

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

**HAMILTON PEREIRA SANTOS**

**LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO NA BACIA  
LEITEIRA DO ESTADO DO MARANHÃO E APERFEIÇOAMENTO DO  
DIAGNÓSTICO**

**RECIFE**

**2010**

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

**HAMILTON PEREIRA SANTOS**

**LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO NA BACIA  
LEITEIRA DO ESTADO DO MARANHÃO E APERFEIÇOAMENTO DO  
DIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Veterinária do Departamento de Medicina  
Veterinária da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como requisito para obtenção do grau  
de Doutor em Ciência Veterinária.

**Orientador:**

**Prof. Dr. Roberto Soares de Castro**

**Co-Orientador:**

**Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira**

**RECIFE**

**2010**

S237L

Santos, Hamilton Pereira

Leucose enzoótica bovina: estudo epidemiológico na  
bacia leiteira do Estado do Maranhão e aperfeiçoamento do  
diagnóstico / Hamilton Pereira Santos. -- 2010.

87 f. : il.

Orientador: Roberto Soares de Castro.

Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina  
Veterinária, Recife, 2010.

Inclui referências e apêndice.

1. Leucose bovina 2. Bovino de leite 3. Fatores de risco  
4. Imunodifusão – IDGA I. Castro, Roberto Soares de,  
orientador II. Título

CDD 636.089444

**HAMILTON PEREIRA SANTOS**

**LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO NA  
BACIA LEITEIRA DO ESTADO DO MARANHÃO E  
APERFEIÇOAMENTO DO DIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Veterinária do Departamento de Medicina  
Veterinária da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como requisito para obtenção do grau  
de Doutor em Ciência Veterinária.

Aprovada em 19/02/2010

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof Dr. ROBERTO SOARES DE CASTRO**

**Orientador – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE**

**Prof Dr. HELDER DE MORAES PEREIRA**

**Universidade Estadual do Maranhão**

**Prof Dr. LÚCIO ESMERALDO HONÓRIO DE MELO**

**Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Prof. Dr. JOSÉ AUGUSTO BASTOS AFONSO**

**Universidade Federal Rural de Pernambuco - Campus Garanhuns**

**Dra. MARIA FERNANDA VIANNA MARVULO**

**Instituto Brasileiro para Medicina da Conservação – TRÍADE**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família  
em especial à minha sempre amada  
esposa Ana Lúcia.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a DEUS pelo dom da vida e de ter encontrado seu caminho.

A minha família em especial aos meus pais, irmãos e irmãs.

A minha amada sempre Ana Lúcia e as filhas Ana Beatriz e Alice pelo incentivo e compreensão por muita das vezes não lhe dá atenção pelo envolvimento deste trabalho.

Ao meu Orientador Professor Dr. Roberto Soares de Castro a quem tenho a liberdade de chamá-lo de meu amigo e meu irmão, pela orientação e por acreditar em mim.

Ao meu Co-orientador Hélder de Moraes Pereira, a quem tenho também a liberdade de chamá-lo de meu amigo e meu irmão, pela orientação e por acreditar em mim.

Aos cunhados e cunhadas que sempre me apoiaram nesta luta.

Ao Secretario de Estado da Ciência e Tecnologia, Ensino Superior e Desenvolvimento Tecnológico do Estado do Maranhão, Waldir Maranhão pela grande ajuda que nos concedeu para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos Rita, Porfírio, José Gomes e Lúcia Coelho pelos incentivos que sempre me deram.

Aos meus amigos Roberto Carlos e José Cláudio pela nossa amizade e compreensão nos momentos do cadastramento das propriedades e acolhida em Imperatriz.

Aos meus amigos Sergio Alves e Luciana Coutinho pela paciência e ajuda nos exames laboratoriais.

Aos amigos Professores Dr. José Augusto Basto Afonso Dra. Carla Lopes de Mendonça, pela concessão dos soros bovinos para aperfeiçoamento do diagnóstico da microimunodifusão para Leucose Enzoótica Bovina – LEB.

Aos professores Rinaldo Aperecido Mota e Leucio Camara Alves pelos conselhos acadêmicos.

Ao amigo Severino Vicente da Silva, pela contribuição a este trabalho.

Aos meus amigos especiais e adotados filhos acadêmicos Nacyleni e Danilo, pela companhia das viagens e colheita das amostras sanguínea.

Ao meu grande amigo e considerado também filho acadêmico Walberthfran pelo acolhimento e realização dos exames laboratoriais.

Ao meu amigo Evangelista Campos de Oliveira que sempre nos ajudou.

As alunas de iniciação científica Vanessa e Janaíra pela contribuição na realização dos exames laboratorial.

Aos meus amigos Michele e Kleber Moreira pela receptividade.

Ao meu amigo João Azevedo que sempre nos atendeu através da prefeitura do Campus Universitário nossas reivindicações.

A todos os professores o Curso de Medicina Veterinária da UEMA que de forma direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os funcionários da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE em especial a Edina e Tom que de forma direta e indiretamente contribuíram com este trabalho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco por me aceitar em seu Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária.

A Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, pela oportunidade que nos concedeu para a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa que nos foi concedido durante esses quatro anos.

Ao Instituto do Agronegócio do Estado do Maranhão através do meu amigo e Professor José de Jesus Reis Ataíde pela ajuda que nos foi concedida.

A Fundação de Apoio a Pesquisa e Tecnologia do Estado do Maranhão – FAPEMA, pela ajuda financeira através do Programa Apoio a Projetos de Pesquisa – APP.

Ao CNPq pela ajuda financeira ao Laboratório de Virologia da UFRPE.

“Use sempre a serenidade para aceitar as coisas que você não pode mudar, porém tenha coragem de mudar as coisas que você pode e procure sempre diferenciá-las”.

Autor: MESTRE DOS MESTRES.



## RESUMO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma doença causada por um *Deltaretrovirus* da família *Retroviridae*, caracterizada por proliferação linfocitária e/ou formação de linfosarcomas, principalmente distribuída em bovinos leiteiros. O vírus da LEB está presente em todos os continentes. No Brasil foram encontrados 27,6% do rebanho leiteiro, infectado. O Estado do Maranhão se caracteriza por intensa comercialização de bovinos de várias regiões do país, onde foi constatada a presença da LEB. Neste trabalho se teve como objetivos, estudar a soroprevalência e fatores de riscos associado à LEB na Bacia Leiteira do Estado do Maranhão e aperfeiçoar técnica de imunodifusão em gel de agar (IDGA) para diagnóstico da LEB. Assim foram coletadas 920 amostras sanguíneas de 92 rebanhos leiteiros da raça Girolanda distribuídos em 23 municípios das cinco Regionais que compõem a bacia leiteira do Estado. Para o diagnóstico da LEB foi utilizada a prova de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA). A prevalência estimada foi de 53,80% de animais sororeagentes, distribuídos em 98,91% (91/92) dos rebanhos estudados, afetando principalmente animais de idade superior aos 48 meses ( $P < 0,05$ ). As Regionais Bacabal, São Luís e Pedreira apresentaram as frequências de sororeatividade mais elevadas (63,50%, 61,87,% e 60,62%, respectivamente); Imperatriz, intermediária (41,18%); e Açailândia, a mais baixa (30,83%) ( $P < 0,05$ ). Todos os municípios apresentaram animais sororeagentes, com frequências variando de 22,50% (São Francisco do Brejão) a 75,00% (Bernardo do Mearim). Ao se analisar as variáveis estudadas como potenciais fatores de risco para LEB foi verificada associação estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre sororeagentes para LEB e uso repetido da mesma agulha para colheita de sangue ou vacinação (Odds Ratio – OR = 2,76; IC – 1,73 - 4,93), uso repetido da mesma luva obstétrica (OR=1,74; IC - 1,2 a 2,49), estabulação dos animais (OR=1,97; IC – 1,28 – 3,02) e ausência de assistência Veterinária (OR=1,42; IC – 1,06 – 1,88). O conhecimento da LEB pelos criadores e a aquisição de animais de outras criações para reprodução não interferiu na sororeatividade para LEB (OR=1,09; IC – 0,82 – 1,44 e OR=0,88; IC – 0,57 – 1,36, respectivamente) ( $P > 0,05$ ). Para aperfeiçoamento de uma prova de diagnóstico para LEB, utilizou-se a micro-imunodifusão em gel de agarose (micro-IDGA) usou-se protocolo simples para obtenção do antígeno comparativamente a uma macro-IDGA. Foram utilizadas 450 amostras de soro bovino provenientes de 92 propriedades dos 23 municípios que compõem a bacia leiteira do estado do Maranhão. O antígeno usado na micro-IDGA foi obtido por diálise frente ao polietilenoglicol de sobrenadante de células FLK infectadas pelo VLEB. Na micro-IDGA utilizou-se 10  $\mu$ l de antígeno e soro controle positivo

e 30 µl do soro teste; na macro-IDGA 25 µl de todos os reagentes, produzidos pelo Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR). Dos soros comparados, 259 (57,56%) e 245 (54,44%) apresentaram resultados positivos na micro-IDGA e macro-IDGA, respectivamente. Houve ótima concordância entre as duas técnicas ( $K=0,91$ ), com sensibilidade e especificidade da macro-IDGA em relação a micro-IDGA de 93,43% e 98,43%. A micro-IDGA apresentou linhas mais claras do que as observadas na macro-IDGA e a leitura pode ser feita 24 horas antes da macro-IDGA. Conclui-se que a micro-IDGA pode substituir a macro-IDGA no diagnóstico sorológico da LEB, com a vantagem de maior rapidez na emissão dos resultados e da obtenção do antígeno com técnica simples.

**Palavras Chaves:** Leucose bovina, epidemiologia, diagnóstico, Maranhão, Brasil.

## ABSTRACT

The Bovine Enzootic Leukosis (BL) is a disease caused by bovine leukemia virus (BLV), a Deltaretrovirus of the Retroviridae family, characterized by lymphocyte proliferation and lymphosarcoma, mainly distributed in dairy cattle. Based on national and international literature was found that all continents are affected by BLV, including Brazil. The state of Maranhão is characterized by intense trading of cattle from various regions of the country, where the presence of the EBL was found. This work aimed to study the prevalence and risk factors associated with EBL in the dairy herd of the state of Maranhão and the evaluation of a microimmunodiffusion technique (micro-AGID) in agar gel for the diagnosis of EBL. In order to know the seroprevalence and risk factors associated with EBL, a total of 920 blood samples were collected from 92 dairy HZ breed cattle distributed in 23 municipalities of the five that make up the regional dairy farming country. For the diagnosis of EBL, the AGID was used to test (kit produced by the Technological Institute of Parana - TECPAR). The estimated prevalence was of 53.80% of seropositive animals, distributed in 98.91% (91/92) of herds, mainly affecting animals over the age of 48 months ( $P < 0.05$ ). The Bacabal, Sao Luis and Pedreiras regionals presented higher seropositive frequencies (63.50%, 61.87, and 60.62% respectively; Imperatriz, intermediate (41.18%), and Açailândia, the lowest (30.83%) ( $P < 0.05$ ). All municipalities had seropositive animals, with frequencies ranging from 22.50% (San Francisco Brejão) to 75.00% (Bernardo do Mearim). When analyzing the variables studied as potential risk factors for EBL a statistically significant association ( $P < 0.05$ ) was found between seropositive for EBL and repeated use of the same needle for blood sampling or vaccination (Odds Ratio - OR=2.76; IC – 1,73 - 4,93), repeated use of the same obstetric glove (OR=1.74; IC – 1.2 a 2.49), animal housing (OR=1.97; IC – 1.28 – 3.02 ), and lack of veterinary care (OR=1.42; IC – 1.06 – 1.88), was found. Knowledge of BEL by farmers and the purchase of animals from other farms for breeding did not interfere in seroreactivity to BEL (OR=1.09; IC – 0.82 – 1.44 and OR=0.88; IC – 0.57 – 1.36, respectively) ( $P > 0.05$ ). In order to improve the development of a diagnostic test for EBL, micro-gel immuno-Agarose (micro-AGID) was used with simple protocol for obtaining the antigen compared to a macro-AGID. A total of 450 serum samples from 92 properties in 23 counties that make up the dairy state of Maranhão were used.

The antigen used in micro-AGID was obtained by dialysis of supernatant of FLK cells infected by BLV against the polyethylenogricol. In micro-AGID 10 µl of antigen and positive serum control was used and 30 µl of test serum, in the macro-AGID 25 µl of all reagents were

used. This produced by the Technological Institute of Parana (TECPAR). Of the sera compared, 259 (57.56%) and 245 (54.44%) showed positive results in micro-AGID and macro-AGID, respectively. There was a very good agreement between both techniques ( $K = 0.91$ ), with sensitivity and specificity of the macro-AGID for micro-AGID of 93.43% and 98.43% with an accuracy of 95.96%. Micro-AGID showed clearer lines than those observed in the macro-AGID and reading can be made 24 hours before the macro-AGID. It is concluded that micro-AGID can be used successfully in the serological diagnosis of EBL, with the advantage of greater speed in issuing the results and obtaining the antigen with a simple technique.

Keywords: Bovine leukosis, prevalence, diagnostic, Maranhão, Brazil

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Artigo 1</b>	<b>Figura 1 Mapa do Estado do Maranhão representando cinco regionais, com destaque para a Bacia Leiteira e distribuição da prevalência da LEB: 1 – Bacabal, 2 - São Luís, 3 - Pedreiras (prevalências de 63,50%; 61,87% e 60,62); 4 - Imperatriz (41,18%); 5 - Açailândia (30,83%).....</b>	<b>55</b>
-----------------	---	-----------

## LISTA DE TABELAS

<b>Artigo 1</b>	<b>Distribuição de frequências de bovinos sororeagentes à imunodifusão em ágar gel (IDGA) para Leucose Enzoótica Bovina de acordo com as Regionais e Municípios da bacia leiteira do Estado do Maranhão (2009).....</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 1</b>		
<b>Tabela 2</b>	<b>Distribuição de frequência de bovinos da bacia leiteira do Estado do Maranhão sororeagentes à Imunodifusão em Agar gel (IDGA) para Leucose Enzoótica Bovina de acordo com a faixa etária (2009).....</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 3</b>	<b>Distribuição de frequências de bovinos sororeagentes à imunodifusão em ágar gel (IDGA) para Leucose Enzoótica Bovina em relação às variáveis estudadas na bacia leiteira do Estado do Maranhão (2009).....</b>	<b>57</b>
<b>Tabela 4</b>	<b>Distribuição de frequências dos fatores de risco para Leucose Enzoótica Bovina (LEB) de acordo com os rebanhos estudados na bacia leiteira do Estado do Maranhão (2009).....</b>	<b>58</b>
<b>ARTIGO 2</b>	<b>Resultado dos testes de 450 amostras séricas de bovinos submetidas às técnicas de macro-imunodifusão (macro-IDGA) e micro-imunodifusão (micro-IDGA) para pesquisa de anticorpos contra o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina – VLEB.....</b>	<b>80</b>
<b>Tabela 1</b>		
<b>Tabela 2</b>	<b>Distribuição dos resultados das leituras dos testes de 450 amostras séricas de bovinos submetidas às técnicas de macro-imunodifusão (macro-IDGA) e micro-imunodifusão (micro-IDGA) para pesquisa de anticorpos contra o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina – VLEB.....</b>	<b>81</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>LEB</b>	<b>Leucose Enzoótica Bovina</b>
<b>Macro-IDGA</b>	<b>Macro-Imunodifusão em Ágar Gel</b>
<b>Micro-IDGA</b>	<b>Micro-Imunodifusão em Ágar Gel</b>
<b>TECPAR</b>	<b>Instituto Tecnológico do Paraná</b>
<b>INAGRO</b>	<b>Instituto do Agronegócio do Estado do Maranhão</b>
<b>LABMET/UEMA</b>	<b>Laboratório de Ambiente e Meteorologia/ Universidade Estadual do Maranhão</b>
<b>DNA</b>	<b>Ácido Desoxirribonucléico</b>
<b>ELISA</b>	<b>Ensaio Imunoenzimático</b>
<b>GP</b>	<b>Glicoproteínas</b>
<b>HTLV1</b>	<b>Vírus de linfócito T humano tipo 1</b>
<b>IgM</b>	<b>Imunoglobulina M</b>
<b>IL - 10</b>	<b>Interleucina – 10</b>
<b>IL - 2</b>	<b>Interleucina 2</b>
<b>LP</b>	<b>Linfocitose Persistente</b>
<b>LTL</b>	<b>Região L Terminal</b>
<b>MCH</b>	<b>Complexo principal de histocompatibilidade</b>
<b>mRNAs</b>	<b>Ácido Ribonucleio mensageiro</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido Ribonucléico</b>
<b>VLEB</b>	<b>Vírus da Leucemia Enzoótica Bovina</b>
<b>EUA</b>	<b>Estados Unidos da América</b>
<b>OIE</b>	<b>Organização Internacional de Saúde Animal</b>
<b>UFRPE</b>	<b>Universidade Federal Rural de Pernambuco</b>
<b>UEMA</b>	<b>Universidade Estadual do Maranhão</b>

**MA**      **Maranhão**

**PE**      **Pernambuco**



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Histórico da doença.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Etiologia.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Patogenia e Sinais Clínicos.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>Resposta imunológica.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>Epidemiologia.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6</b>	<b>Diagnóstico.....</b>	<b>26</b>
<b>2.7</b>	<b>Controle e Erradicação.....</b>	<b>27</b>
<b>2.8</b>	<b>Prejuízos à Pecuária Bovina.....</b>	<b>28</b>
	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>
	<b>Artigo 1 - Soroprevalência e fatores de risco associados à leucose enzootica bovina em rebanhos da bacia leiteira do estado do Maranhão.....</b>	<b>43</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>44</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>46</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E METODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>2.1</b>	<b>Área de Estudo e População.....</b>	<b>49</b>
<b>2.2</b>	<b>Amostragem.....</b>	<b>50</b>
<b>2.3</b>	<b>Colheita de Amostra.....</b>	<b>50</b>
<b>2.4</b>	<b>Prova Sorológica.....</b>	<b>51</b>
<b>2.5</b>	<b>Estudos de Fatores de Risco.....</b>	<b>51</b>
<b>2.6</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>51</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>

<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>Agradecimentos.....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>61</b>
	<b>APÊNDICE</b>	<b>70</b>
	<b>Artigo 2 - Avaliação de uma microimunodifusão para o diagnóstico da leucose enzoótica bovina usando protocolo simples para obtenção de antígeno.....</b>	<b>72</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>73</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>75</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>77</b>
<b>2.1</b>	<b>Micro-IDGA.....</b>	<b>77</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Produção de Antígeno.....</b>	<b>77</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Produção de Soro Padrão.....</b>	<b>78</b>
<b>2.2</b>	<b>Realização da Macro-IDGA e Micro-IDGA.....</b>	<b>78</b>
<b>2.3</b>	<b>Comparação dos Testes.....</b>	<b>79</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Estado do Maranhão está localizado a 05° 38' 56" latitude sul e 45° 17' 04" longitude do Meridiano de Greenwich, situado no Meio-Norte do Brasil, ocupa uma área territorial de aproximadamente 331.983,29 km<sup>2</sup>, limita-se ao Norte pelo Oceano Atlântico, ao Sul e Sudoeste, pelo estado do Tocantins, ao Leste pelo estado do Piauí e ao Oeste pelo estado do Pará. Em 2009 as médias de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica, foram de 26,2°C, 81mm e 1.600mm, respectivamente (Laboratório de Meteorologia da Universidade Estadual do Maranhão – LABMET/UEMA, 2009). O Estado possui um efetivo bovino de aproximadamente 6.600.000 cabeças, com crescimento anual de 3% da pecuária leiteira, o que representa um acúmulo de aproximadamente 25% na última década, abaixo da média nacional, porém expressivo. Em 2008 o plantel de vacas de leite era de 625.000 (9,47% do rebanho) das quais, foram ordenhadas 330.000 vacas com produção média de 1,5 L /vaca /dia, com 1.000.000 L / dia, o que denota um baixo nível de especialização desta atividade (INSTITUTO DO AGRONEGÓCIO DO ESTADO DO MARANHÃO – INAGRO, 2009; AGENCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO MARANHÃO - AGED, 2009; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2009).

