

**CLÁUDIO HENRIQUE CLEMENTE FERNANDES**

**LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS: SOROPREVALÊNCIA,  
FATORES DE RISCO E NÍVEIS SÉRICOS DE LISOZIMA EM  
BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO DO TOCANTINS, BRASIL**

**RECIFE - PE**

**2007**

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

**CLÁUDIO HENRIQUE CLEMENTE FERNANDES**

**LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS: SOROPREVALÊNCIA,  
FATORES DE RISCO E NÍVEIS SÉRICOS DE LISOZIMA EM  
BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO DO TOCANTINS, BRASIL**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo

**RECIFE - PE**

**2007**

### **Ficha Catalográfica**

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

F363 1    Fernandes, Cláudio Henrique Clemente  
          Leucose enzoótica dos bovinos: soroprevalência, fatores  
          de risco e níveis séricos de lisozima em bovinos leiteiros do  
          Estado do Tocantins, Brasil / Cláudio Henrique Clemente  
          Fernandes. -- 2007.  
          89 f.: il.

          Orientador: Lúcio Esmeraldo Honório de Melo  
          Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade  
          Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina  
          Veterinária.  
          Inclui bibliografia

CDD 636.208 96

1. Bovino
  2. Leucose
  3. Lisozima
  4. Tocantins, BR
- I. Melo, Lúcio Esmeraldo Honório de  
II. Título

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

**LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS: SOROPREVALÊNCIA,  
FATORES DE RISCO E NÍVEIS SÉRICOS DE LISOZIMA EM  
BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO DO TOCANTINS, BRASIL**

Tese de Doutorado elaborada e defendida por:

**CLÁUDIO HENRIQUE CLEMENTE FERNANDES**

**Aprovado pela Banca Examinadora:**

Orientador:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo H. de Melo (UFRPE)

Examinadores:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto (FMVZ-USP)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Francisco Feliciano da Silva (DMV-UFRPE)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva (DMV-UFRPE)

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Andréa Paiva B. L. de Moura (DMV-UFRPE)

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Néria Vânia Marcos dos Santos (DMV-UFRPE)

**RECIFE - PE**

**2007**

## DEDICATÓRIA

**Aos meus pais Petrônio Fernandes da Silva e Luiza Clemente  
Fernandes (*in memoriam*)**

Pelo amor e incentivo, exemplos de vida e dedicação à família  
ensinando sempre a trilhar os caminhos da vida com simplicidade,  
fé e dignidade.

**A MINHA ESPOSA Malba Sousa Fonseca E MEUS FILHOS, Pedro  
Guilherme, João Henrique e Luisa Fonseca Fernandes.**

Pelo amor e carinho ofertado, a razão da minha vida.

**AMO VOCÊS!**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela força e luz que tem acompanhado toda minha caminhada.

Ao orientador Prof. Dr. **Lúcio Esmeraldo Honório de Melo** pela amizade e ensinamentos durante toda a realização do curso.

Aos meus irmãos **João José C. Fernandes, Petrônio Fernandes da Silva Filho, Maria do Socorro C. F. Corrêa de Oliveira, Kleber Afonso C. Fernandes, Victor Fernandes Sobrinho e Ana Flávia C. Fernandes**, pelo apoio amizade e companheirismo incondicional em todos os momentos.

A meus **sobrinhos Luciana, Amanda, Orlando Neto, Petrônio Luiz, Maria Carolina, Maria Luiza, Amandinha, Victor Filho, Petrônio Neto e Túlio** pelo carinho, apoio e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

A meu amigo **Orlando José Corrêa de Oliveira** pela amizade e exemplo de profissionalismo e dedicação a família.

A minha amiga e comadre **Raimunda Nonata Borges Piauilino**, pela paciência amizade apoio em todos os momentos desta caminhada.

A meus amigos **Vicente Orlando B. Piauilino, Joaquim Filho B. Piauilino, Virginio B. Piauilino** e a minha grande amiga **Ivone Borges Piauilino** pelo incentivo e a confiança que sempre depositaram na nossa vitória.

