parametros hematológicos normales en bovinos cebú (indubrasil) desde el nacimiento hasta el destete, en clima subtropical A(f). **Veterinária Mexico**, v.13, p.13-18, 1982.

ROSENBERGER, G. Leukose des Rindes. Berlin, Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften, 1961. p.33-45. (Tagungsberichte, 49).

ROSENBERGER, G. Die wissenschaftlichen Grundlagen zur Bekämpfung der Rinderleukose. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, B. v.15. p.193-9, 1968.

SAMAGH. B.S.; KELLAR, J.A. Seroepidemiological survey of bovine leukemia virus infection in Canadian cattle. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BOVINE LEUKOSIS, 4., Bologna, 1980. The Hague, **Martinus Nijhoff**, 1982. p.397-412.

SAMPAIO, I.B.M.. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Vol.1. 3ª ed. FEP-MVZ, Belo Horizonte. 264 p. 2007.

SHETTIGARA, P. T. Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel immuno-difusion test. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.50, p.221-6, 1986.

SIMÕES, V.D. **Leucose enzoótica dos bovinos. Prevalência de anticorpos séricos antivírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado da Paraíba**. São Paulo, 1988. 118p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1991.

- STÖBER, M. Lymphatische Leukose erwachsener Rinder. In: ROSENBERGER, G. **Krankheiten des Rindes**. Berlin, Paul Parey, 1970. p. 54-73.
- STONE, D.M. et al. CD4 T lymphocyte activation in BLV-induced persistent B lymphocytosis in cattle. **Clin Immunol** 2000, 96:280-288.
- SUZAN, V.M. et al. Prevalence of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhea, bovine adenovirus-7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. **Japanese Journal of Veterinary Research**, 31, 125-132, 1983.
- TAVORA, J.P.F. **Prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em rebanho leiteiros criados na região do Pólo Itabuna Estado da Bahia**. São Paulo, 1990. 106p. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- TECSA – Jornada de Conhecimento TECSA em bovinocultura. Resultados positivos para o teste de Leucose enzoótica bovina. 2010. Disponível em <http://www.tecsa.com.br/media/file/pdfs/DICAS%20DA%20SEMANA/BOVINOCULTURA%202010/TESTE%20POSITIVO%20PARA%20LEB.pdf>, em 16 de fevereiro de 2012.
- TENNANT, B. *et al.* Haematology of the neonatal calf: erythrocyte and leucocyte values of normal calves. **Cornell Veterinarian**, v.64, p.516 - 532, 1974.
- TENÓRIO, T.G.S. **Aspectos sanitários da Leucose Enzoótica, da Leptospirose e da Brucelose dos Bovinos em rebanhos leiteiros de Pernambuco**. 2003, Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2003
- TIZARD, I.R. **Introdução à Imunologia Veterinária**, São Paulo, 5 ed. Roca, 1998. p.259-312.
- TRONO, K.G. et al. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: Comparison of sensitivity and specificity of different detection methods (2001) **Veterinary Microbiology**, 83 (3), pp. 235-248.
- TSUTSUI, T. et al.. Estimation of the withinherd transmission parameter of bovine leukemia virus. **Preventive Veterinary Medicine** 95 (2010) 158–162

- USUI, T. et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha in IgM+ B-cells from bovine leukemia virusinfected lymphocytotic sheep. **Vet Immunol Immunopathol**, 112: 296-301, 2006.
- VAN DER MAATEN, M.J.; MILLER, J.M. Appraisal of control measures for bovine leukosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.175. p.1287-90, 1979.
- VAN LEEUWEN, J.A. et al. Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral-diarrhea virus, *Mycobacterium* *vium* subspecies *paratuberculosis* and *Neospora caninum* in Canadian dairy cows. **Prev. Vet. Med.**, 94: 54-64, 2001.
- WALTON, R.M. Establishing reference intervals: health as a relative concept. **Semin Avian. Exotic. Pet. Ped.** 2001;10:67-71.
- WILESMITH, J.W. **Algumas observações sobre a epidemiologia da infecção por vírus da leucose bovina num grande rebanho leiteiro.** Trad. de Paulo Ponce de Leon Filho e Lúcio José Gomes Pereira. Recife, Serviço de Defesa Sanitária Animal, 1980. 16p. (Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva, 1).
- WYERS, M. Rappel sur les oncornavirus des animaux. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.151, n.3, 1975.