Nas últimas três décadas foi registrado um significado crescimento da produção de leite no país. Em 2003 houve um crescimento de 4% na atividade, foram produzidos 21,3 milhões de litros de leite, sendo o Brasil o quinto colocado no cenário mundial, com participação de 4,3% do total da produção e respondendo com 66% do volume total de leite produzido no Mercosul (MARTINS, 2003).

A pecuária leiteira tem gerado empregos, superando outros setores como construção civil, siderúrgico, têxtil e indústria automobilística. São mais de 3,6 milhões de trabalhadores empregados diretamente no setor, em aproximadamente 1,1 milhão de propriedades, tornando-se dessa forma, importante também no contexto sócio-econômico (MARTINS, 2003).

Com a globalização do mercado, a bovinocultura de leite, tem enfrentado dificuldades em decorrência da pequena margem de lucro e intensa concorrência interna e externa, o que tem provocado a busca de tecnologias com objetivo de aumentar a eficiência da produção e da qualidade de seus produtos e subprodutos, principalmente a partir do melhoramento genético, da nutrição e da sanidade dos animais (SILVA et al., 2001).

Del Fava e Pituco (2003) citam que embora eleve o valor genético e econômico com a importação de animais, as exigências da alimentação e prevenção, tornam-se fundamentais

para que haja resposta na produção, porém reduz a rusticidade dos animais, que associado à implantação de sistemas de produção intensivo e semi-inteviso, bem como, diversos outros fatores, contribuem para o aparecimento de doenças infecto-contagiosas secundárias, como a mastite, problemas de cascos, etc, advindas em decorrência de imunossupressão provocadas por doenças primárias, entre as quais a Leucose Enzoótica Bovina (LEB), que tem se implantada no rebanho nacional, principalmente de exploração leiteira de forma progressiva. Vários são os estados da federação com registros da LEB, com prevalência média estimada de 27,6% (BIRGEL JUNIOR et al., 2006).

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma doença causada por um *Deltaretrovirus* da família *Retroviridae*, caracterizada por proliferação linfocitária e/ou formação de linfosarcomas, principalmente distribuída em bovinos leiteiros. Os sinais clínicos da LEB desenvolvem-se principalmente em animais com idade de três a oito anos e variam consideravelmente, dependendo dos órgãos afetados. Os animais comprometidos podem apresentar emagrecimento progressivo, queda na produção leiteira, aumento no volume dos linfonódos, infertilidade, falha circulatória e sinais neurológicos (FERRER et al., 1979; RADOSTITS et al., 200; DANTAS et al., 2004). A espécie bovina é acometida naturalmente e experimentalmente tem sido reproduzida em bubalinos, ovinos e caprinos. Como reservatório silvestre tem sido relatado a capivara (SILVA, 2001; LEUZZIR JUNIOR et al., 2003; TOSTES, 2005).

Durante muito tempo o diagnóstico da LEB foi baseado nos sinais clínicos associados aos padrões hematológicos, observados nas chamadas “chaves leucométricas”, que, mormente compreendiam os casos com linfocitose presente. Contudo, com o isolamento do VLB e a introdução do teste sorológico para detecção de anticorpos (Ac) anti-VLB, através da imunodifusão em gel de ágar (IDGA), desenvolvida por Miller et al. (1969), abriu-se novas perspectivas para se conhecer a situação epidemiológica da LEB. Mais tarde surgiram outras provas, tais como, o Radioiunmoensaio (RIA) (MACDONALD e FERRER, 1976), ensaio Imunoenzimático (ELISA) (ALTANER et al., 1982) e a Reação em Cadeia de Polimerase – PCR (AGRESTI et al., 1993). O teste de IDGA e ELISA são os teste referente para a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008) e a União Europeia (COMMISSION DECISION OF 15 DECEMBER, 2009) e também para o teste oficial de muitos governos para fins de importação (EVERMANN, 1992).

No contexto nacional o estado do Maranhão se destaca pela sua atividade pecuária de leite e corte que embora com produtividade baixa, tem importância econômica. A baixa produção de leite pode está associada às doenças infecto-cotagiosas introduzidas com a

importação de bovinos leiteiros, com intuito da melhoria genética, e posterior disseminação nos rebanhos. Porém os criadores pouca importância têm dado à sanidade desses animais sem uma prévia quarentena. Neste contexto, a LEB se apresenta como motivo de preocupação pois, é considerada uma das doenças que mais tem se difundido no mundo (JOHNSON e KANEENE, 1992; LEITE et al., 2001; VANLEEuwEN et al., 2005; SPONCHIADO, 2008).

Pelo exposto, o presente trabalho foi elaborado com o objetivo de estudar os aspectos epidemiológicos da LEB na bacia leiteira do Estado do Maranhão e aperfeiçoar seu diagnóstico.

## **2. REVISÃO DE LEITERATURA**

### **2.1- História da Doença**

A Leucose Enzoótica Bovina foi descrita pela primeira vez na Alemanha em 1871. Após a segunda guerra mundial foram realizados numerosos relatos da LEB praticamente em todos os países da Europa Oriental. Na América do Norte, o vírus foi introduzido através da importação de animais oriundos da região do mar Báltico, no final do século XIX. Com a disseminação da infecção na região, os rebanhos do Canadá também foram infectados. A partir dessas áreas deu-se a disseminação para outras regiões, devido as importações de animais infectados (LEUZZI JUNIOR, et al., 2001). No Brasil a LEB foi descrita pela primeira vez por Rangel e Machado (1943), seguido de Merkt et al.(1959) e a vinculação da doença com importações foi evidenciada por Modena et al. (1983), que relataram a ocorrência de infecção pelo VLEB em animais procedentes dos Estados Unidos e Canadá.

### **2.2. Etiologia**

O Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (VLEB), denominado oficialmente *Bovine leukemia virus*, pertence ao gênero *Deltaretrovirus* da subfamília *Orthoretrovirinae*, família *Retroviridae* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2009). O prefixo retro origina-se da enzima transcriptase reversa (DNA polimerase RNA - dependente) que está presente nos vírions de todos os membros da família, responsável pela síntese de DNA a partir do RNA viral. O vírion do VLEB tem formato esférico e apresenta diâmetro de 80 a 100 nm. Miller e Van Der Maaten (1976) demonstraram que o vírus é composto por várias proteínas, de diferentes pesos moleculares, identificadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. A maior concentração de proteínas é da p24, localizada no capsídeo viral, com peso molecular de aproximadamente 24.000D. No envelope do VLEB são encontradas as glicoproteínas gp30 e gp51. A gp51 é responsável pela infecção do vírus,

aderindo-se a um receptor celular do hospedeiro, para dar início ao processo de infecciosidade. O VLEB pode ser neutralizado por anticorpos dirigidos contra a gp51, podendo também inibir a formação desses anticorpos Onuma et al.(1975); Miller e Van Der Maaten (1976).

Os retrovírus são inativados por solventes e detergentes lipídicos, tais como: álcool, éter e clorofórmio. Também pode ser inativado pela temperatura de 56°C durante 30 minutos. Entretanto, são mais resistentes a raios ultravioletas e radiações – X do que outros vírus (FENNER et al., 1993).

### **2.3. Patogenia e Sinais Clínicos**

Após penetração no organismo do hospedeiro, o VLEB tem tropismo pelos linfócitos B (AIDA et al., 1989). Uma vez infectado, não se observa sinais de viremia, mesmo assim ocorre a produção de anticorpos contra as proteínas estruturais (GARCIA et al., 1995).

O vírus possui em seu envelope complexo de glicoproteínas, gp51 e gp30, que exercem um importante papel na infecção viral, mediando a infecção. A glicoproteína externa, gp51, liga o vírus à célula alvo (linfócito B) enquanto que a glicoproteína transmembrânica, gp30, ancora o envelope do vírus na membrana plasmática da célula infectada (SUZUKI e IKEDA, 1998).

No início da infecção, o vírus através de seu cDNA se replica dando origem aos vírions, que podem escapar da ação das células hospedeiras e infectar outras células. Os vírions estão sempre protegidos no íntimo celular e aqueles que estão circulando extracelular podem ser neutralizados pelas células de defesa (REBRUN, 2000; LEITE et al., 2004).

Assim o VLEB estabelece uma infecção sem sinais clínicos, caracterizados pela presença de anticorpos anti-VLEB, onde poucos linfócitos B são infectados. Menos de 5% das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) possuem os provírus. A infecção persiste por toda a vida do animal, porém a evolução da infecção com quadros clínicos não ocorre em 65% dos bovinos infectados (COCKRELL e REYES, 2000). Uma das características dos animais infectados pelo VLEB é a produção persistente de anticorpos, sugerindo uma constante estimulação do sistema imunológico por antígenos virais (BURNBY et al., 1988).

A partir de cinco anos de portador do vírus, pode ocorrer à evolução da doença para linfocitose persistente (LP), em aproximadamente 30% dos animais. A LP é o aumento policlonal e persistente de linfócitos B na circulação sanguínea, também considerada como uma forma benigna da doença (DEPELCHIN et al., 1989; LEITE et al., 2004). Após 10 anos,

o organismo infectado manifesta a forma tumoral da doença em 5% dos animais, ocorrendo uma proliferação monoclonal (oligoclonal) de linfócitos B, desenvolvendo os linfomas e/ou linfossarcomas Miller Van Der Maaten 1982; Cockrell e Reyes (2000).

Para Ferrer (1980) a principal característica da doença é o aumento dos linfonodos do animal, sendo comuns na região retrobulbar, onde causa exoftalmia uni ou bilateral, e na área faríngea, causando disfagia e estertores durante a respiração. A forma entérica da doença é caracterizada pelo alargamento da submucosa do abomaso. Pode haver o envolvimento dos linfonodos mesentéricos, associados com a infiltração do abomaso, sendo que estes podem se apresentar com volume suficiente para causar obstrução. Também é possível observar o envolvimento do átrio direito, epicárdio e infiltração no miocárdio.

Fetrow e Ferrer (1982) relatam que o VLEB pode atuar como agente imunossupressor, predispondo o animal a outras doenças, bem como, alta prevalência (10 a 15%), animais adultos infectados podem morrer devido a esta enfermidade. A idade média de animais de exploração leiteira é sete anos, geralmente muitos animais apresentam sinais clínicos e são descartados mais cedo, devido a vários transtornos, como infertilidade e queda na produção de leite, que podem estar relacionados à LEB.

#### **2.4. Resposta Imunológica**

Segundo Leite et al. (2004), qualquer infecção leva o sistema de defesa a uma reação e, não é diferente para o VLEB, provocando resposta imune humoral e celular. Cerca de um terço dos animais infectados pelo VLB desenvolvem LP e 5% linfossarcoma, provocando dessa forma, uma menor resposta imune humoral e celular. Acredita-se que certas proteínas retrovirais atuam como imunossupressoras e/ou que a interleucina - 10 (IL - 10) observadas em animais com LP, teriam efeitos inibitórios nas funções das células T auxiliares e também provocariam uma alteração na relação entre linfócitos T/B (ORLIK e SPLITTER, 1996; SPONCHIADO, 2008).

Na resposta humoral os anticorpos de animais infectados apresentam estrutura e reatividade biológica alteradas, uma menor concentração de imunoglobulinas M (IgM) e também redução no número de células produtoras dessas imunoglobulinas no baço e linfonodos. O linfócito B infectado sofre alteração na composição de açúcares da membrana plasmática, sendo assim, os mesmos seriam eliminados durante o estágio inicial da maturação, sugerindo que isso possa interferir na produção das imunoglobulinas (BURNY, 1988). Segundo Garcia et al. (2002), os animais infectados pelo VLEB e que não desenvolvem a forma tumoral da doença, não apresentam diminuição de sua resposta imune humoral.

## 2.5. Epidemiologia

Em muitos trabalhos tem sido relatados a associação da LEB com os fatores de riscos, tais como, uso repetitivos de agulhas, luvas obstétricas, aquisição de animais, ausência do médico veterinário e outros (SILVA, 2001; FENANDES et al., 2007; SPONCHIADO, 2008).

As vias de penetração do VLB comprovadas experimentalmente são: oral, intraperitoneal, intratraqueal, intra-uterina, intradérmica, intramuscular, subcutânea, intravenosa e intra-retal (MILLER et al., 1972; ROBERTS et al., 1982; JOHNSON e KANEENE, 1992; HOPKINS e DIGIACOMO, 1997).

A transmissão do VLEB ocorre de forma vertical e horizontal. A vertical pode ser demonstrada pela soropositividade de bezerros recém-nascidos antes da ingestão do colostro, variando de 3 a 20% (HÜBNER et al., 1996; LEUZZIR JÚNIOR et al., 2001; DEL FAVA e PITUCO, 2003). Ferrer e Piper (1981) comprovaram que o VLB pode ser transmitido pelo colostro e leite. A transmissão horizontal ocorre pela veiculação de material contendo linfócitos infectados, onde o vírus permanece viável. Isto acontece pela manipulação de fômites contaminados, como material cirúrgico, seringas, agulhas, tatuadores e luvas obstétricas (FERRER et al., 1979; ALECAR FILHO et al., 1981; FREITAS et al., 1982; JOHNSON e KANEENE, 1992; SPONCHIADO, 2008). Trabalhos realizados por Miller e Van der Maaten (1982) demonstraram que a transmissão horizontal é a principal via de disseminação do vírus, através da exposição direta a fluidos biológicos contaminados com linfócitos infectados, principalmente sangue, leite e saliva. Foi demonstrado que 2.500 linfócitos contidos em 0,0005 ml de sangue, inoculados via intradérmica são suficientes para causar infecção em bovinos (FERRER et al., 1979; ALENCAR FILHO et al., 1981; JOHNSON e KANEENE, 1992).

O VLEB pode ser transmitido também, pelas moscas, em decorrência de alternância alimentar em diferentes hospedeiros, situação que proporciona ampla oportunidade para que estes vetores possam transmitir o agente infeccioso (JOHNSON e KANEENE, 1992; LEUZZIR JÚNIOR et al., 2001).

Para Miller e Van Der Maaten (1979) e Braga et al. (1998), a transmissão pela inseminação artificial só pode ocorrer se as amostras de sêmen estiverem contaminadas com leucócitos contendo o genoma viral, se for contaminado com sangue durante a colheita. Pituco et al. (2001) avaliaram 230 touros de diversas Centrais de Inseminação Artificial no Brasil utilizando o teste de ELISA, detectaram 17,4% de animais sororeagentes. Del Fava e Pituco (2004), ao avaliarem sêmen de touros soropositivos infectados para a inseminação artificial



e/ou cobertura natural em vacas negativas demonstraram que essa via não tem significado para transmissão.

Hopkins e Digiacomo (1997) consideram que a transmissão do VLEB pela manipulação retal com luvas obstétricas pode acontecer, pois ao inocularem 2 ml de sangue de animais infectados no reto de animais não infectados, simulando o diagnóstico de prenhez ou a inseminação artificial, todos os animais apresentaram anticorpos anti-VLEB no sangue no período de cinco semanas pós inoculação.

Bouillant et al. (1982) examinaram 26 óvulos de sete vacas infectadas com o VLB e 60 embriões de 20 vacas também infectadas, e não observaram evidências de infecção dos mesmos. Mais recentemente, Choi et al. (2002) relatam que não há praticamente transmissão do VLB através do sêmen, óvulo ou embrião, desde que sejam manejados corretamente.

Estudos realizados por Johnson e Kaneene (1992) a LEB estão distribuídos em todos os continentes, com exceção da Alemanha, Dinamarca, Finlândia e Nova Zelândia. A incidência difere entre os países (0,02 a 52%) principalmente entre os bovinos de exploração leiteira (SPONCHIADO, 2008)

Descrita pela primeira vez na Alemanha, onde em 1983 já apresentou redução considerável da sua prevalência de 0,05%, atualmente a LEB é considerada erradicada nesse país (RADOSTITS et al., 2002, SPONCHIADO, 2008). Em outros países do Continente Europeu, variadas prevalências têm sido descritas: Bélgica, 28,6% (MAMMERIKCS et al., 1978); França, 0,06% (NOUGAYREDE et al., 1978); Áustria, 2,2% (BURKI, 1982); Grécia, 0,02% (DIMITRIADES e ARTAVANIS, 1984); Hungria, 19,39% (TEKES et al., 1984); Bulgária, 22,26% (SANDEV et al., 2006). Estudos sorológicos realizados no Canadá encontraram prevalências que variam entre 11,2 e 60,8% (SAMAGH e KELLAR, 1982, VANLEEUVEN et al., 2001, VANLEEUVEN et al., 2005, SCOTT et al., 2006; VANLEEUVEN et al., 2006).

No Oriente Médio, Brenner et al. (1986) em Israel, encontraram uma prevalência de 24%. No Japão foi descrita uma prevalência de 36,20% (ONUMA et al., 1978; ONUMA et al. 1979).

Na Oceania, destacam-se os estudos realizados por Dimmock et al. (1991) na Austrália, com 13%, Nova Zelândia, 0,3% (PARRISH et al., 1982), Papua Nova Guiné, 5,5% (WERNERY e SOHMIDT, 1985).

No Continente Africano, Heinonen e Assefa (1995) realizaram trabalhos de sorologia em bovinos da Etiópia, relataram prevalência de 21%. No Egito, foram descritos resultados de 37,7% para animais jovens e 72,7% animais acima de dois anos (ZAGHAWA et al., 2002).

Nos Estados Unidos da América, Burridge et al. (1981) estudaram a prevalência da LEB no estado da Florida (EUA) em 7.768 animais de aptidão leiteira com idade acima de 18 meses e em 4.911 de bovinos de corte. Os resultados demonstraram que 47,8% e 6,7% dos animais leiteiros e de corte eram positivos, respectivamente. No Canadá, na região de Manitoba, foi realizado um estudo em 1.204 vacas de leite e 1.425 vacas de corte, obtiveram-se uma prevalência de 60,8% e 10,3%, respectivamente (VANLEEUEWEN et al., 2006).

Na América Central, na Costa Rica, foram descritos dados de prevalência de 27,8% (DUCREAU et al., 1987).

Na América do Sul, foram descritas prevalências na Argentina, por Brunel et al. (1981) e Ghezzi et al.(1997), variando de 31,5 a 50%. Na Colômbia, Afonso et al. (1998) encontraram prevalência de 45,28% e na Venezuela Marin et al. (1978) de 49,10%. Pesquisas realizadas no Brasil têm demonstrado uma freqüência variável da infecção em rebanhos leiteiros, com média de 26,70% (BIRGEL JÚNIOR et al., 2006).