A **Taciana Galba da Silva Tenório** pela amizade, apoio e dedicação na realização deste trabalho.

A **Taciana Ramalho e Pedro Moura** pela amizade, constante, ajuda e apoio compartilhados ao longo deste curso e companheirismo no trabalho.

Ao colega e amigo **Erich Collicchio** pelos momentos de apoio e companheirismo e exemplo e dedicação à pesquisa agropecuária.

Ao amigo e colegas de pós graduação **Emerson Mendes**, por sua amizade e apoio constante, e aos graduandos **Tamires Izarely B. da Silva, Rodolfo Souto, Artur Fernandes, Felipe Timóteo, David Felipe A. Barbosa, Mauro T. Melo** por toda ajuda durante a execução dos trabalhos.

Aos **Proprietários** dos rebanhos pela sua atenção e por terem cedido gentilmente os animais para a colheita das amostras.

Aos **Animais** sem os quais o aprendizado não seria completo.

À secretária da pós-graduação **Edna Izabel Chérias**, por sua atenção em sempre me atender e pela amizade e momentos que compartilhamos juntos.

Ao Professor **Humberto Falcão Coelho** pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Aos colegas pesquisadores da **UNITINS AGRO**.

A Fundação Universidade do Tocantins **UNITINS**

À **CAPES** pela concessão do apoio através da bolsa de doutorado.

Enfim, a **TODOS** aqueles que, mesmo os que não foram lembrados por algum esquecimento, mas que contribuíram e colaboraram para a construção e realização deste trabalho, cumprindo mais esta etapa.

**“Muito Obrigado”**

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	
Representação esquemática dos ensaios imunossorológicos realizados para determinação da soroprevalência da LEB e dos níveis séricos de lisozima em rebanhos bovinos criados no Norte do Estado de Tocantins, Brasil, 2006.....	17

### EXPERIMENTO I

Figura 1	Mapa do Estado do Tocantins.....	48
Figura 2	Mapa parcial do Estado do Tocantins - microrregião de Araguaína e seus respectivos municípios.....	48

## LISTA DE QUADROS

		Pág.
Quadro1	Quadro 1 – Taxas de Prevalências de bovinos sororreagentes aos antígenos do VLB determinadas pelo teste de IDGA, distribuídas segundo Regiões e Estados do Brasil, de acordo com autor e ano. Recife – 2007....	44

## LISTA DE TABELAS

Pág.

### EXPERIMENTO I

Tabela 1	Resultados de soroprevalência obtidos pelo teste da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony em gel de Agar (IDGA-LEB), segundo os rebanhos leiteiros na microrregião de Araguaína-TO, 2006.	49
Tabela 2	Distribuição das frequências de prevalência de bovinos sororreagentes ao teste da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony em gel de Agar (IDGA-LEB), segundo a intensidade das taxas de prevalência nos rebanhos estudados na Microrregião de TO, 2006.....	51
Tabela 3	Valores absolutos e relativos obtidos pelo teste da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony em gel de Agar (IDGA-LEB), distribuídos por município na Microrregião de Araguaína TO, 2006	51
Tabela 4	Prevalência da leucose enzoótica dos bovinos nos rebanhos estudados segundo as variáveis o estado nutricional e tipo de ordenha, na Microrregião de Araguaína-TO,2006	52
Tabela 5	Prevalência da leucose enzoótica dos bovinos nos rebanhos estudados segundo as variáveis assistência veterinária, procedência dos animais, manejo alimentar e tipo de exploração, na Microrregião de Araguaína-TO, 2006.....	53