No Brasil o primeiro relato da LEB foi feito por Rangel e Machado (1943). Estudos epidemiológicos têm demonstrado ampla distribuição de animais sororeagentes em todas as Regiões do país. Com base nos relatos de estudos com bovinos leiteiros as seguintes prevalências médias são estimadas para cada Região: Norte, 18,30% (ABREU et al., 1990; MOLNAR et al., 1999; CARNEIRO et al., 2003), Nordeste, 29,94% (MELO et al., 1991 ; TAVORA e BIRGEL, 1991; SIMÕES, 1998; SILVA, 2001; SIMÕES et al., 2001; TENÓRIO, 2003; MATOS e BIRGEL, 2005), Centro-Oeste, 40,13 (ANDRADE e ALMEIDA, 1991), Sudeste, 46,72% (LEITE et al., 1980; ROMERO; ROWE, 1981; CUNHA et al., 1982; MODENA et al., 1983; LEITE et al., 1984; BIRGEL et al., 1988a; BIRGEL et al., 1988b; BIRGEL et al., 1991; ARITA et al., 1992; BIRGEL JUNIOR et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1997; D'ANGELINO et al., 1998; CAMARGO et al., 2002; MEGID et al., 2003), Sul, 34,41% (LIMA et al, 1980; KANTEK et al., 1983; GOMES et al., 1985; FLORES et al., 1988; FLORES et al., 1990; CARVALHO et al., 1996; MORAES et al., 1996; VAN DER LAAN et al., 1999; LUDRS, 2001; LEUZZIR JUNIOR et al., 2003; POLLETO et al., 2004; SPONCHIADO, 2008;). Não foram encontrados registros de trabalhos relacionados à LEB nos estados do Amapá, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Sergipe.

## **2.6. Diagnóstico**

O diagnostico da LEB é fundamental para o controle e posterior erradicação da doença. Diferentes métodos podem ser empregados dentre estes: observação persistente do

aumento do número de linfócito B (LP) e por sorologia, para identificação de anticorpos específicos contra o vírus da LEB (LEUZZI JÚNIOR et al., 2001).

Após o isolamento e cultivo do vírus, várias técnicas para detecção de anticorpos foram descritas, como a imunodifusão em ágar-gel - IDGA (MILLER e VAN DER MAATEN 1976) e ensaios Imunoenzimáticos - ELISA (ALTANER et al. 1982), as mais utilizadas, e o Radioimunoensaio - RIA (MACDONALD e FERRER, 1976). Para detecção do ácido nucléico viral foi desenvolvida a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (AGRESTI et al. 1993).

No Brasil os primeiros estudos foram realizados por Rangel e Machado (1943), seguido de Merkt et al. (1959), Alencar Filho (1970), Birgel et al. (1974) e Modena (1981).

Estudos realizados por Birgel (1982) relatam que as chaves leucométricas são muito falhas, detectando apenas 61,5% dos casos positivos. As chaves sofreram diversas adaptações, sobretudo nos países europeus (TOSTES, 2005). Com o decorrer do desenvolvimento das pesquisas, entre elas, o isolamento do VLB por Miller et al. (1969) e a introdução de testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-VLB, estas chaves caíram em desuso (EVERMANN, 1992; TOSTES, 2005).

Para a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, 2008) e União Européia (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2009) os testes de referência são a IDGA e ELISA, com a finalidade de certificação para o trânsito internacional de bovinos.

## **2.7. Controle e Erradicação**

A OIE (2009) recomenda que a base do Programa de controle da LEB é o levantamento sorológico para identificação de animais sororeagentes. Brunner et al. (1997) relataram que no Estado de Nova York (USA) a partir de 1985 foi criado um programa de erradicação e certificação de propriedades livres do VLEB. Nuotion et al. (2003) citaram que a Finlândia levou 30 anos para erradicar a LEB e continuam fazendo o monitoramento anual. Outros programas têm sido propostos para controle da doença, tais como: levantamento e monitoramento sorológico dos animais de propriedades e aquelas que a prevalência for alta entre 60 e 80% dividirem o rebanho em positivos e negativos, dificultando dessa forma a transmissão do VLB e quando o índice for baixo o ideal seria eliminar os animais positivos (CORDEIRO et al., 1994; BRUNNER et al., 1997; DEL FAVA e PITUCO, 2003).

O primeiro programa oficial para o controle e erradicação da LEB foi estabelecido na Dinamarca, tendo seu início em 1959. A partir desta data a doença tornou-se de notificação

obrigatória e que rebanhos considerados soropositivos eram eliminados com posterior pagamento de indenização ao produtor (JOHNSON e KANEENE, 1992).

Alguns países já erradicaram a LEB, como Dinamarca, Alemanha e Finlândia (RADOSTITS et al., 2002; NOUTION et al., 2003); Estados Unidos e Canadá estão em processo de erradicação (BRUNNER et al., 1997; VANLEEUEWEN, 2004). A maioria dos países ainda não tem programa de controle e certificação de propriedades livres do VLB, inclusive o Brasil (DEL FAVA e PITUCO, 2003).

## **2.8. Prejuízos à Pecuária Bovina**

Os criadores ainda não atentaram para a importância da doença pelos prejuízos causados, tais como: descarte dos animais em decorrência do quadro clínico (linfossarcoma), interrupção nas barreiras internacionais do comércio de animais vivos, interferir na produção e produtividade, condenação de carcaças em abatedouros com inspeção e gastos com médicos veterinários (OIE, 2009).

Pollari et al.(1992) e Ott et al. (2003) relacionaram que ao examinarem 1.006 rebanhos de 20 estados (USA) foi verificado queda na produção de leite e gordura. Cada rebanho era constituído no mínimo por 30 vacas. Os rebanhos doentes deixavam de produzir na ordem de 218 Kg de leite por vaca infectada. No final do estudo calcularam que as perdas para os produtores eram de 285 milhões de dólares, enquanto para os consumidores eram de 240 milhões de dólares.

Vanleeuwen et al. (2004), no Canadá, estudou o impacto na economia de produtores que tinham vacas com LEB. Concluíram que em um rebanho soropositivo formado por 50 vacas, provocava morte dos animais, aborto em decorrência dos linfossarcomas no útero, diminuição na fertilidade além dos prejuízos diretos, tais como, serviços veterinários, medicamentos, mão-de-obra, acarretavam danos financeiros na ordem de \$807 dólares / vaca / ano para o proprietário.

D'Angelino (1991) realizou no Brasil um trabalho, levando em consideração os fatores de produção diária de leite em animais de segunda, terceira e quarta lactação, relacionou a doença com a produção e o descarte de animais devido à LEB. Chegou à conclusão que a média diária de produção de leite caía em 11% nos animais doentes quando comparados aos animais sadios, bem como, a produção foi bem menor quando comparados entre os animais de segunda, terceira e quarta lactação, porém não encontraram nenhuma diferença quanto aos fatores reprodutivos, tais como, intervalos entre partos, coeficiente de natalidade e descarte de animais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, V. L. V. et al. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina nos Estados de Rondônia e Acre. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 2, n.3, p. 203-210, 1990.

AGENCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO MARANHÃO – AGED, 2009. Acessado em: 18 novembro/2009. Disponível em: [www.aged.gov.br](http://www.aged.gov.br).

AGRESTI, A.. et al. Use of polymerase chain reaction to diagnose leukemia vírus infection caíves at birth. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 54, n. 3, p. 373-378, 1993.

AIDA, Y.et al. Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, Scchaumburg, v. 50, p. 1946-1951, 1989.

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

ALENCAR FILHO, R. A.; RODRIGUES, F. M.; VIANA, W. O. Alterações do leucograma em bovinos positivos a imunodifusão para Leucose Enzoótica. **O Biológico**, São Paulo v. 47, n. 4, p. 103-106, 1981.

ALFONSO, R.; ALMANSA, J. E.; BARREIRA. Sorological prevalence and evolution of the risk factors of bovine leukosis in the Bogotá savannah and the Ubate and hiquinquirá Vatlays, Colômbia.**Revue Scientifique et Technique Office International des Epizoaties**, Paris, v. 17, n. 3, p. 723-732, 1998.

ANDRADE, J. R. A.; ALMEIDA, M. M. R. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina na Bacia Leiteira de Goiânia, Goiás. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 10, n. 60, p. 49-53, 1991.

ALTANER, C.; ZAJAC, V.; BAN, J.A. A simple and inexpensive metod for detection of BLV infected cattle based on modified ELISA principal. **Zentralblatt für Vetemärmedizin**, Berlin, v. 29, n. 8, p. 583-590,1982.

ARITA, G. M. M. et al. Estudo epidemiológico da Leucose Enzoótica dos bovinos no Vale do Paraíba, São Paulo, **Resumos**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento no Estado de São Paulo. 1992. p. 30

BIRGEL, E. H. et al. Influência da premunicação no quadro leucocitário de bovinos da raça Holandesa importados do Canadá. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1974. p. 161-162.

BIRGEL, E.H. Leucose Enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínico e diagnóstico. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, E.J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 249-260.

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: Sociedade paulista de Medicina Veterinária, 1988<sup>a</sup>. 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 anticorpos séricos por imunodifusão com antígeno viral. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 43. , 1988, Campinas **Resumos**. Campinas: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1988b. p. 31.

BIRGEL, E. H. et al. A ocorrência da infecção causada pelo vírus da leucose bovina no Estado de São Paulo. **Brasilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.28, n. 1. p. 67-73, 1991.

BIRGEL JUNIOR, E. H. et al. Prevalência da infecção pelo Vírus da leucose dos Bovinos, em Animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 4; p. 93-99, 1995.

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.

BOUILLAN, A. M. P. et al. Attempts to isolate bovine leukemia and bovine syncytial viruses from blood, uterine flush fluid, unfertilized ova and embryos from infected donor cattle. **American Research Veterinary**, Canadá v. 12, n. 4, p. 385-395, 1982.

BRAGA, F. M.; VAN DER LAAN, C. W.; SCHUCH, L. F.; HALFEN, D. C. Infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (BLV). **Cienc.Rural**, Santa Maria, v. 28, n.1, Jan/Mar, 1998

BRENNER, J. et al. Prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infectivity in some Israeli dairy herds. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Raanana, v. 9, n. 1, p. 11-15, 1986.

BRUNEL, E. M. et al. Leukosis enzoótica bovina. Tasa de prevalência en la provincial de Formosa (República Argentina) mediante la prueba de inmunodifusion en gel de agar com antígeno glicoprotéico. **Revista de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 62, n. 6, p. 486-490, 1981.

BRUNNER, M.A.; LEIN, D.H.; DUBOVI, E.J. Experiences with the New York State Bovine Leukosis Virus eradication and certification program. **Veterinary Clinics North America : Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 13, n. 1, p. 143-150, 1997.

BURKI, F. Experiences gained and progress achieved with BLV bovine leucosis virus elimination from Austria livestock In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BOVINE LEUKOSIS , 4., 1980, Bologna. **Anais...** Bologna: The Hague, Martinus Nijhoff, 1982. p. 516-528.

BURNY, A. Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 17, p. 197-218, 1988.

BURRIDGE, M. J.; PUHR, D. M.; HANNEMANN, J. M. Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 179, n. 7, p. 704-707, 1981.

CAMARGOS, M. F. et al. Frequência da soropositividade para Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos de Minas Gerais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 5, p. 20-26, 2002.

CARNEIRO, P.A.M. et al. Prevalência da Infecção pelo Vírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado do Amazonas, Brasil. **Acta-Amazonica**, Manaus, v. 33, n. 1, p. 111-125, 2003.

CARVALHO, L. et al. Prevalência de anticorpos séricos de anti-vírus da Leucose dos Bovinos em animais da raça Holadesa preta e branca e zebuínos da raça nelore, criados no Pólo Regional de Londrina, Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 17, n.1, p. 53-57, 1996.

CHOI, K. Y.; MONKEN, D.; STOTT, J. Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bull. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 14, p. 403-406, 2002.

COCKERELL, G. L.; REYES, R. A. Bovine Leukemia Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders. In: SCHALM, O. W. Et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Lippincott: Williams & Williams, 2000. p. 614-619.

CORDEIRO, J. L. F. et al. Identificação e controle da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) em um rebanho leiteiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 8, p. 1287-1292, 1994.

CUNHA, R. G.; TEIXEIRA, A. C.; SOUZA, D. M. Antígenos do Vírus da Leucose Bovina e anticorpos precipitantes em soros de bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 9, p. 1363-1370, 1982.

D'ANGELINO, J. L. **Leucose enzoótica dos bovinos, estudo retrospectivo da performance produtiva e reprodutiva de animais infectados e não infectados**. Ano. 1991, 85 fl. Tese (Livre Docência em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

D'ANGELINO, J. R.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 30, p. 13-15, 1998.

DANTAS, F. R. et al. Linfossarcoma orbital em bovinos – Relato de casos. **Ver. Brás.Med. Vet.**, Garanhuns, v.26, n.2, p. 83 – 87, 2004



DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M. Infecção pelo vírus da Leucemia Bovina (BLV) no Brasil. **O Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 3-10, 2003.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M. Infecção pelo vírus da Leucose Bovina (BLV) no Brasil. **Biológico**, São Paulo, v. 66, n. 1 / 2 , p. 1 – 8, jan/dez. 2004

DIMITRÍADES, I. A.; ARTAVANIS, S. Seroepidemiological study of bovine leukemia virus infection in Greece (Peloponnisos) In: INTERNATIONAL SYPOSIUM OF BOVINE LEUKOSIS, 5., 1982, Tubingen, **Anais...Tubingen: Commission of the European Communities**, 1984. p. 351-354.

DIMMOCK, C. H.; CHUNG, Y. S.; MACKENZIE, A. R. Factors affecting the natural transmission of bovine leukemia virus infection in Queensland dairy herds. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 68, n. 7, p. 230-233, 1991.

DUCREAU, F. et al. Estuda sobre leucosis viral bovina em Ganado *Bos indicus* em Costa Rica. **Ciências Veterinárias**, México City, v. 9, n. 2/3, p. 95-99, 1987.

ERVERMANN, J. A. A look at how Bovine Leukemia Virus Infection is diagnosed. **Veterinary Medicine**, Washington, n. 87, p. 272-278, 1992.

FENNER, J. F.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A. **Veterinary Virology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993. Cap. 33, p. 561-595.

FERNANDES, C. H. C. **Leucose Enzoótica dos Bovinos: soroprevalência, fatores de risco e níveis séricos de lisozima em bovinos leiteiros do estado do Tocantins**, Tese (Doutorado) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2007. 83f.

FERRER, J.F. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: a review. **Journal of the American Medical Association**, Washington, v. 175, n. 12, p. 128-136 1979.

FERRER, J. F.; CABRADILLA, C.; GUPTA, P. Bovine Leukemia. A model for viral carcinogenesis. In: *Virusis in naturally occurring cancers* Cold Spring Harbor Conference. **Cold Spring harbor laboratory**, Washington 7. p. 887-899, 1980.

FERRER, J.F.; PIPER, C.E. Role of colostrum and milk in the natural transmission of the Bovine Leukemia Virus. **Cancer Research**, Baltimore, v. 41, p. 4906-4909, December, 1981.

FETROW, J; FERRE, J. F. Bovine leukemia virus infection and mastitis. **Journal of Dairy Science**, Washington, v.65, p. 881-882, 1982.

FLORES, E. F. et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da Leucose Bovina (VLB) no rebanho leiteiro de Santa Maria, RS. **Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 67-73, 1988.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; REBELATTO, M. C. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB) na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Hora Veterinária**, Santa Maria, v. 10, n. 58, p. 25-29, 1990.

FREITAS, T. R. P.; ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Recuperação da infectividade do vírus da Leucemia Bovina de Leucócitos ingeridos pela mosca do estábulo *Stomoxys calcitrans*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 18., 1982, Camboriú. **Anais...** Camboriú: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1982. p. 69.

GARCIA, M. et al. Efeito da infecção pelo vírus da leucose na ocorrência de mastite em bovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 15 n. 88, p. 41-44, 1995.

GARCIA, M. et al. Concentração sérica de gamaglobulinas em bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 62- 66, 2002.

GOMES, M. et al. Detecção de anticorpos séricos contra o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (VLB) em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 13, p. 15-22, 1985.

GREZZI, P. C. et al. Prevalence of bovine leukaemia virus (BLV) in the “ Mar y Sierras” dairy production área of Argentina between 1994 and 1995. **Rev. Argent. Microbiol. Argentina**, n.29, p. 137 – 146, 1997.

HEINONEN, M.; ASSEFA, W. Some observations on bovine leukosis virus antibodies in Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 27, p. 225-226, 1995.

HOPKINS, S. G.; DIGIACOMO, R. F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 13, n. 1, p.107-128, 1997.

HÜBNER, S. O. et al. Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 2/3, p. 87-90, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE 2006. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br), acesso em: 17/03/2009.

INSTITUTO DO AGRONEGÓCIO DO ESTADO DO MARANHÃO – INAGRO. **Quantitativo Bovino do Estado do Maranhão**. 2008, p.29, Disponível em: [www.inagro.gov.br](http://www.inagro.gov.br). Acessado em: 12 de outubro de 2009.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV, 2009 Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhep=1>, Acessado em: 21 Jan. 2010.

JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v. 62, n. 4, p. 287-314, 1992.

KANTEK, C. E.; KRUGER, E. R.; WELTER, V. R. Prevalência do vírus da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 3, p. 125-129, 1983.

KERKHOFS, P. et al. In Vitro and In Vivo Oncogenic potential of Bovine Leukemia Virus G4 Protein. **Journal Virology**, Washington, D.C., v. 72, n. 3, p. 2554-2559, 1998.

LABMET. **Informações Climáticas**. Disponível em: [www.nerh.uema.br/meteoro/meteoro.htm](http://www.nerh.uema.br/meteoro/meteoro.htm). Acessado em: 16 de junho 2009.

LEITE, R. C. et al. Leucose enzoótica bovina em Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17, 1980, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, Universidade Estadual do Ceará, 1980. p. 207.

- LEITE, R. C. et al. Evolução clínica da Leucose Enzoótica Bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 47-57, 1984.
- LEITE, R. C.; CAMARGO, M. F.; LOBATO, Z. E. P. Leucose Enzoótica Bovina. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, DF, n.24, p. 20-29, 2001.
- LEITE, R.C.; LOBATO, Z.I.P.; CAMARGOS, M.F. Leucose Enzoótica Bovina. **Revista Conselho Federal Medicina Veterinária**, Brasília, DF, n. 31, p. 20-28, jan./abr. 2004.
- LEUZZI JR, L.A.; ALFIERI, F.A.; ALFIERI, A.A. **Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina**. Companhia Agrárias, Londrina, v.22, n.2, p.211-221, jul/dez, 2001.
- LEUZZI JR, L.A. et al. Influência da idade e do tamanho do rebanho na soroprevalência da leucose enzoótica bovina em rebanhos produtores de leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v.10, n.1, p.21-22, 2003.
- LIMA, E. G.; HAYSSAKA, I. M.; PEINADO, M. Inquérito sorológico para Leucose bovina em gado importado. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.9, n. 3-4, p. 137-143, 1980.
- LUDRS, M. A. **Prevalência de anticorpos contra o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina em fêmeas com mais de dois anos no Rebanho de Bovinos Leiteiros no Município de Mafra-SC**. 2001 30f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agroveterinária/Sanidade Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lajes, 2001.
- MAMMERICKX, M. et al. Eradication of enzootic bovine leukosis based on the detection of the disease by the gp- 51 immunodiffusion test. **Annalis de Recherches Veterinaires**, Paris, v. 9, n. 4, p. 885-894, 1978.
- MARIN, C. et al. Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. **Analises de Recherches Veterinaires**, Venezuela, v. 9, n. 4, p. 743-746, 1978.
- MARTINS, M.C. Agronegócio do Leite. **Informe Econômico do Leite**, Brasília, ano 3, n. 3, abr, 2003.
- MATOS, P. F.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre resultados do teste de Elisa e imunodifusão em gel de agar. **Brasilian Journal of Veterinary Research the Animal Science**, São Paulo, v. 42, p. 171-180, 2005.

MCDONALD, R.; FERRER, J. F. Detection, quantitation and characterization of the major internal virion of the bovine leukemia virus by radioimmunoassay. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 57, n. 4, p. 875-882, 1976.

MEGID, J. et al. Ocorrência da Leucose Enzoótica Bovina na Microregião da serra de Botucatu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, 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.** 1991. 102f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bovina), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MERKT, H.; GIUDICE, J. C. O.; MÜLLER, J. A. 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**, Porto Alegre, v.2, p. 7-19, 1959.

MILLER, J. M. et al. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures in reference to bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 43, p. 1297-1305, 1969.

MILLER, L. D.; MILLER, J. M.; OLSON, C. Inoculation of calves with particles resembling C-type virus from cultures of bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v.48, n.2, p.423-428, 1972.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN. Use of glycoproteins antigen in the immunodiffusion tests for bovine leukemia virus antibodies. **European Journal of Cancer**, Amsterdam, v. 15, p. 1369-1375, 1976.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN. Use of glycoproteins antigen in the immunodiffusion tests for bovine leukemia virus antibodies. **European Journal of Cancer**, Amsterdam, v. 15, p. 1369-1375, 1977.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Infectivity test of secretion excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v.62, p.425-428, 1979.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Bovine leukosis – Its Importance to the Dairy Industry in the United States. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 11, 1982.

MODENA, C. M. Leucose Enzoótica Bovina. I - Comparação entre métodos de diagnóstico. II - Evolução sorológica em bezerros. III - Interferência com a vacina anti-febre aftosa. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 624-625, 1981.

MODENA, C. M. et al. Ocorrência da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina em animais importados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 565-573, 1983.

MOLNÁR, E. et al. Ocorrência de leucose enzoótica dos bovinos no Estado do Pará, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 171-175, 1999.

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

NOUGAYREDE, P.; QUENTEL, C.; GAYOT, C. Enzootic bovine leucosis: an epidemiological survey among cattle in the west of France by precipitating antibody detection. **Annale de Recherches Veterinaires**, Paris, v. 9, n. 4, p. 755-760, 1978.

NUOTION, L. et al. Eradication of bovine leucosis from Finland. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.59, n.1-2, p.43-49, 2003.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Capítulo 2.3.4. **LEUCOSE BOVINA ENZOÓTICA**. Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004, Disponível em: <http://www.oie.int/Norms/MCode/htm>>. Acesso em: 17 mar 2008.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Capítulo 2.3.4. **LEUCOSE BOVINA ENZOÓTICA**. Manual de la OIE sobre animales terrestreS, 2004, P. 503-513. Disponível em: <http://www.oie.int/Norms/MCode/htm>>. Acesso em: 25 mar 2009.

OLIVEIRA, A. R. et al. Epidemiologia da Leucose Bovina: Ocorrência de anticorpos em faixa etárias. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 6, p. 258 - 262 1997.

ONUMA , M.; OLSON, C.; BAUMGARTNER , L. E. An ether sensitive antigen associated with bovine leukemia virus infection. **Journal National Cancer Institute**, Cary, v. 55, p. 1155-1158, 1975.

ONUMA, M.. et al. Survey for antibodies to bovine leukemia virus in dairy and beef cattle in Japan. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v. 40, n. 6, p. 691-696, 1978.

ONUMA, M.. et al. Seroepizootiological survey on antibodies against bovine leukemia vírus on japanese black cattle. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v. 41, n. 6, p. 601- 605, 1979.

ORLIK, O.; SPLITTER, G. A. Progression to persistent lymphocytosis and tumor development in bovine leukemia virus (BLV)-infected cattle correlates with impaired proliferation of CD4+ T cells in response to *gag*- and *env*-encoded BLV proteins. **Journal Virology**, Washington D.C., v.70, p.7584-7593, 1996.

OTT, S. L.; JOHNSON, R.; WELLS, S. L. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.61, p.249-262, 2003.

PARRISH, C. R. et al. Bovine leukemia virus infection in New Zealand cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellinston, v.30, n. 5, p. 56-58, 1982.

PITUCO, E.M. et al. Aspectos sanitários da Leucose Enzoótica Bovina em reprodutores de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4., 2001, Campo Grande. **Resumos**. Campo Grande: Sociedade Brasileira de Buiatria, 2001.

POLLARI, F. L. et al. Effect of bovine leukemia vírus infection on production and reproduction in dairy cattle. **Canadian Journal Veterinary Research**, Ottawa, v. 56, p.289-295, 1992.

POLLETO, R. et al. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Paço Fundo, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 595-598, 2004.

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

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. **Clínica Veterinária** 9 ed. Guanabara-Koogan, 2002, p. 940-951.

REBHUN, W. C. **Doença do gado leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000, p. 596-605.

ROBERTS, D. H. et al. Detection of bovine leukosis virus in bronchoalveolar lung washing and nasal secretions. **Veterinary Record**, New Haw, v. 11, n. 22, p. 501-503, 1982.

ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrech, v.13, n. 2, p. 107-111, 1981.

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

SANDEV, N. et al. Prevalence of enzootic leukosis in the Republic of Bulgaria in 1997-2004. **Veterinarski Archiv**, Zagreb, v. 73, n. 3, p. 263-268, 2006.

SCOTT, H. M. et al. Seroprevalence of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, *Neospora caninum*, *Bovine leukemia virus*, and *Bovine viral diarrhea virus* infection among dairy cattle and herds Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 47, p.981-991, 2006.

SILVA, S. V. **Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose dos Bovinos em rebanhos cruzados – holandês / zebu e em animais da raça Pé-duro, criados no Estado do Piauí**. 2001. 176f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, L. A. F. et al. Características Clínicas e Epidemiológicas das Enfermidades Podais em Vacas Lactantes do Município de Orizona – GO. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 119 – 126, jul./dez. 2001.



SIMÕES, S. V. D. **Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado da Paraíba.** 1998. 118f. Dissertação (Mestrado Clínica Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo.

SIMÕES, S. V. D. et al. Prevalência da leucose bovina em animais criados no estado do Rio Grande do Norte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4. Campo Grande, **Anais.** UFMGS, 2001.

SPONCHIADO, D. **Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos da raça holandesa preta e branca, criados no estado do Paraná, Brasil.** 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal do Paraná. Paraná.

SUZUKI, T.; IKEDA, K. The mouse homolog of bovine leukemia virus receptor is closely related to the  $\alpha$  subunit of the adapter-related protein complex AP-3, not associated with the cell surface. **Journal Virology**, Washington .C., v.72, p.593-599, 1998.

TÁVORA, J. P. F.; BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em rebanhos leiteiros criados na região de Pólo Itabuna, Estado da Bahia. **Arquivo da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, Salvador, v. 14, n. 1, p. 164-183, 1991.

TEKES, L.; MATE, Z.; RUSKA, G. Serological survey of the distribution of leucosis in different cattle breeds in Hungria. **Magyar Allatorvosok Lapja**, Budapest, v. 39, p. 202-204, 1984.

TENÓRIO, T. G. S. **Leucose Enzoótica, Leptospirose e Brucelose: Inquérito sorológico em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de Pernambuco.** 2003. p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Veterinária), Universidade Federal rural de Pernambuco, Recife.

TOSTES, R. A. Situação da leucose bovina no Brasil: Uma Revisão. **Colloquium Arariae**, v.1, p. 42-50, set. 2005

VAN DER LAAN, C. W. et al. Leucose enzoótica bovina em bovinos produtores de leite importados do uruguai. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 139-141, 1999.

VANLEEUEWEN, J. A. et al. Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, bovine leukemia viral, and bovine viral diarrhea virus in Maritime Canada dairy cattle. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.42, p.193-198, 2001.

VANLEEUEWEN, J. A. Impacts and Control of Insidious Infectious Diseases- Beat Them Before They Beat Your Clients. *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, *Neospora caninum*, Bovine Leukemia Viral and Bovine Viral Diarrhea Virus. In: Congresso Mundial de Buiatria, 23., **Proceedings**. Québec-Canada, 2004.

VANLEEUEWEN, J. A. et al. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia viral, *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* and *Neospora Caninum* in dairy cattle in Saskatchewan. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 46, p.56-58, 2005.

VANLEEUEWEN, J. A. et al. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 47, p.783-786, 2006.

WERNERY, U.; SOHMIDT, F. W. Zum Vorkomen der enzootischen rinderleukose in Papua New Guinea. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Hanover v. 92, n. 5, p. 170-172, 1985.

ZAGHAWA, A. et al. Na Outbreak of Enzootic Bovine Leukosis in Upper Egypt: Clinical, Laboratory and Molecular-Epidemiological studies. **Journal Veterinary Medicine**. Berlin, v. 49, p.123-129, 2002.

**ARTIGO 1 - SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À  
LEUCOSE ENZOOTICA BOVINA EM REBANHOS DA BACIA LEITEIRA DO  
ESTADO DO MARANHÃO**

## SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À LEUCOSE ENZOOTICA BOVINA EM REBANHOS DA BACIA LEITEIRA DO ESTADO DO MARANHÃO

Hamilton Pereira **SANTOS**<sup>1</sup>, Helder de Moraes **PEREIRA**<sup>2</sup>, Sergio Alves do **NASCIMENTO**<sup>3</sup>, Luciana Cavalcante de Arruda **COUTINHO**<sup>4</sup>, Whaubtyfran Cabral **TEIXEIRA**<sup>4</sup>, Roberto Carlos Negreiros de **ARRUDA**<sup>5</sup>, Nacylene Pinto Chaves **Bezerra**<sup>6</sup>, Danilo Cutrim **BEZERRA**<sup>7</sup>, Roberto Soares de **CASTRO**<sup>8</sup>.

### RESUMO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma doença causada por um *Deltaretrovirus* da família *Retroviridae*, caracterizada por proliferação linfocitária e/ou formação de linfosarcomas, principalmente distribuída em bovinos leiteiros. Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a prevalência da LEB e identificar os principais fatores de risco para sua ocorrência na bacia leiteira do Estado do Maranhão. Foram coletadas 920 amostras sanguíneas de 92 rebanhos leiteiros da raça Girolanda distribuídos em 23 municípios das cinco Regionais que compõem a bacia leiteira do Estado. A prevalência estimada foi de 53,80% de animais sororeagentes, distribuídos em 98,91% (91/92) dos rebanhos estudados, afetando principalmente animais de idade superior aos 48 meses ( $P < 0,05$ ). As Regionais Bacabal, São Luís e Pedreira apresentaram as frequências de sororeatividade mais elevadas (63,50%, 61,87,% e 60,62%, respectivamente); Imperatriz, intermediária (41,18%); e Açailândia, a mais baixa (30,83%) ( $P < 0,05$ ). Todos os municípios apresentaram animais sororeagentes, com frequências variando de 22,50% (São Francisco do Brejão) a 75,00% (Bernardo do Mearim). Ao se analisar as variáveis estudadas como potenciais fatores de risco para LEB foi verificada associação estatística significativa ( $P < 0,05$ ) entre sororeagentes para LEB e uso repetido da mesma agulha para colheita de sangue ou vacinação (Odds Ratio – OR = 2,76; IC – 1,73 - 4,93), uso repetido da mesma luva obstétrica (Odds ratio - OR=1,74; IC - 1,2 a 2,49), estabulação dos animais (Odds ratio - OR=1,97; IC – 1,28 – 3,02) e ausência de assistência Veterinária (Odds ratio - OR=1,42; IC – 1,06 – 1,88). O conhecimento da LEB

<sup>1</sup> Professor da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA - Curso de Medicina Veterinária – Departamento de Patologia. [hpsluiza@yahoo.com.br](mailto:hpsluiza@yahoo.com.br) - São Luís – MA – 65055-970

<sup>2</sup> Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA – São Luís – MA – 65055-970.

<sup>3</sup> Biólogo da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife – PE – 52171-900

<sup>4</sup> Alunos de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife – PE – 52171-900

<sup>5</sup> Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Maranhão

<sup>6</sup> Fiscal de Defesa Animal da AGED, Estado do Maranhão - São Luís – MA – 65055-850

<sup>7</sup> Veterinário Autônomo- São Luís – MA – 65055-620

<sup>8</sup> Professor Associado da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Departamento de Medicina Veterinária – Recife – PE – 52171-900

pelos criadores e a aquisição de animais de outras criações para reprodução não interferiu na sororeatividade para LEB (*Odds ratio* - OR=1,09; IC – 0,82 – 1,44 e *Odds ratio* - OR=0,88; IC – 0,57 – 1,36, respectivamente) ( $P>0,05$ ).

**Palavras Chave:** Epidemiologia, Prevalência, Leucose enzoótica, bovino, Maranhão.

## SERUMPREVALENCE AND RISK FACTORS ASSOCIATED TO ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS IN DAIRY HERDS OF THE STATE OF MARANHÃO

### ABSTRACT

The Bovine Enzootic Leukosis (BEL) is a disease caused by a Deltaretrovirus of the Retroviridae family, characterized by lymphocyte proliferation and lymphosarcoma, mainly distributed in dairy cattle. This work was carried out to determine the prevalence of BEL and to identify the main risk factors for its occurrence in the dairy herds of the state of Maranhão. A total of 920 blood samples were collected from 92 dairy cattle herds of the crossbred Girolando distributed in 23 municipalities of the five Regionals, that make up the dairy regions of the state of Maranhão. For the diagnosis of BEL the an immunodifusion agar gel assay (IDAG) kit was used (TECHNOLOGICAL INSTITUTE OF PARANA - TECPAR). The estimated prevalence was of 53.80% seropositive animals, distributed in 98.91% (91/92) of the herds studied, mainly affecting animals with ages over 48 months ( $P < 0.05$ ). The Bacabal, Sao Luis and Pedreira Regionals, presented the frequencies of seroreactivity higher (63.50%, 61.87, and 60.62%, respectively), Imperatriz, intermediate (41.18%), and Açailândia, the lowest (30.83%) ( $P < 0.05$ ). Every municipaliteis presented seropositive animals with frequencies ranging from 22.50% (San Francisco do Brejao) to 75.00% (Bernardo do Mearim). When analyzing the variables studied as potential risk factors for BEL, a statistically significant association ( $P < 0.05$ ) between seroreactivity to BEL and the repeated use of the same needle for blood sampling or vaccination (Odds Ratio - OR=2.76; IC – 1,73 - 4,93), repeated use of the same obstetric glove (*Odds ratio* - OR=1.74; IC – 1.2 a 2.49), animal housing (*Odds ratio* - OR=1.97; IC – 1.28 – 3.02 ), and lack of veterinary care (*Odds ratio* - OR=1.42; IC – 1.06 – 1.88), was found. Knowledge of BEL by farmers and the purchase of animals from other farms for breeding did not interfere in seroreactivity to BEL (*Odds ratio* - OR=1.09; IC – 0.82 – 1.44 and *Odds ratio* - OR=0.88; IC – 0.57 – 1.36, respectively) ( $P > 0.05$ ).

Keywords: epidemiology, prevalence, enzootic leukosis, Maranhão.

## 1 - INTRODUÇÃO

O Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (VLEB), denominado oficialmente *Bovine leukemia virus*, pertence ao gênero *Deltaretrovirus* da subfamília *Orthoretrovirinae*, família *Retroviridae* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2009). O prefixo retro origina-se da enzima transcriptase reversa (DNA polimerase RNA - dependente) que está presente nos virions de todos os membros da família, responsável pela síntese de DNA a partir do RNA viral. (OIE, 2009)

A doença caracteriza-se por proliferação linfocitária nos órgãos hematopoéticos, bem como, naqueles ricos em tecido retículo-histiocitário, determinando formações tumorais por infiltrações de células mononucleares (linfócitos, pró-linfócitos e linfócitos atípicos), com quadro sintomático pleomórfico e alterações hematológicas, evidenciadas por leucocitose e linfocitose persistente, com aumento das formas linfocitárias atípicas (BIRGEL, 1982).

O linfossarcoma é a fase mais avançada da doença, que acomete principalmente animais de rebanho leiteiro, cuja epidemiologia deve ser enfatizada devida sua transmissão, que se faz tanto por via vertical quanto horizontal, com propagação da doença intensamente e incontrolável na maioria dos bovinos adultos (FERRER et al., 1979).

Em estudos realizados por JOHNSON; KANEENE (1992) foi demonstrado que 0,0005ml de sangue colhido de animal infectado é suficiente para infectar um bovino, quando inoculado pelas vias intradérmica, subcutânea, intramuscular e intravenosa. Outra forma de transmissão do VLEB é o uso repetitivo de agulhas, materiais cirúrgicos, luvas obstétricas, premunição contra babesiose e anaplasmose, ação mecânica de tabanídeos, contato com saliva e alimentação de leite e colostro oriundos de vacas infectadas. HUBNER et al. (1997) citaram que a transmissão via colostro pode ocorrer, porém com menos risco, pois os anticorpos maternos neutralizam o vírus e também devido a impermeabilidade da mucosa intestinal aos linfócitos, após 24 a 36h de nascidos. O sêmen por apresentar uma grande quantidade de linfócitos pode ser um material potencial para transmissão pela cobertura natural, porém, a inseminação artificial se torna mais difícil em decorrência da qualidade e exigência das indústrias que manipulam sêmen para envasamento e comercialização. A via transplacentária pode ocorrer em até 6% das vacas gestantes soroporeagentes. Na transferência de embriões, de doadoras infectadas para receptoras se torna mais difícil, pois os mesmos sofrem várias lavagens, o que é exigido pelos países importadores e exportadores de embriões (LUCAS, 1992).

O diagnóstico da LEB inicialmente era feito pela observação das manifestações clínicas e lesões. Em seguida foi feita com auxílio de exames hematológicos, que resultaram no estabelecimento das chamadas chaves leucométricas (GOETZER, 1954). Após o isolamento do VLEB foi possível desenvolver a primeira prova sorológica, a imunodifusão radial dupla de Ouchterlony em gel de Agar (MILLER et al., 1969), empregando-se com finalidade de determinar os anticorpos específicos. Mais tarde surgiram outras provas, como o Radioimunoensaio (RIA) (MACDONALD; FERRER, 1976), ensaio Imunoenzimático (ELISA) (ALTANER et al., 1982), e a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (AGRESTI et al., 1993).

No Brasil o primeiro relato da LEB foi feito por RANGEL; MACHADO (1943). Estudos epidemiológicos têm demonstrado ampla distribuição de animais sororeagentes em todas as Regiões do país. Com base nos relatos de estudos com bovinos leiteiros as seguintes prevalências médias<sup>1</sup> são estimadas para cada Região: Norte, 18,30% (ABREU et al., 1990; MOLNAR et al., 1999; CARNEIRO et al., 2003), Nordeste, 29,94% (TAVORA; BIRGEL, 1991; MELO et al., 1991; SIMÕES, 1998; SIMÕES et al., 2001; SILVA, 2001; TENÓRIO, 2003; MATOS; BIRGEL, 2005), Centro-Oeste, 40,13 (ANDRADE; ALMEIDA, 1991), Sudeste, 46,72% (LEITE et al., 1980; LIMA et al., 1980; ROMERO; ROWE, 1981; CUNHA et al., 1982; LEITE et al., 1984; MODENA et al., 1984; BIRGEL et al., 1988a; BIRGEL et al., 1988b; BIRGEL et al., 1991; ARITA et al., 1992; BIRGEL JUNIOR et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1997; D'ANGELINO et al., 1998; CAMARGO et al., 2002; MEGID et al., 2003), Sul, 34,41% (KANTEK et al., 1983; GOMES et al., 1985; FLORES et al., 1988; FLORES et al., 1990; FLORES et al. 1992; CARVALHO et al., 1996; MORAES et al., 1996; LUDRS, 2001; VAN DER LAAN et al., 1999; LEUZZIR JUNIOR et al., 2003; POLLETO et al., 2004; SPONCHIADO, 2008). Não foram encontrados registros de artigos científicos, relacionados à LEB nos estados do Amapá, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Sergipe.

A ampla distribuição da doença no Brasil deve causar perdas econômicas com descarte dos animais afetados clinicamente (linfossarcoma), barreiras internacionais de comércio de animais vivos, sêmen e embriões de animais soropositivos, queda da produção e do teor de gordura do leite, gastos com medicamentos e atendimento veterinário (MATOS; BIRGEL, 2005; SPONCHIADO, 2008; OIE, 2009).

O Estado do Maranhão Possui um efetivo bovino de aproximadamente 6.600.000 de cabeças. O crescimento da pecuária leiteira, embora abaixo da média nacional, é expressivo, com 3% anual e acúmulo de aproximadamente 25% na última década. Em 2008 o plantel de

---

<sup>1</sup> Médias calculadas com base nos dados referentes a bovinos leiteiros dos artigos citados



vacas de leite era de 625.000 (9,47% do efetivo) das quais, foram ordenhadas 330.000, com produção de cerca de 1.000.000 de litros de leite, com média de 1,5 L/vaca/dia, o que denota um baixo nível de especialização desta atividade (IBGE, 2009; INAGRO, 2009).

Segundo a Agência de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED, 2009), tem havido modificações de manejo e crescimento do rebanho leiteiro o que caracteriza intensa comercialização de matrizes, com ingressos procedentes de várias regiões do país, principalmente do Sudeste ( Minas Gerais), Nordeste (Pernambuco e Alagoas) e Centro-Oeste (Goiânia), onde nem sempre esses animais são acompanhados de atestados de sanidade, o que implica na possibilidade de introdução e difusão de doenças.

Deste modo, considerando a importância da bovinocultura leiteira aliada a ausência de dados epidemiológicos sobre a LEB, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar sua prevalência e os fatores de risco associados em rebanhos da bacia leiteira do estado do Maranhão.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 – Área de Estudo e População**

A área de estudo compreendeu a bacia leiteira do Estado do Maranhão. O Estado está localizado a 05° 05' 12" latitude sul e 42° 48' 42" a Oeste do Meridiano de Greenwich, com uma precipitação pluviométrica de 197mm e temperatura média/ 2009 de 26° C situado a noroeste da região Nordeste. Limita-se ao Norte pelo Oceano Atlântico, ao Sul e Sudoeste, pelo estado do Tocantins, ao Leste e Sudeste pelo estado do Piauí e ao Oeste pelo estado do Pará. Ocupa uma área territorial de aproximadamente 331.918 Km<sup>2</sup>, possui um efetivo bovino de aproximadamente 6.600.000 cabeças, sendo 625.000 (9,47%) de exploração de leite (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICO - IBGE, 2006; LABMET, 2009).

Foi considerada bacia leiteira as principais aglomerações onde a pecuária era predominantemente destinada à produção de leite, de acordo com os dados cadastrais da AGED (2009), o que compreende as Regionais da ilha de São Luís, Imperatriz, Açailândia, Bacabal e Pedreiras. Essas Regionais não são todas contíguas, existindo três aglomerações: São Luís, ao nordeste; Bacabau e Pedreiras, ao centro; e Açailândia e Imperatriz, ao oeste (Fig. 1). O estudo abrangeu os principais municípios que apresentavam pecuária tipicamente leiteira, distribuída nas regionais da Ilha de São Luís (municípios de Paço do Lumiar, Raposa, São José de Ribamar e São Luís), Imperatriz (Amarante, Imperatriz, João Lisboa, Lageado Novo, Porto Franco, São João do Paraíso e Senador La Roque), Açailândia (Açailândia, Cidelândia e São Francisco do Brejão), Pedreiras (Bernardo do Mearim, Igarapé Grande,

Pedreiras e Trizidela do Vale) e Bacabal (Bacabal, Bom Lugar, Lago Verde, Olho d'Água das Cunhas e São Luís Gonzaga).

Em linhas gerais, os rebanhos criados na bacia leiteira do Estado do Maranhão são formados geralmente por até 50 cabeças, sendo a maioria de vacas em lactação, seguido bezerros (as), vacas secas, novilhas de reposição, e um ou dois touros por rebanho. A maioria dos animais é mestiço resultante do cruzamento de gir com holandês, nos diversos graus de sangue. O manejo reprodutivo na maioria dos rebanhos é a monta natural.

## 2.2 – Amostragem

A amostragem foi conduzida conforme preconizado pelo CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES (1979) para estudo de estimativa de prevalência. Para se definir o número de amostras a serem testadas foi utilizada a seguinte expressão:

$$n = \frac{p(100 - p)z^2}{\left(\frac{p \cdot d}{100}\right)^2} \quad \rightarrow \quad \begin{array}{l} n = \text{número de amostras} \\ p = \text{prevalência esperada} \\ z = \text{grau de confiança} \\ d = \text{margem de erro} \end{array}$$

Considerando prevalência esperada de 30%, correspondente à média obtida de vários estudos do país (BIRGEL JUNIOR et al., 2006), erro de 10% e grau de confiança de 95% ( $z = 1,96$ ), obteve-se  $n = 896$  amostras, onde elevamos para 920.

Para cada um dos 23 município foram sorteados quatro rebanhos, com base no cadastro da AGED (2009), totalizando 92 rebanhos. De cada propriedade foram colhidas amostras de 10 animais aleatoriamente selecionados, obedecendo à seguinte estratificação: duas novilhas de reposição (12-24 meses), sete vacas (>24 meses) e um touro (>24 meses).

## 2.3 - Colheita das Amostras

As amostras de sangue foram colhidas através da punção da veia jugular, utilizando tubos à vácuo de 10 ml, com gel, devidamente esterilizados e identificados. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente até ocorrer à coagulação e retração do coágulo, sendo conduzidas posteriormente sob refrigeração até o Laboratório de Virologia da Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. As amostras foram centrifugadas a 1.000g, durante 5 minutos. As alíquotas de soro obtidas foram transferidas para tubos plásticos e mantidas em temperatura de congelamento (-20°C) até a realização dos exames sorológicos no Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

## 2.4 - Prova Sorológica

A técnica utilizada para detecção de animais portadores de anticorpos anti-VLEB foi a IDGA (MILLER; VAN DER MAATEN, 1976), utilizando-se o kit produzido pelo LEB INSTITUTO TECNOLÓGICO DO PARANÁ (TECPAR), que detecta anticorpos ant-gp51, de acordo com o fabricante.

## 2.5 – Estudo de Fatores de Risco

Em cada rebanho foi aplicado aos criadores questionário epidemiológico com o objetivo de obter informações necessárias ao estudo de fatores de risco associados à sororeatividade para LEB, como: conhecimento da LEB, uso repetido da mesma agulha para vacinação, vermifugação etc, uso repetido da mesma luva obstétrica de vacas, assistência Veterinária, aquisição de animais de outras criações para reprodução e estabulação dos animais. Foi considerado estabulado o rebanho onde os animais eram recolhidos e permaneciam em abrigos no mínimo durante a noite.

## 2.6 - Análise Estatística

A prevalência estimada, bem como a frequência de animais sororeagentes em cada município e regional, foi calculada pela razão do número de animais soropositivos multiplicado por 100 e dividido pelo total de animais testados. Para cada percentual foi calculado o intervalo de confiança de 95% de probabilidade de ocorrência ao acaso (THRUSFIELD, 2007).

Para avaliar a associação entre animais sororeagentes para LEB e as variáveis estudadas, potenciais fatores de risco, utilizou-se o teste de Qui-quadrado, com nível de significância de 5%. Também foram calculados os intervalos com confiança de 95% e a razão de probabilidades (*Odds ratio*) e o risco relativo. O programa utilizado para análise foi o EPINFO 3.43 versão 2007.

## 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de IDGA para pesquisa de anticorpos contra o VLEB em bovinos leiteiros, de acordo com as Regionais e Municípios da bacia leiteira do Estado do Maranhão, estão apresentados na Tabela 1. A prevalência estimada foi de 53,80% (intervalo de 50,58% a 57,03%) de animais sororeagentes, distribuídos em 98,91% (91/92) dos rebanhos estudados. As Regionais Bacabal, São Luís e Pedreiras apresentaram frequências de sororeagentes mais elevadas (63,50%, 61,87,% e 60,62%, respectivamente); Imperatriz,

intermediária (41,18%); e Açailândia, a mais baixa (30,83%). Houve diferença estatística entre as Regionais ( $P < 0,05$ ). Todos os municípios apresentaram animais sororeagentes, com frequências variando de 22,50% (São Francisco do Brejão) a 75,00% (Bernardo do Mearim). Entre as frequências de sororeagentes observadas nos municípios das Regionais São Luís e Açailândia não houve diferença significativa, porém houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre as frequências dos municípios das Regionais Bacabal, Pedreiras e Imperatriz.

**TABELA 1 - Distribuição de frequências de bovinos sororeagentes à imunodifusão em ágar gel (IDGA) para Leucose Enzoótica Bovina de acordo com as Regionais e Municípios da bacia leiteira do Estado do Maranhão (2009)**

Regionais	Municípios	Resultado da IDGA					Total
		Reagente	(%)	IC	Não Reagente	(%)	
Bacabal	Bacabal	29	72,50 <sup>a</sup>	55,80 - 84,20	11	27,50	40
	São Luís Gonzaga	28	70,00 <sup>a</sup>	50,22 - 79,78	12	30,00	40
	Bom Lugar	26	65,00 <sup>ab</sup>	58,66 - 86,34	14	35,00	40
	Lago Verde	26	65,00 <sup>ab</sup>	50,22 - 79,78	14	35,00	40
	Olho D'água Cunhas	18	45,00 <sup>b</sup>	29,58 - 60,42	22	55,00	40
<b>Subtotal</b>		<b>127</b>	<b>63,50<sup>A</sup></b>	<b>59,11 - 72,50</b>	<b>66</b>	<b>36,50</b>	<b>200</b>
São Luís	Raposa	29	72,50 <sup>a</sup>	58,66 - 86,34	11	27,50	40
	São José de Ribamar	26	65,00 <sup>a</sup>	50,22 - 79,78	14	35,00	40
	São Luís	24	60,00 <sup>a</sup>	44,82 - 75,18	16	40,00	40
	Paço Lumiar	20	50,00 <sup>a</sup>	34,50 - 65,50	20	50,00	40
<b>Subtotal</b>		<b>99</b>	<b>61,87<sup>A</sup></b>	<b>54,35 - 69,40</b>	<b>61</b>	<b>38,13</b>	<b>160</b>
Pedreiras	Bernardo do Mearim	30	75,00 <sup>a</sup>	24,82 - 55,18	10	25,00	40
	Pedreiras	26	65,00 <sup>a</sup>	50,22 - 79,78	14	35,00	40
	Trizidela do Vale	25	62,50 <sup>ab</sup>	47,50 - 77,50	15	37,50	40
	Igarapé Grande	16	40,00 <sup>b</sup>	61,58 - 88,42	24	60,00	40
<b>Subtotal</b>		<b>97</b>	<b>60,62<sup>A</sup></b>	<b>53,05 - 68,20</b>	<b>63</b>	<b>39,38</b>	<b>160</b>
Imperatriz	Senador La Roque	25	62,50 <sup>a</sup>	44,82 - 75,18	15	37,50	40
	João Lisboa	24	60,00 <sup>a</sup>	42,18 - 72,82	16	40,00	40
	Imperatriz	23	57,30 <sup>a</sup>	47,50 - 77,50	17	42,50	40
	Amarante	19	47,50 <sup>ab</sup>	32,02 - 62,98	21	52,50	40
	Lageado Novo	17	42,50 <sup>ab</sup>	13,66 - 41,34	23	57,50	40
	São João do Paraíso	16	40,00 <sup>ab</sup>	24,82 - 55,18	24	60,00	40
	Porto Franco	11	27,50 <sup>b</sup>	27,18 - 57,82	29	72,50	40
<b>Subtotal</b>		<b>135</b>	<b>41,18<sup>B</sup></b>	<b>42,36 - 54,07</b>	<b>145</b>	<b>51,78</b>	<b>280</b>
Açailândia	Cidelândia	16	40,00 <sup>a</sup>	9,56 - 35,44	24	60,00	40
	Açailândia	12	30,00 <sup>a</sup>	24,82 - 55,18	28	70,00	40
	São Fco do Brejão	09	22,50 <sup>a</sup>	15,80 - 44,20	31	77,50	40
<b>Subtotal</b>		<b>37</b>	<b>30,83<sup>C</sup></b>	<b>22,57 - 39,10</b>	<b>83</b>	<b>69,17</b>	<b>120</b>
<b>Total</b>		<b>495</b>	<b>53,80</b>	<b>50,58 - 57,03</b>	<b>425</b>	<b>46,20</b>	<b>920</b>

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (Qui-quadrado;  $P < 0,05$ ) entre os municípios da mesma Regional.

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (Qui-quadrado;  $P < 0,05$ ) entre as Regionais.

IC = Intervalo de confiança de 95%.

A observação de alta prevalência de animais sororeagentes para LEB em praticamente todos os rebanhos e em todos os municípios estudados demonstra a ampla distribuição da LEB na população bovina da Bacia Leiteira do Maranhão, com pequenas variações entre os municípios de algumas Regionais. Desta forma, medidas de controle deveriam ser recomendadas para a área estudada, fundamentadas no conhecimento dos principais fatores de risco identificados, objeto deste estudo, complementar à estimativa da prevalência.

Os diversos inquéritos sorológicos realizados no Brasil, envolvendo diferentes populações, metodologias, períodos e locais de realização têm levado a resultados diversificados com frequência média de 27,60% de sororeagentes (BIRGUEL JÚNIOR et al., 2006). A prevalência observada neste estudo é superior à média nacional e às relatadas para bovinos leiteiros das Regiões Norte, que apresenta média de 18,30% (ABREU et al., 1990; MOLNAR et al., 1999; CARNEIRO et al., 2003), Região Nordeste, 29,94% (MELO et al., 1991; TAVORA e BIRGEL, 1991; SIMÕES, 1998; SILVA et al., 2001; SIMÕES et al., 2001;), Região Sudeste, 46,72 (LEITE et al., 1980; ROMERO e ROWE., 1981; ARITA et al., 1982; CUNHA et al., 1982; LEITE et al., 1984; MODENA et al., 1984; BIRGEL et al., 1988a; BIRGEL et al., 1988b; BIRGEL et al., 1991; ARITA et al., 1992; BIRGEL JUNIOR et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1997; D'ANGELINO et al., 1998; CAMARGO et al., 2002; MEGID et al., 2003;); Sul, 22,93 (LIMA et al., 1980; KANTEK et al., 1983; GOMES et al., 1985; FLORES et al., 1990; FLORES et al., 1992; CARVALHO et al., 1996; MORAES et al. 1996; FLORES et al., 1998; ; VAN DER LAAN et al., 1999; LUDRS, 2001; LEUZZIR JUNIOR. et al., 2003; POLLETO et al., 2004; SPONCHIADO, 2008;); e Centro-Oeste (Goiânia), 40,13 (ANDRADE e ALMEIDA., 1991). A Bacia Leiteira do Maranhão não é uma área homogênea, existindo três aglomerações formadas pelas Regionais de São Luís, Bacabal / Pedreiras e Açailândia / Imperatriz. Observa-se que nas Regionais situadas no nordeste e no centro foram registradas as prevalências mais elevadas e nas situada mais à oeste, as prevalências mais baixas (Fig. 1). Isto indica a existência de algum fator relevante relacionado à distribuição espacial da LEB, possivelmente o fluxo de animais na Bacia Leiteira do Maranhão. O desenvolvimento da pecuária leiteira no Estado do Maranhão tem sido intensificado nas três últimas décadas, com aperfeiçoamentos no processo de produção e aquisição de animais de outros Estados. De modo geral há três principais fluxos de animais: da Região Sudeste principalmente (Minas Gerais) e do Nordeste (Pernambuco e Alagoas), para São Luís, Bacabal e Pedreiras, onde ocorrem as prevalências mais elevadas, e da Região Centro-Oeste para Açailândia e Imperatriz, onde as prevalências são mais baixas, coincidindo, em linhas gerais, com as prevalências previamente descritas, nessas Regiões sudeste (46,72%) e centro-oeste (40,13%).

Os índices de prevalência da LEB no estado do Maranhão devem-se provavelmente em decorrência de uma maior comercialização de bovinos, com a finalidade da melhoria genética e que tem provocado a difusão de muitas doenças. Segundo JONHSON e KANEENE (1992) e LEITE et al. (2001) os fatores de maior influencia na difusão da LEB é a aglomeração de animais, pois quanto mais próximos maior é a prevalência de sororeagentes, bem como, a compra de animais é um fator que influencia, porém em menor grau.

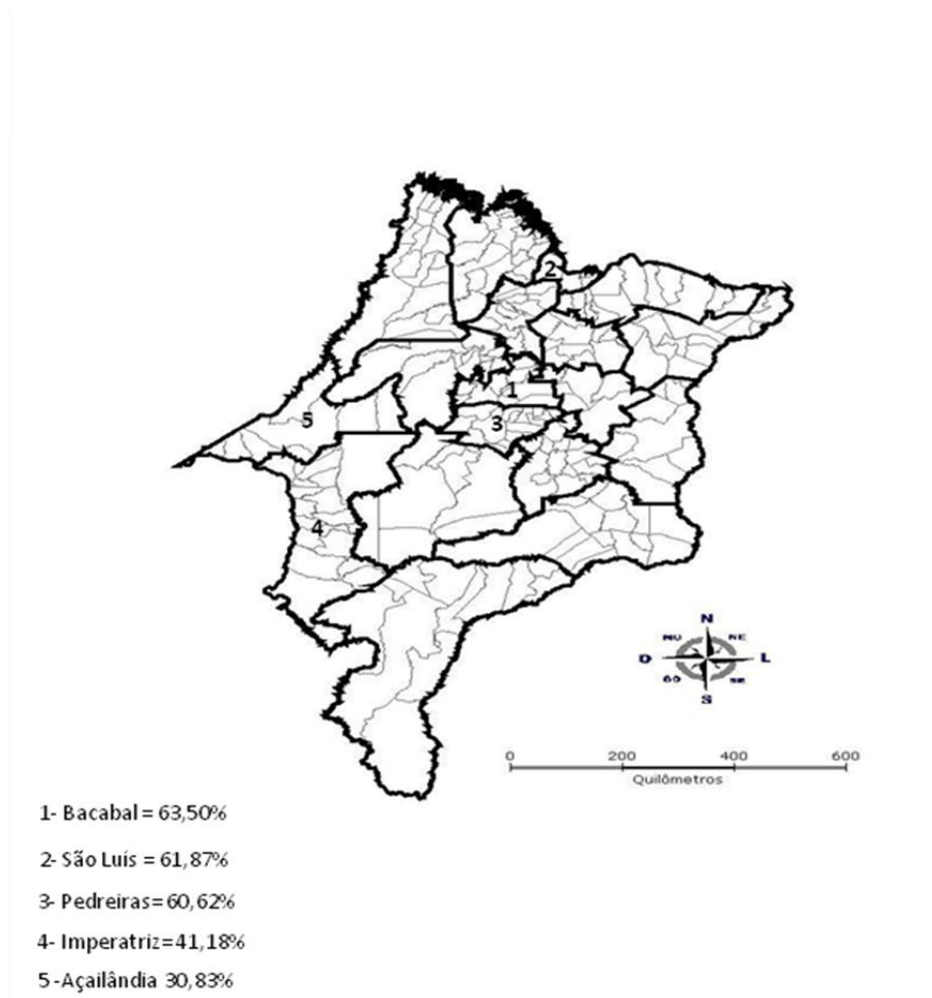


Figura 1 – Mapa do Estado do Maranhão representando cinco regionais, com destaque para a Bacia Leiteira e distribuição da prevalência da LEB: 1 – Bacabal, 2 - São Luís, 3 - Pedreiras (prevalências de 63,50%; 61,87% e 60,62); 4 - Imperatriz (41,18%); 5 - Açailândia (30,83%).

Analisando-se a distribuição de frequências de animais sororeagentes ao VLEB em relação à idade dos animais, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias ( $P < 0,05$ ), com animais de idade superior aos 48 meses correspondendo a vacas e touros apresentando maior percentual de sororeagentes (Tabela 2). Por se tratar de uma infecção crônica potencialmente transmitida em diferentes fases da vida produtiva é esperado que o maior tempo de exposição leve a taxas mais elevadas de sororeagentes.

Achados semelhantes são citados por outros autores (LEITE et al., 1984; BIRGEL et al., 1988b; TÁVORA; BIRGEL, 1991; D'ANGELINO et al., 1998; MOLNAR et al., 1999; LEUZZI JÚNIOR et al., 2003; SPONCHIADO, 2008).

**TABELA 2 - Distribuição de frequência de bovinos da bacia leiteira do Estado do Maranhão sororeagentes à Imunodifusão em Agar gel (IDGA) para Leucose Enzoótica Bovina de acordo com a faixa etária (2009)**

Faixa etária (meses)	Resultado da IDGA					
	Reagente	(%)	IC	Não Reagente	(%)	Total
12 – 24	70	38,04 <sup>a</sup>	31,03 - 45,06	114	61,96	184
25 – 48	25	36,76 <sup>a</sup>	25,30 - 48,23	43	63,24	68
49 – 72	185	59,49 <sup>b</sup>	54,03 - 64,94	126	40,51	331
> 72	215	60,22 <sup>b</sup>	55,15 - 65,30	142	39,78	357
<b>Total</b>	<b>495</b>	<b>53,80</b>	<b>50,58 – 57,03</b>	<b>425</b>	<b>46,20</b>	<b>920</b>

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (Qui-quadrado;  $P < 0,05$ ) entre as faixas etárias.

IC = Intervalo de confiança de 95%.

Ao se analisar as variáveis estudadas como potenciais fatores de risco para LEB foi verificada associação estatística significativa entre animais sororeagentes para LEB e uso repetido da mesma agulha para vacinação, vermifugação etc, uso repetido da mesma luva obstétrica, estabulação dos animais e ausência de assistência Veterinária ( $P < 0,05$ ). O conhecimento da LEB pelos criadores e a aquisição de animais de outras criações para reprodução não interferiu na sororeação para LEB ( $P > 0,05$ ) (Tabela 3).

É bem conhecido que a infecção pelo VLEB está associada aos linfócitos, de forma que qualquer material biológico que veicule esse tipo celular serve potencialmente de fonte de infecção para animais susceptíveis. Tem sido demonstrado, experimentalmente, que a inoculação de quantidade mínima de sangue é suficiente para reproduzir a infecção pelo VLEB (EVERMANN et al., 1986; JOHNSON; KANEENE, 1992). Assim, o uso repetido de agulhas e luvas obstétricas durante a manipulação de animais infectados e em seguida animais susceptíveis, aumentou o risco de transmissão do VLEB em 1,26 e 1,76 vezes, respectivamente (Tabela 3). Embora tenha sido previamente citado a associação desses fatores à transmissão do VLEB (FERRER; PIPER et al., 1981; ALENCAR FILHO et al., 1981; FREITAS et al., 1982; JOHNSON; KANEENE, 1992; HOPKINS; DIGIACOMO, 1988; SPONCHIADO, 2008), não havia estudo mais sistemático que demonstrasse em tal associação em condições de manejo em clima tropical.



A estabulação dos animais aumentou o risco de sororeagentes para o VLEB em 1,43 vezes (Tabela 3). De acordo com o manejo adotado nas criações da bacia leiteira do Estado do Maranhão, os animais que são estabulados permanecem aglomerados a noite e, em parte das criações, durante o dia com acesso a piquetes próximos às instalações. A estabulação dos animais em um sistema de produção voltado para produção leiteira, com contato prolongado, facilita a disseminação de infecções crônicas, como a LEB, através da exposição direta a fluidos biológicos contaminados com linfócitos infectados (MILLER; VAN DER MAATEN, 1982). Isto também é compatível com a observação que o maior tempo de exposição leve a taxas mais elevadas de sororeagentes.

Por outro lado, tem sido relatado que a intervenção humana, incluindo médicos veterinários e auxiliares envolvidos na pecuária, contribui para o aumento da prevalência da LEB (FLORES et al., 1988, FERNANDEZ, 2007; SPONCHIADO, 2008). Neste estudo, a assistência veterinária se comportou como fator de proteção, uma vez que sua ausência implicou no aumento do risco de sororeagentes para LEB em 1,18 vezes (Tabela 3). Assim, o que é mais importante a considerar não é só a presença ou ausência de assistência veterinária, mas sim as práticas realizadas e orientadas pelos profissionais Veterinários responsáveis pela atenção aos rebanhos, o que deveria ser refinado em futuros estudos sobre o assunto.

**TABELA 3 – Distribuição de frequências de bovinos sororeagentes à imunodifusão em ágar gel (IDGA) para Leucose Enzoótica Bovina em relação às variáveis estudadas na bacia leiteira do Estado do Maranhão (2009)**

Variáveis		IDGA (n = 920)				Indicadores epidemiológicos		
		Positivo	(%)	Negativo	(%)	P<0,05	OR (IC)	RR (IC)
Conhecimento da LEB	Sim	51	51,00	49	49,00	0,6244	0,88 (0,57-1,36)	0,94 (0,77-1,15)
	Não	444	54,15	376	45,85			
Uso repetido da mesma agulha	Sim	463	56,46	357	43,54	0,0000	2,76 (1,73-4,93)	1,76 (1,32-2,36)
	Não	32	32,00	68	68,00			
Uso repetido da luva obstétrica	Sim	110	64,71	60	35,29	0,0021	1,74 (1,21-2,49)	1,26 (1,11-1,44)
	Não	385	51,33	365	48,67			
Ausência de Assistência Veterinária	Sim	348	56,68	266	43,32	0,0161	1,42 (1,06-1,88)	1,18 (1,03-1,35)
	Não	147	48,04	159	51,96			
Aquisição de animais	Sim	182	55,15	148	44,85	0,5864	1,09 (0,82-1,44)	1,04 (0,92-1,18)
	Não	313	53,05	277	46,95			
Estabulação	Sim	452	55,80	358	44,20	0,0014	1,97 (1,28-3,02)	1,43 (1,12-1,82)
	Não	43	39,09	67	60,91			

P = probabilidade de ocorrência ao acaso (95%); OR = Odds ratio; RR = risco relativo; IC = Intervalo de confiança de 95%.

Quando foi feita a distribuição de frequências dos fatores de risco identificados para LEB entre os rebanhos estudados, observa-se que os mais frequentes foram o uso repetido da mesma agulha para vacinação, vermifugação etc (89,13% das criações) e a estabulação dos animais (88,04%), seguidos da ausência de assistência veterinária (33,70%) e uso repetido da luva obstétrica (18,48%) (Tabela 4). Diante desta constatação, medidas de controle da LEB deveriam ser adotadas visando reduzir a frequência dos fatores de risco nas criações. O uso de agulha descartável para cada animal, intensificação da assistência veterinária, com atenção aos riscos de transmissão para LEB, incluindo outros além dos aqui estudados, e uso de luva obstétrica para palpação de cada animal, são, aparentemente, as medidas mais práticas de serem adotadas. Essas recomendações também são citadas por SPRECHER et al.(1991) e PELZER; SPRECHER (1993). Outras medidas que podem ser adotadas são quarentena e testes sorológicos dos bovinos, com intervalo de no mínimo dois meses, antes da introdução no rebanho de bovinos recentemente adquiridos (FERRER 1979; JONHNSOM; KANEENE, 1992); FENNER et al.(1993). A redução da estabulação é prática difícil de ser implementada, devido às particularidades do manejo dos bovinos leiteiros, porém é possível evitar a intensificação excessiva da criação, com permanência dos animais em áreas maiores e mais abertas para circulação de ar e contato menos íntimo entre os indivíduos.

A limpeza, higienização e desinfecção dos estábulos pode ser uma medida paliativa, com intuito de reduzir a proliferação de moscas, evitando dessa forma a transmissão de forma mecânica (BRAGA et al., 1998; FERDINANDES et al.,2007).

**TABELA 4 - Distribuição de frequências dos fatores de risco para Leucose Enzoótica Bovina (LEB) de acordo com os rebanhos estudados na bacia leiteira do Estado do Maranhão (2009)**

Fator de risco	Situação do Rebanho					
	Presente	(%)	IC	Ausente	(%)	Total
Uso repetido da mesma agulha	82	89,13	82,77 - 95,49	10	10,87	92
Uso repetido da luva obstétrica	17	18,48	10,55 - 26,41	75	81,52	92
Ausência de Assistência Veterinária	31	33,70	24,04 - 43,35	61	66,30	92
Estabulação	81	88,04	81,41 - 94,67	11	11,96	92

#### 4 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados de 920 amostras de bovinos testados sorologicamente para Leucose Enzoótica Bovina (LEB), nas cinco regionais da bacia leiteira do Estado do Maranhão, pode-se concluir que:

- 1- A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) ocorre com alta prevalência nos bovinos leiteiros de todas as Regionais e Municípios, com distribuição espacial heterogênea, onde as maiores prevalências foram encontradas nas regionais situadas no nordeste (São Luís) e no centro (Bacabal e Pedreiras) e, as menores prevalências nas Regionais situadas no oeste (Açailândia e Imperatriz);
- 2- Bovinos acima de 48 meses de idade apresentam maior percentual de reações positivas para a LEB;
- 3- Os fatores de risco para LEB identificados nas criações são: uso repetido da mesma agulha para colheita de sangue, vacinação, vermifugação etc; estabulação dos animais; ausência de assistência veterinária; e uso repetido da luva obstétrica.

## **5 - AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida ao professor Roberto Soares de Castro; À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concessão ao Professor Hamilton Pereira Santos; À fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado do Maranhão, pela concessão da ajuda através do Programa de Apoio a Projetos de Pesquisa; Ao Instituto do Agro-negócio do Estado do Maranhão pela ajuda concedida ao Projeto; Ao professor Rômulo Cerqueira Leite da Universidade Federal de Minas Gerais pela concessão de vírus da Leucose Enzoótica Bovina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, V. L. V.; SILVA, J. A.; MODENA, C. M.; MOREIRA, E. C. Prevalência da Leucose Enzoótica bovina nos Estados de Rondônia e Acre. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo horizonte, v. 42, n. 3, p.203 – 210, 1990.

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO MARANHÃO – AGED.  
[www.aged.ma.gov.br](http://www.aged.ma.gov.br). Acessado em: julho / 2007.

AGRESTI, A.; PONTI, W.; ROCCHI, M.; MENEVERI, R.; MAROZZI, A.; CAVALLERI, D.; PERI, E.; POLI, G.; GINELLI, E. Use of polymerase chain reaction to diagnose leukemia vírus infection caíves at birth. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 54, n. 3, p. 373-378, 1993.

ALENCAR FILHO, R. A.; RODRIGUES, F. M.; VIANA, W. O. Alterações do leucograma em bovinos positivos a imunodifusão para Leucose Enzoótica. **O Biológico**, v. 47, n. 4, p. 103-106, 1981.

ALTANER, C.; ZAJAC, V.; BAN, J.A. A simple and inexpensive metod for detection of BLB infected cattle based on modified ELISA principal. **Zentralblatt für Vetemärmedizin**, Berlin, v. 29, n. 8, p. 583-590,1982.

ANDRADE, J. R. A.; ALMEIDA, M. M. R. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina na Bacia Leiteira de Goiânia, Goiás. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 10, n. 60, p.49-53, 1991.

ARITA, G. M. M.; GONÇALVES, C. D.; SABER, A. F.; GERMANO, P. M. L.; DEAK, J.G.; KOTAIT, I. Estudos epidemiológicos da Leucose Enzoótica Bovina no Vale do Parnaíba, São Paulo, **Resumo**. São Paulo:Secretaria de Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo. 1992. P. 30.

BIRGEL, E. H. Leucose Enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnóstico. In BIRGEL, E. H.; BENESI, E. J. **Patologia clínica veterinária**. 2. ed.São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 249-260.

BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; MARÇAL, W. S.; Estudo preliminar sobre ocorrência da Leucose dos Bovinos adultos criados na Região de Campinas. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 43., 1988, Campinas, SP. **Resumo**. Campinas: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1988a. P. 30

BIRGEL, E.H.; D'AGELINO, J.L.; GARCIA, M.; ZOGNO, M.A. Ocorrência da infecção causada pelo vírus da Leucose Bovina em gado leiteiro criado no Estado de São Paulo. Avaliação pela detecção de anticorpos séricos por imunodifusão com antígeno viral. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 43., 1988, Campinas, SP. **Resumos**. Campinas: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1988b. p. 31.

BIRGEL, E.H.; D'AGELINO, J.L.; GARCIA, M.; BENESI, F. J. ZOGMO, M. A. A. Ocorrência da infecção causada pelo vírus da Leucose bovina no Estado de São Paulo. **Braslian Journal Veterinary research and Animal Science**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 67-73, 1991.

BIRGEL JÚNIOR, E. H.; DANGELINO J. L.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo Vírus da Leucose dos Bovinos em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 93-99, 1995.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; DIAS, W. M. C.; SOUZA, R. M.; POGLIANI, F. C.; BIRGEL, D. B, BIRGEL, E. H. 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.

BRAGA, F. M.; VAN DER LAAN, C. W.; SCHUCH, L. F.; HALFEN, D. C. Infecção pelo Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV). **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, Santa Maria, jan/mar/1998.

CAMARGOS, M. F.; MELO, C.B.; LEITE, R. C.; STANCEK, D.; LOBATO, Z. I. P.; ROCHA, M. A.; SOUZA, G. N.; REIS, J. K. P. Frequência de oropositividade para Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos de Minas Gerais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 5, p. 20-26, 2002.

CARNEIRO, P.A.M.; ARAUJO, W.P.; BIRGEL, E.H.; SOUZA, K.W. Prevalência da Infecção pelo Vírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado do Amazonas, Brasil. **Acta-Amazonica**, Manaus, v. 33, n. 1, p. 111-125, 2003.

CARVALHO, L.; BENESI, F. J.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Prevalência de anticorpos séricos de anti-vírus da Leucose dos bovinos em animais da raça Holandesa preto e branco e zebuínos nelore , criados no Pólo Regional de Londrina, estado do Paraná. **Semina: Ciência Agrária**, n.17, n. 1, p.53-57,1996.

CEPANZO. Centro Panamericano de Zoonosis. **Procedimentos para estudios de prevalencia por muestro**. Buenos Aires, 1979. 35 p. (Nota técnica, 18, rev. 1).

CUNHA, R. G.; TEIXEIRA, A. C.; SOUZA, M. Antígenos do vírus da Leucose bovina e anticorpos precipitantes em soros de bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 9, p. 1363-1370, 1982.

D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 30, p. 13-15, 1998.

EPI INFO 3.43 VERSÃO 2007. [www.epi Info. 3.43](http://www.epi Info. 3.43). Acessado em: 12 de novembro de 2009.

EVERMANN, J. F.; DIGIACOMO, R. F.; FERRER, J. F.; PARISH, S. M. Trarsmission of bovine leukosis virus by blood inoculation. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 9, p 1885-1887, 1986.

FENNER, J. F.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A. **Vetterinary Virology**, 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993. Cap. 33: Retroviridae: p. 561-595.

FERNANDES, C. H. C. **Leucose Enzoótica dos Bovinos: Soroprevalência, Fatores de Risco e Níveis Séricos de Lisozima em Bovinos Leiteiros do Estado do Tocantins**, Brasil, Dissertação para obtenção do Grau de Doutor, 83p., UFRPE, 2007.

FERRER, J. F.; MARSHAK, R. R.; ABT, D. A.; KENYON, S. J. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: a review. **Journal of the American Medical Association**, v. 175, n. 7, p. 705-708, 1979.

FERRER, J.F.; PIPER, C.E. Role of colostrum and milk in the natural transmission of the Bovine Leukemia Virus. **Cancer Research**, Baltimore, v. 41, p. 4906-4909, 1981.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; PEREIRA, N. M.; PORTOLAN, J. A. B.; CHIELLE, L.L.; Prevalência de anticorpos contra o vírus da Leucose Bovina (VLB) no rebanho leiteiro da Santa Maria, RS. **Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 67-73, 1988.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; REBELATTO, M. C. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB) na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Hora Veterinária**, v. 58, p. 25-29, 1990.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; OLIVEIRA, C.; KREUTZ, L. C. Anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) em soro de bovinos provenientes da república Oriental do Uruguai. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.12, n. 68, p. 5-8, 1992.

FREITAS, T. R. P.; ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Recuperação da infectividade do vírus da Leucemia Bovina de Leucócitos ingeridos pela mosca do estábulo *Stornoxys calcitrans*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 18., 1982, Camboriú. **Anais...** Camboriú: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1982. p. 69.

GOMES, M.; MOOJEN, V.; FERNANDES, J. C. T.; FERREIRO, L. Detecção de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina (VLB) 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.

GÖTZE, R.; ROSENBERGER, G.; ZIEGENHAGEN, G. Die Leukose des Rindes: ihre hamatologische und klinische Diagnosis. **Monatshefte für Veterinärmedizin**, v. 9, p. 517-526, 1954.

HOPKINS S. G.; EVERMANN, J. F.; DIGIACOMO, R. F.; PARRISH, S. M.; FERRER, J. F.; SMITH, S.; BANGERT, R. L. Experimental transmission of bovine leukosis virus by simulated rectal palpation. **The Veterinary Record**, v. 122, n. 17, p. 389-391, 1988.

HUBNER, S. O.; WEIBLEN, R.; MORAES, M. P.; SILVA, A. M.; CARDOSO, M. J. L.; PEREIRA, N. M.; ZANINI, M. Infecção intra-uterina pelo vírus da leucose bovina. **Revista Brasileiro de Reprodução Animal**, v. 21, n. 4, p. 8-11, 1997.



INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **IBGE** 2006.  
[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br), Acessado em: 7/03/2009.

INSTITUTO DO AGRONEGÓCIO DO ESTADO DO MARANHÃO – INAGRO, 2009.  
[www.inagro.gov.br](http://www.inagro.gov.br), Acessado em: 11/11/2009

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV, 2009  
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>, Acessado em: Jan. 2010.

JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis.  
**Veterinary Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 287-314, 1992.

KANTEK, C. E.; KRUGER, E. R.; WELTER, V. R. Prevalência do Vírus da Leucose Enzoótica Bovina no Rebanho do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 3, p. 125-129, 1983.

LABMET. **Informações Climáticas**. [www.nerh.uema.br/meteoro/meteoro.htm](http://www.nerh.uema.br/meteoro/meteoro.htm). Cessado em 16 de junho de 2009.

LEITE, R. C.; MODENA, C. M.; MOREIRA, E. C.; ABREU, J. J. Leucose enzoótica bovina em Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 1980, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1980. p. 207.

LEITE, R.C.; MODENA, C.M.; MOREIRA, E.C.; ABREU, J.J. Evolução clínica da Leucose Enzoótica Bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 47-57, 1984.

LEITE, R. C.; LOBATO, Z. I. P.; CAMARGO, M. F. Leucose enzoótica bovina. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária-Brasília/DF*, ano VII, n. 24, p. 20-29, set/out/Nov/dez/ 2001.

LEUZZI JUNIOR, L.A.; GUIMARÃES JR, J.S.; FREIRE, R.L.; FREIRA, A.F.A. Influência da idade e do tamanho do rebanho na soroprevalência da leucose enzoótica bovina em rebanhos produtores de leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.10, n.1, p.21-22, 2003.

LIMA, E. G.; HAYSSAKA, I. M.; PEINADO, M. Inquérito sorológico para Leucose Bovina em gado importado. **Revista de Patologia Tropical**, v. 9, n. 3/4, p. 137-143, 1980.

LUCAS, M. H. Enzootic Bovine Leukosis. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H. **Bovine Medicine**. Lodon; Blackwell Scientific Publications, 1992, p. 530-537.

LUDRS, M. A.; **Prevalência de Anticorpos contra o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina em fêmeas com mais de dois anos no Rebanho de Bovinos Leiteiro no Município de Mafra-SC**, 30 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agroveterinária/Sanidade Animal) – Universidade de Santa Catarina, Iges, 2001.

MCDONALD, R.; FERRER, J. F. Detection, quantitation and characterization of the major internal virion of the bovine leukemia virus by radioimmunoassay. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 57, n. 4, p. 875-882, 1976.

MATOS, P. F.; BIRGEL JUNIOR, Eduardo Harry ; BIRGEL, E. H. . Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre resultados do teste de Elisa e da imunodifusão em gel de ágar. **Brazilian Journal of Veterinary Research the Animal Science**, São Paulo, v. 42, p. 171-180, 2005.

MEGID, J.; NOZAKI, C.N.; KURODA, R.B.S.; CRUZ,T.F.; LIMA,K.C. Ocorrência de leucose enzoótica bovina na microregião da Serra de Botucatur, SP, Brasil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.5, Belo Horizonte, Outubro 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 – Patologia Bovina.

MILLER, J. M.; MILLER, L. D.; OLSON, C.; GILLETTE, K. G. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures in reference to bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 43, p. 1297-1305, 1969.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Serological detection of bovine leukemia virus. **Veterinary Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 195-202, 1976.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukosis virus. **Journal of the National Cancer Institute** v. 62, n. 2, p. 425-428, 1979.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Bovine leukosis – Its importance to the Dayre Industry in the United states. **Journal Dary Science**, Champaign, v. 65, n. 11, 1982.

MODENA, C. M.; ABREU, V. L. V.; SILVA, J. A.; MOREIRA, E. C.; AZEVEDO, N. A.; REHFELD, A. M. Ocorrência da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina em animais importados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 35, n. 4, p. 565-573, 1984.

MOLNÁR, E; MOLNÁR, L.; DIAS, H.T.; SILVA, A.O.A.; VALE, W.G. Ocorrência de leucose enzoótica dos bovinos no Estado do Pará, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v.19, n.1, p.171-175, 1999.

MORAES, M. P.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F.; OLIVEIRA, J. C. D.; REBELATTO, M. C.; ZANINI, M.; RBUSKE, M.; HÜBNER, S. O.; PEREIRA N. M. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, p. 257-262, 1996.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. 4.ed. Paris: OIE, 2004. Disponível Em: <<http://www.oie.int/eng/Norms/mmanual/htm>>. Acesso em: 17/03/ 2009.

OLIVEIRA, A. R.; BARRETO, C. S. F.; MERICHELLO, D.; SANQUENTIN, W. M. Epidemiologia da leucose Bovina: Ocorrência de anticorpos em faixa etárias. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 6, 1997.

PELZER, K; SPRECHERD, J. Controlling BLV infection on dairy operations. **Veterinary Medicine**, v. 88, n. 3, p. 275-281, 1993.

POLLETO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiro do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rual**. Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 595-598, 2004.

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

ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrech, v.13, n.2, p.107-111, 1981.

SILVA, S. V. **Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos cruzados – holandês/zebu e em animais da raça Pé-duro, criados no Estado do Piauí.** São Paulo, 2001.176p. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

SIMÕES, S. V. D. **Prevalência Enzoótica dos Bovinos. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose dos Bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado da Paraíba.** São Paulo, 1998. 118 p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

SIMÕES, S. V. D.; BIRGEL, E. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; AYRES, M. A. C. Prevalência da leucose bovina em animais criados no estado do Rio grande do Norte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4. **Anais.** Campo Grande, 2001.

SPONCHIADO, D. **Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos da raça holandesa preta e branca, criados no estado do Paraná, Brasil.** Dissertação para obtenção do grau de Mestre, 101p. 2008

SPRECHER, D. J.; PELZER, K. D.; LESSARD, P. Possible effect of altered management practices on seroprevalence of bovine leukemia virus in heifers of a dairy herd with history of high prevalence of infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.199, n. 5, p. 584-588, 1991.

TÁVORA, J. P. F.; BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em rebanhos leiteiros criados na região do pólo de Itabuna, Estado da Bahia. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 14, p. 164-183, 1991.

TENÓRIO, T. G.S. **Leucose Enzoótica, Leptospirose E Brucelose: Inquérito sorológico em rebanhos bovinos leiteiros do estado de Pernambuco.** Dissertação de Mestrado (Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco. Fev, 2003.

THUSFIELD, V. **Veterinary Eoidemiology**. London. Butterworths, 2007. 610p.

VAN DER LAAN, C. W.; VIDOR, T.; BRAGA, F. T.; HALFEN, D.; HUBNER, S. O.

Leucose Enzoótica Bovina em bovinos produtores de leite importados do Uruguai. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 5, n. 1, p. 139-141, 1999.

## APÊNDICE

### QUESTIONÁRIO – PROJETO LEUCOSE - Doutorado 2006 - 2008

N.º \_\_\_\_\_

Propriedade:

Endereço:

Data:    /    /

Proprietário:

Telefone:

Município:

Estado:

Regime de Criação:

Área total: \_\_\_\_\_ha

Área destinada ao Pastejo e/ou capineiras: \_\_\_\_\_ha

ANIMAIS										
Faixa Etária	0 a 12 meses		12 a 24 meses		24 a 36 meses		Acima de 36 meses		TOTAL	
Sexo	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Quantidade										

QUE OUTRAS ESPÉCIES SÃO CRIADAS NA PROPRIEDADE									
Espécies	Caninos	Felinos	Bubalinos	Ovinos	Caprinos	Eqüinos	Asinino	Suínos	Aves
Nº									

#### MANEJO DA CRIAÇÃO

► Como são criados os animais? ( ) Extensivo ( ) Semi-Intensivo ( ) Intensivo

► Adquire animais com freqüência? ( ) Sim ( ) Não

Procedência \_\_\_\_\_ Realizou Quarentena ( ) Sim ( ) Não

Qual sexo? ( ) Macho ( ) Fêmea

► Tipo de Exploração Animal:

( ) Produção de leite ( ) Produção de carne ( ) Produção mista

#### REPRODUTIVO

► Quantos nascimentos ocorrem durante o ano (média) ? \_\_\_\_\_

► Taxa de Mortalidade: ( ) Alta ( ) Média ( ) Baixa

► Época do ano em que ocorre o maior número de partições? \_\_\_\_\_

► Os bezerros ao nascerem apresentam-se:

( ) Normais ( ) Anormais ( ) Fracos ( ) Dificuldade de locomoção ( ) Outros

► Idade em que a fêmea é coberta pela primeira vez? \_\_\_\_\_

► Realiza Inseminação Artificial ( ) Sim ( ) Não

#### ALIMENTAR

- ▶ Alimentação ( ) Capim ( ) Ração ( ) Capim + Ração ( ) Outros \_\_\_\_\_
- ▶ Como é fornecida aos animais? ( ) No cocho ( ) À pasto ( ) Ambos
- ▶ Costuma fornecer feno e/ou silagem aos animais ( ) Sim ( ) Não

Qual a origem? \_\_\_\_\_

- ▶ Durante o ano oferece sal para os animais ( ) Sim ( ) Não

Qual o tipo? ( ) Mineral ( ) Comum

- ▶ Nos locais onde os animais pastam e/ou fica armazenado feno e silagem os cães tem acesso? ( ) Sim ( ) Não

- ▶ Fornece água ( ) Sim ( ) Não Qual a origem? ( ) Poço ( ) Rio ( ) Barreiro

## SANITÁRIO

- ▶ Possui assistência veterinária ( ) Sim ( ) Não
- ▶ Faz vacinação ( ) Aftosa ( ) Raiva ( ) Manqueira ( ) Brucelose ( ) Outras Quando? \_\_\_\_\_

- ▶ Foi realizado coleta de material dos animais para a realização de exames? ( ) Sim ( ) Não Qual(is) e Quando? \_\_\_\_\_

- ▶ Que testes foram realizados?

( ) Brucelose ( ) Tuberculose ( ) Leptospirose ( ) Parasitológico ( ) Leucose

- ▶ Realiza controle de ecto e endoparasitos? ( ) Sim ( ) Não

( ) Periódico ( ) Esporádico ( ) 6 em 6 meses ou 3 em 3 meses ( ) Anualmente Como? Produto(s)? \_\_\_\_\_

- ▶ Usa algum tipo de remédio caseiro? ( ) Sim ( ) Não

Qual (is)? Para que? \_\_\_\_\_

- ▶ Conhece alguma doença que acomete os bovinos, e que pode afetar no processo reprodutivo ( ) Sim ( ) Não

Leucose ( ) Brucelose ( ) Toxoplasmose ( ) Leptospirose ( ) Outras

- ▶ Presença de ratos ( ) Sim ( ) Não

- ▶ Que outros roedores domésticos e silvestres existem? \_\_\_\_\_

- ▶ Qual a importância da?

- ▶ Usa a mesma agulha em vários animais?

- ▶ Usa a mesma luva obstétrica em vários animais?

## **2º ARTIGO CIENTÍFICO**

**AVALIAÇÃO DE UMA MICROIMUNODIFUSÃO PARA O DIAGNOSTICO DA  
LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA USANDO PROTOCOLO SIMPLES PARA  
OBTENÇÃO DE ANTÍGENO**



## AValiação de uma Microimunodifusão para o Diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina usando Protocolo Simples para Obtenção de Antígeno

Hamilton Pereira **SANTOS**<sup>1</sup>, Helder de Moraes **PEREIRA**<sup>2</sup>, Sergio Alves do **NASCIMENTO**<sup>3</sup>, Daniela da Silva **Pereira**<sup>4</sup>, Luciana Cavalcante de Arruda **COUTINHO**<sup>4</sup>, Whaubtyfran Cabral **TEIXEIRA**<sup>4</sup>, Vanessa Evangelista de **SOUSA**<sup>5</sup>, Janaira de **SÁ**<sup>5</sup>, Roberto Soares de **CASTRO**<sup>6</sup>

### RESUMO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma enfermidade de bovinos adultos causada pelo vírus da LEB (VLEB; *Bovine leukemia virus*). A maioria dos animais infectados não apresenta sinais clínicos, cerca de 30 a 70% desenvolvem linfocitose persistente após os três anos de idade e apenas pequena proporção (0,1 a 10%) desenvolve linfossarcomas em vários órgãos. Devido à alta proporção de animais infectados que não manifestam sinais clínicos, os testes laboratoriais são importantes ferramentas auxiliares ao diagnóstico da infecção pelo VLEB. A imunodifusão em gel de Agar (IDGA) é o teste sorológico mais usado e recomendado para certificação internacional pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e pela União Européia. Visando aperfeiçoar a IDGA empregada no Brasil para diagnóstico da LEB, este trabalho foi desenvolvido como objetivo de avaliar uma micro-IDGA usando protocolo simples para obtenção do antígeno comparativamente a uma macro-IDGA. Foram utilizadas 450 amostras de soro bovino provenientes de 92 rebanhos dos 23 municípios que compõem a bacia leiteira do estado do Maranhão. O antígeno usado na micro-IDGA foi obtido por diálise frente ao polietilenoglicol de sobrenadante de células FLK infectadas pelo VLEB. Na micro-IDGA utilizou-se 10 µl de antígeno e soro controle positivo e 30 µl do soro teste; na macro-IDGA 25 µl de todos os reagentes, produzidos pelo Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR). Dos soros comparados, 259 (57,56%) e 245 (54,44%) apresentaram resultados positivos na micro-IDGA e macro-IDGA, respectivamente. Houve ótima concordância entre as duas técnicas ( $K=0,91$ ), com sensibilidade e especificidade da macro-IDGA em relação a micro-IDGA de 93,43% e 98,43%. A micro-IDGA apresentou

<sup>1</sup> Professor Adjunto da Universidade Estadual do Maranhão – Departamento de Patologia Veterinária – [hpsluiza@yahoo.com.br](mailto:hpsluiza@yahoo.com.br) – São Luís – MA – 65055-970.

<sup>2</sup> Professor Adjunto da Universidade Estadual do Maranhão - Departamento das Clínicas Veterinária São Luís-MA-65055-970.

<sup>3</sup> Biólogo da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – Recife – PE – 52171-900.

<sup>4</sup> Alunos de Pós-Graduação do Programa Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife – PE – 52171-900.

<sup>5</sup> Alunos de Iniciação Científica da Universidade Estadual do Maranhão – São Luís – MA – 65055-970.

<sup>6</sup> Professor Associado da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Departamento de Medicina Veterinária – Recife – PE – 52171-900.

linhas mais claras do que as observadas na macro-IDGA e a leitura pode ser feita 24 horas antes da macro-IDGA. Conclui-se que a micro-IDGA pode substituir a macro-IDGA no diagnóstico sorológico da LEB, com a vantagem de maior rapidez na emissão dos resultados e da obtenção do antígeno com técnica simples.

**Palavras Chaves:** Bovinos, diagnóstico, IDGA, Leucose enzoótica bovina.

## EVALUATION OF A MICROIMMUNODIFUSION ASSAY FOR THE DIAGNOSIS OF ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS

### ABSTRACT

The Enzootic Bovine Leukosis is a disease of adult cattle caused by Bovine leukemia virus (BLV). Most infected animals do not present clinical signs, about 30 to 70% develop persistent lymphocytosis after three years of age and only a small proportion (0.1 to 10%) lymphosarcomes affecting several organs. Due to the high proportion of infected animals showing no clinical signs, laboratory tests are important aids to the diagnosis of infections by BLV. The agar gel immunodiffusion test (AGID) is the serological test most widely used and recommended for certification by the International Organization for Animal Health (OIE) and the European Union. In order to refine the AGID used in Brazil for the diagnosis of EBL, this work was developed to evaluate how a micro-AGID using simple protocol for obtaining the antigen compared to a macro-AGID. A total of 450 serum samples from 92 properties in 23 counties that make up the dairy herd of Maranhão were used. The antigen used in micro-AGID was obtained by dialysis of supernatant of FLK cells infected by BLV against the polyethylenogricol. In micro-AGID 10 µl of antigen and positive serum control was used and 30 µl of test serum, in the macro-AGID 25 µl of all reagents were used. This produced by the Technological Institute of Parana (TECPAR). Of the sera compared, 259 (57.56%) and 245 (54.44%) showed positive results in micro-AGID and macro-AGID, respectively. There was a very good agreement between both techniques ( $K = 0.91$ ), with sensitivity and specificity of the macro-AGID for micro-AGID of 93.43% and 98.43% with an accuracy of 95.96%. Micro-AGID showed clearer lines than those observed in the macro-AGID and reading can be made 24 hours before the macro-AGID. It is concluded that micro-AGID can be used successfully in the serological diagnosis of EBL, with the advantage of greater speed in issuing the results and obtaining the antigen with a simple technique.

**Keywords:** Leukosis, diagnosis, bovine, microimmunodifusion, assay

## 1. INTRODUÇÃO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma enfermidade de bovinos adultos causada pelo vírus da LEB (VLEB; *Bovine leukemia virus*), isolado por Miller et al. (1969), que pertence ao gênero *Deltaretrovirus* da subfamília *Orthoretrovirinae*, família *Retroviridae* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2009). A maioria dos animais infectados pelo VLEB não apresenta sinais clínicos, cerca de 30% a 70% desenvolvem linfocitose persistente após três anos de idade e apenas pequena proporção (0,1% a 10%) desenvolve linfossarcomas em vários órgãos, que levam a distúrbios digestivos, inapetência, perda de peso, fraqueza, debilidade geral e, às vezes, alterações neurológicas. Os linfonodos superficiais apresentam-se aumentados (OIE, 2008). Além disso, há relatos da possibilidade do VLEB ser imunossupressor, podendo agir como fator predisponente a outras doenças, (Fetrow e Ferre, 1982). Animais infectados são descartados mais cedo devido a outros transtornos, tais como, infertilidade e perda na produção de leite (Straub, 1984).

O VLEB pode ser transmitido principalmente por exposição direta a fluidos biológicos contaminados com linfócitos infectados, particularmente sangue, leite, sêmen, saliva, urina, secreções nasal e traqueal (Johnson; Kaneene, 1992). A transmissão do vírus ocorre de forma principalmente horizontal, direta ou indireta, ou vertical, intra-uterina ou pela ingestão do leite (Miller e Van Der Maaten, 1982).

Devido à alta proporção de animais infectados que não manifestam sinais clínicos, os testes laboratoriais são importantes ferramentas auxiliares no diagnóstico da infecção pelo VLEB. Diante das dificuldades para isolamento e identificação viral, as técnicas sorológicas são as mais empregadas, destacadamente a imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (Altaner et al., 1982). A IDGA é o teste sorológico mais usado, pois apresenta boa aceitação pelo baixo custo, alta especificidade e praticidade de execução, porém tem sensibilidade inferior ao ELISA, e sua interpretação é relativamente subjetiva, requerendo experiência do executor. O ELISA é um teste de custo mais elevado do que o IDGA, porém a leitura é automatizada, é mais adequado para testes em larga escala e pode ser usado com amostras de soro e leite. Ambos os teste são atualmente recomendados para certificação internacional pela OIE (OIE, 2008) e pela União Europeia (Commission Decision of 15 December 2009).

Em relação à IDGA, vários protocolos já foram desenvolvidos, a partir da descrição original de Miller e Van der Maaten (1976), usando-se os principais antígenos virais (p24 ou gp51), obtidos a partir de células renais ovinas (FLK) persistentemente infectadas pelo VLEB,

desenvolvidas por Van der Maaten et al. (1974). Diversos procedimentos são empregados na obtenção dos antígenos, como: diálise contra polietilenoglicol, (PEG), precipitação em sulfato de amônia seguida de ultrafiltração e precipitação com PEG seguida de diálise e separação em coluna de poliacrilamida (OIE, 2008). Há também várias formulações de géis, formato, tamanho e distância entre os poços do molde para perfuração do gel, bem como seu arranjo no molde. Atualmente, o antígeno recomendado para diagnóstico da LEB é a gp 51 OIE (2008); União Européia (Commission Decision of 15 December 2009). No Brasil, em praticamente todos os estudos epidemiológicos realizados foram empregados antígenos importados, pois só recentemente foi desenvolvido um kit empregando o antígeno gp51 preparado a partir de sobrenadante de células renais de cordeiro (FLK) persistentemente infectadas, obtido por precipitação com sulfato de amônia, ultrafiltração e ultracentrifugação (Dittrich, 2004), produzido pelo Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR). Com base na quantidade de reagentes utilizados e no modelo do molde perfurador do gel e os volumes dos reagentes, todos os teste até então desenvolvidos para a LEB referem-se à macro-IDGA<sup>1</sup>. Estudo comparativo entre uma macro-IDGA e micro-IDGA para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) demonstrou que a micro-IDGA é mais sensível e apresenta leitura das reações mais precoce com linhas mais nítidas (Arruda et al., 2006).

O presente trabalho foi desenvolvido como objetivo de avaliar uma micro-IDGA usando protocolo simples para obtenção do antígeno comparativamente a uma macro-IDGA para ser utilizada no diagnóstico sorológico da LEB.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-IDGA**

#### **2.1.1. Produção do Antígeno**

O antígeno foi produzido a partir de sobrenadantes de cultivo de células de rim de feto de cordeiro (FLK), cronicamente infectadas pelo VLEB (Van der Maaten et al., 1974), multiplicadas em meio de crescimento (meio essencial mínimo - MEM, acrescido de 10% de soro fetal bovino - SFB) e incubadas em estufa a 37° C. Após a confluência da monocamada o meio de crescimento foi substituído pelo meio de manutenção (MEM com 2% de SFB). A partir do sétimo dia de incubação, colhia-se o sobrenadante de cada garrafa, que era

---

<sup>1</sup> Para efeito deste artigo foi definido como macro-IDGA o teste realizado com 25µl ou mais do antígeno e do soro controle positivo e como micro-IDGA aquele realizado com 10 µl.

submetida à nova passagem. Os sobrenadantes eram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento dos passos de purificação.

Após três ciclos de congelamento e descongelamento dos sobrenadantes, procedeu-se à centrifugação a 3.300g por 30 minutos e diálise do sobrenadante em membrana contra Polielenoglicol (PEG 8.000) a 40% em PBS (pH 7,6) a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 48 a 72 horas, até a concentração de aproximadamente 50-100 vezes, quando foi coletado o estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após descongelamento o antígeno foi testado frente aos kits TECPAR (Paraná, Brasil) e *Behringwerke AG* (Marburg, Alemanha), conforme os fabricantes, e mostrou linhas de identidade com os soros padrões de ambos os kits. O antígeno foi titulado de acordo com a micro-IDGA (conforme o item 2.2) em diluições duplas, frente ao soro padrão e usado como duas unidades precipitantes<sup>2</sup> (UP), conforme preconizado pela OIE (2008).

### **2.1.2. Produção do Soro Padrão**

O soro padrão foi preparado a partir do soro de um bovino soropositivo para LEB, cujo material foi cedido pela Clínica de Bovinos Campus de Garanhuns – UFRPE, naturalmente infectado. O soro foi precipitação com ácido caprílico seguida de fracionamento com solução saturada de sulfato de amônia (Page e Thorpe 1998). Após incubação e centrifugação a 5.000g por 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso até 1/4 do volume inicial em PBS pH 7,6, e submetido à diálise por 48 horas, a  $4^{\circ}\text{C}$  (Bracht e Ishii-Iwamoto, 2002). Em seguida o soro foi testado frente aos kits TECPAR (Paraná, Brasil) e *Behringwerke AG* (Marburg, Alemanha) e mostrou linhas de identidade com os soros padrões. Finalmente, o soro foi titulado na micro-IDGA (item 2.2), em diluições duplas, frente ao antígeno produzido para micro-IDGA e usado como duas UP.

### **2.2. Realização da macro-IDGA e micro-IDGA**

A macro-IDGA foi realizada conforme instrução do fabricante (TECPAR, Paraná, Brasil). A micro-IDGA foi realizada em placa de Petri descartáveis, de 90mm de diâmetro. Cada placa continha 16 ml de agarose 1% (p/v) em solução tampão borato de sódio (108 mM, pH 8,6). No momento dos testes o gel foi perfurado com molde em forma hexagonal, de maneira a formar sete poços, sendo um central, onde foi adicionado o Ag, e seis periféricos equidistantes, onde foram adicionados, de forma alternada, o SP e os soros a serem testados.

---

<sup>2</sup> Uma unidade precipitante corresponde à maior diluição que apresenta uma linha de identidade com o padrão equidistante entre as bordas dos poços.

Os poços destinados ao soro padrão e o antígeno tinha 3 mm de diâmetros, com capacidade para 10 µl de cada reagente, e os destinados aos soros a serem testados, 5mm (30µl), todos equidistantes a 2mm. Terminada a adição dos reagentes, as placas foram incubadas em câmara úmida à temperatura em torno de 25°C e realizada leitura após 24h e 48h de incubação.

### **2.3. Comparação dos Testes**

A micro-IDGA foi comparada com a macro-IDGA, por meio do indicador de concordância ajustada *Kappa* (*k*), sensibilidade e especificidade através do programa de estatística (OpenEpi versão 2.2.1/2008), calculados com base no teste de 450 amostras séricas de bovinos leiteiros colhidas durante um inquérito soropidemiológico, envolvendo 92 propriedades, localizadas na bacia leiteira do estado do Maranhão (Santos et al., 2010).

As leituras das reações dos testes de micro-IDGA e macro-IDGA foram feitas às 24 e 48 horas após a realização dos testes. Os soros foram considerados positivos quando ocorria a formação de linha de precipitação entre o poço central (Ag) e o soro testado, apresentando identidade com a linha formada entre o soro padrão (SP) e o Ag. Os resultados das leituras foram registrados da seguinte forma: negativo (-), fracamente positivo (+), positivo (++) , fortemente positivo (+++) e inespecífico. Durante as leituras foi comparada a nitidez das linhas de precipitação dos testes.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 450 soros testados, 259 (57,56%) e 245 (54,44%) apresentaram resultados positivos na micro-IDGA e macro-IDGA, respectivamente. Quando comparados os resultados observou-se ótima concordância entre os dois testes ( $k = 0,91$ ), com sensibilidade, especificidade e acurácia de 93,43%, 98,43 e 95,56%, respectivamente (Tab 1).

**Tabela 1.** Resultado dos testes de 450 amostras séricas de bovinos submetidas às técnicas de macro-imunodifusão (macro-IDGA) e micro-imunodifusão (micro-IDGA) para pesquisa de anticorpos contra o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina – VLEB

Macro-IDGA	Micro-IDGA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	242	3	245
Negativo	17	188	205
Total	259	191	450

Sensibilidade = 93,43%, Especificidade = 98,43%, Acurácia do Diagnóstico = 95,56%.

A validade de um teste diagnóstico pode ser estimada com base em seus valores intrínsecos (sensibilidade e especificidade), que são próprios do teste e não sofrem influência da prevalência e nem da enfermidade (Astudillo; Kantor 1981). Classicamente, a sensibilidade é definida como o percentual de verdadeiros positivos identificados no teste e a especificidade o dos verdadeiros negativos, quando comparados um teste consagrado como *standard gold* ou outro de uso clássico. Nesta primeira avaliação da micro-IDGA para diagnóstico da LEB foi considerado como padrão um teste já desenvolvido e usado no país, produzido pelo TECPAR, que detecta anticorpos contra gp51 do VLEB. É sabido que a IDGA é um teste qualitativo, onde pode-se avaliar as linhas formadas entre o antígeno e o soro teste de forma comparativa às formadas com o soro controle positivo. As linhas observadas nos soros positivos na micro-IDGA, porém negativos na macro-IDGA eram nítidas, não deixando dúvidas quanto à positividade.

Com relação às características qualitativas de intensidade da linha de precipitação e nitidez, observou-se que em 24 horas de incubação o controle positivo na técnica de micro-IDGA apresentou linhas de precipitação mais nítidas quando comparadas com as da macro-IDGA. Entretanto, não houve variação importante entre as técnicas quanto à intensidade das linhas dos controles na leitura realizada após 48 horas de incubação. Os soros de campo submetidos à micro-IDGA reagiram nas 24 horas de incubação, mesmo aqueles com reações fracamente positivas, enquanto que na macro-IDGA, estes soros reagiram mais tardiamente, até 48 horas após incubação.

Considerando-se apenas os resultados positivos, quanto à intensidade das linhas de precipitação para emissão dos resultados na macro e micro-IDGA observa-se que das 204 amostras negativas na macro-IDGA, 16 passaram a positiva na micro-IDGA e que 48 dentre as positivas na macro-IDGA melhoraram a intensidade das linhas na micro-IDGA. Por outro



lado, uma amostra fracamente positiva na macro-IDGA passou a negativa na micro-IDGA e duas amostras positivas na macro-IDGA tiveram linhas menos intensas na micro-IDGA (Tab 2). Assim, de modo geral verifica-se que a micro-IDGA além de detectar maior número de animais positivos, apresenta melhor leitura das reações. Isto é importante, pois minimiza os efeitos da subjetividade na leitura da IDGA, contribuindo para resultados mais consistentes. Resultados semelhantes foram descritos por Winward et al. (1979) e Arruda et al. (2006), trabalhando com a micro-IDGA para diagnóstico de lentevírus de pequenos ruminantes - LVPR (CAEV e Maedi-Visna).

**Tabela 2.** Distribuição dos resultados das leituras dos testes de 450 amostras séricas de bovinos submetidas às técnicas de macro-imunodifusão (macro-IDGA) e micro-imunodifusão (micro-IDGA) para pesquisa de anticorpos contra o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina – VLEB

Macro-IDGA	N	Micro-IDGA	n
(-)	204	(-)	187
		(+)	16
		(++)	1
(+) )	183	(-)	1
		(+)	134
		(++)	44
		(+++)	4
(++)	49	(+)	1
		(++)	48
(+++)	14	(+)	1
		(+++)	13

(-) = negativo, (+) = fracamente positivo, (++) = positivo, (+++) = fortemente positivo.

A reação antígenos/anticorpo detectada pela IDGA é caracterizada pela precipitação e formação de linhas visíveis no gel. Para se aprimorar a IDGA, muitas variáveis podem ser estudadas, entre elas: concentração dos reagentes, constituintes do gel e da solução tampão utilizados e o molde para perfurar o gel (formato, diâmetro e distância entre os poços). Dependendo da variação da concentração do antígeno e do anticorpo pode haver deslocamento dessas linhas para mais próximo de um dos reagentes ou até inibição de sua formação. Por isso foram feitas às titulações dos reagentes, ajustadas para 2 UP, conforme preconizado pela OIE (2008). As precipitações dessas linhas podem ainda ser influenciada pelas condições físico-químicas, como a concentração eletrolítica do gel, a solução tampão empregada na sua preparação, o pH, a temperatura e a umidade. Em ambas as provas foram utilizadas agarose de alto grau de pureza, permitindo melhor migração dos reagentes e melhor

visualização das linhas de precipitação. Na macro-IDGA o tampão utilizado foi o PBS com EDTA, pH 7,3; na micro-IDGA foi utilizado o tampão borato, que tem se mostrado o mais adequado para os LVPR (Arruda et al., 2006).

Na micro-IDGA foi utilizado um molde de forma hexagonal com diâmetros diferentes dos poços que permie o uso de diferentes volumes dos reagentes, ainda não empregado no diagnóstico da LEB. Nos poços destinados ao antígeno e ao soro padrão foram usados 10 µl e nos destinados aos soros a serem testados 30 µl. Isto pode explicar as melhores linhas observadas na micro-IDGA em relação às da macro-IDGA, bem como a maior capacidade de detecção de animais positivos através da micro-IDGA, possivelmente aqueles de títulos de anticorpos mais baixos, insuficientes para formar linhas perceptíveis na macro-IDGA. Resultados semelhantes foram descritos por Winward et al. (1979) e Arruda et al. (2006) trabalhando com a micro-IDGA para diagnóstico LVPR. Recentemente, uma normativa da União Européia (Commission Decision of 15 December 2009) sobre o diagnóstico da LEB preconiza que os reagentes sejam distribuídos em uma cavidade central em torno da qual se ordenam seis cavidades periféricas dispostas em círculo: diâmetro da cavidade central de 4 mm (32 µl do antígeno) e diâmetro das cavidades periféricas de 6 mm (73 µl do soro padrão ou teste). Possivelmente esta distribuição tenha a mesma finalidade deste estudo, porém na normativa não é feita nenhuma menção a pesquisa desenvolvida com este fim.

Os principais antígenos do VLEB são a proteína p24 e a glicoproteína gp51. Esta é a proteína do envelope que apresenta importantes funções biológicas por interagir mais diretamente com o hospedeiro através de receptores celulares. Após vários estudos chegou-se a conclusão que o antígeno mais recomendado para diagnóstico da LEB é a gp51, pois os animais infectados desenvolvem mais precocemente anticorpos contra essa glicoproteína do que contra a p24, que persistem por períodos mais longos do que os contra a p24 (Onuma et al., 1975). As preparações de antígenos obtidas a partir das células FLK infectadas persistentemente com o VLEB são constituídas por várias proteínas, principalmente p24 e gp51, porém conforme sua titulação para uso diagnóstico na IDGA será capaz de detectar anticorpos contra um e/ou outro antígeno (Miller e Van der Maaten, 1976). O antígeno preparado para a micro-IDGA foi titulado frente a dois soros padrões comerciais conhecidamente reagentes para a gp51 em paralelo aos antígenos fornecidos pelos fabricantes e apresentou uma única linha de perfeita identidade. Desta feita, a micro-IDGA é considerada como um teste que detecta anticorpos contra gp51, o que atende às exigências para certificação de animais para trânsito internacional (OIE, 2008; Commission Decision of 15 December, 2009).

#### **4. CONCLUSÃO**

A micro-IDGA pode substituir a macro-IDGA no diagnóstico sorológico da Leucose Enzoótica Bovina, com maior sensibilidade e rapidez na emissão dos resultados.

## **5. AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida ao professor Roberto Soares de Castro; À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concessão ao Professor Hamilton Pereira Santos; À fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado do Maranhão, pela concessão da ajuda através do Programa de Apoio a Projetos de Pesquisa; Ao Instituto do Agro-negócio do Estado do Maranhão pela ajuda concedida ao Projeto; Ao professor Rômulo Cerqueira Leite da Universidade Federal de Minas Gerais pela concessão de vírus da Leucose Enzoótica Bovina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTANER, C.; ZAJAC, V.; BAN, J.A. A simple and inexpensive method for detection of BLB infected cattle based on modified ELISA principle. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Berlin, v. 29, n. 8, p. 583-590, 1982.

ARRUDA, E.T. **Avaliação de uma microimunodifusão em gel de ágar para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos**. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife., 2006. 76p.

ASTUDILLO, V.M. & KANTAS, I.N. El problema de la validez de una prueba diagnóstica para uso masivo como procedimiento estadístico de clasificación. **Boletín Centro Panamericano Fiebre Aftosa**, v. 43/44, p.37-43 1981

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Métodos de Laboratório em Bioquímica. **Manole**, Barueri, p. 77-192, 2002.

DITTRICH, T. R. C. **Produção de Reagentes para o Diagnóstico da infecção pelo Vírus da leucose Bovina**. Tese Doutorado, UFP, 179 p., 2004.

FETROW, J; FERRE, J. F. Bovine leukemia virus infection and mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.65, p. 881-882, 1982.

JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. **Veterinary Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 287-314, 1992.

MILLER, J. M.; MILLER, L. D.; OLSON, C.; GILLETTE, K. G. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1297-1305, 1969.

MILLER, J. M.; VAN DER MATTEEN, M. J. Serologic detection of Bovine Leukemia Virus infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 31, p.47-55, 1976.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Bovine leucosis – Its Importance to the Dairy Industry in the United States. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 11, 1982.

ONUMA , M.; OLSON, C.; BAUMGARTNER , L. E. An ether sensitive antigen associated with bovine leukemia virus infection. **Journal National Cancer Institute**, Cary, v. 55, p. 1155-1158, 1975.

OPEN EPI.2.2.1/2008. [http://www.openepi.com/Diagnostic\\_Test/Diagnostic\\_Test.html](http://www.openepi.com/Diagnostic_Test/Diagnostic_Test.html).  
Acessado em: 11/05/2009.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE SAÚDE ANIMAL. **Manual de la OIE sobre animales terrestres. LEUCOSE BOVINA ENZOÓTICA**, 2008. [www.oie.manualanimalterestre](http://www.oie.manualanimalterestre). Acessado em 22 de janeiro, 2010.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE SAÚDE ANIMAL. **Manual de la OIE sobre animales terrestres** INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2009. [www.oie.manualanimalterestre](http://www.oie.manualanimalterestre). Acessado em 22 de janeiro, 2010

ORGANIZACION INTERNACIONAL DE LA SALUD ANIMAL (OIE). Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4.ed. Paris: OIE, 2009. Disponível Em: Commission Decision of 15 December 2009 amending Annex D to Council Directive 64/432/EEC as regards diagnostic tests for enzootic bovine leukosis (notified under document C(2009) 9951) Text with EEA relevance. Official Journal L 336 , 18/12/2009 p. 0036 – 0041  
**Official Journal L 336 , 18/12/2009 P. 0036 – 0041.**  
<<http://www.oie.int/eng/Norms/mmanual/htm>>. Acesso em: 09/02/ 2010.

PAGE, M.; THORPR, R. **Methods in Molecular Biology**. Imuonochemical protocols, 2ª ed., v. 80, p.95-111, 1998.

SANTOS, H. P.; CASTRO, R. S.; PEREIRA, H. M.; NASCIMENTO, S. A.; COUTINHO, L. C. A; TEIXEIRA, W. C.; ARRUDA, R. C. N.; BEZERRA, N. P. C.; BEZERRA, D. C. **Soroprevalência e Fatores de Risco Associados à Leucose Enzoótica Bovina em Rebanhos da Bacia Leiteira do estado do Maranhão**. Tese Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

STRAUB, O. C. Enzootic bovine leukosis – aq slow virus disease. **Outlook on Agriculture**, London, v. 8, n. 4, p. 179-184, 1984

VAN DER NAATEN, M. J.; MILLER, J. M.; BOOTHE, A. D. Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle with lymphosarcoma, **Juonal. Natl. Cancer Institute.**, 52, 491, 1974.

WINWARD, L.D.; LEENDERTSEN, L.; SHEN, D.T. Microimmunodiffusion test for diagnosis of ovine progressive pneumonia. **American. Journal. Veterinary. Research.**,v.40, p.564-566,1979.