### EXPERIMENTO II

Tabela 1	Diâmetros médios dos halos de lise bacteriana das lisoplasmas, segundo as concentrações padrão de lisozima (Placas de 01 a 45), 2006.....	70
Tabela 2	Análise estatística do diâmetro (mm) dos halos, segundo os	71

	grupos experimentais de bovinos leiteiros da microrregião de Araguaína TO, 2006.....	
Tabela 3	Análise estatística dos valores séricos da lisozima ( $\gamma$ /ml), segundo os grupos experimentais, de bovinos leiteiros da microrregião de Araguaína TO, 2006.....	72

## RESUMO

A Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) é uma doença infecto-contagiosa, cosmopolita, de potencial imunodepressor, caracterizada pela evolução crônica e pelos grandes prejuízos que determina a pecuária bovina nacional. O objetivo geral com a realização deste estudo foi contribuir para a elucidação do papel imunodepressor do Vírus da Leucose Bovina (VLB), realizando ensaios imunossorológicos para dimensionar a infecção (soroprevalência) e estabelecer um parâmetro de avaliação do estado imunitário (teores de lisozima sérica) de bovinos leiteiros criados na Região Norte do Estado do Tocantins. Foram colhidas amostras séricas de 38 rebanhos bovinos, totalizando 882 amostras submetidas ao teste de Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony em gel de ágar. Desse universo amostral, 400 amostras foram divididas em dois grupos, em função do resultado imunossorológico obtido: G1 200 amostras VLB negativos e G2 200 amostras VLB positivos. As amostras foram submetidas, ainda, à Imunodifusão Radial Simples de Mancini para determinar a concentração sérica da lisozima, cujos resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste t-Student. Os resultados demonstraram que a LEB encontra-se amplamente disseminada nos rebanhos examinados (94,7% - 36/38), com uma prevalência de anticorpos séricos anti-VLB da população estudada igual a 37,0% (326/881), sendo este o primeiro registro da infecção no Estado do Tocantins. Os níveis séricos de lisozima encontrados foram G1 8,94  $\gamma$ /ml e G2 7,05  $\gamma$ /ml, sendo que a diferença média entre os dois grupos foi de 1,92  $\gamma$ /ml, portanto, mais elevado nos animais VLB negativos do que nos VLB positivos, diferença esta que se revelou significativa, sinalizando um estado imunitário de imunodepressão. Os resultados obtidos demonstraram a ampla disseminação da LEB, sob a influência de fatores de risco, em conexão com a redução dos teores de lisozima nos animais VLB positivos, e sugerem que os ensaios imunossorológicos realizados possibilitaram a validação de um importante parâmetro de avaliação do estado imunitário de bovinos VLB positivos, contribuindo, desta forma, para a elucidação do papel imunodepressor do Vírus da Leucose Bovina.

**PALAVRAS CHAVE:** leucose, bovino, prevalência, lisozima, imunodifusão, Estado do Tocantins.

## ABSTRACT

The bovine enzootic leucosis (BEL) is a contagious infect disease cosmopolitan, with immune depressor potential, characterized by chronic evolution and great injuries that cause to the national cattle- breeding. The general objective of the achievement of this study was to contribute to the Bovine Leukosis Virus (BLV), realizing immune serologic essay to find dimension of the infection (serum-prevalent) and establish a parameter for evaluation of the immune condition (levels of serum lysozyme) of milky cattle breeding raised in the north region of Tocantins state. It was colleted serum samples of 38 bovine herds, totalizing 881 samples submitted to the double radial immune diffusion test of Ouchterlony in agar gel. From this universe of samples, 400 samples were divided in 2 groups. According to the immune serologic result obtained. G1 200 BLV negative samples, G2 BLV positive samples. The samples were still submitted to a simple radial immunodiffusion of Mancini to define the serum concentration of lysozyme which obtained results were statistically analyzed by t- student test. The results demonstrated that the BEL is amply disseminated in bovine herds examined (94,7% - 36/38), with a prevalence of serum antibodies anti BLV of the studied population corresponding to 37% (328/821) this is the first register of the infection in Tocantins State. The serum levels of lysozyme found G1 8,94  $\gamma$ /ml e G2 7,05  $\gamma$ /ml, knowing that the average difference between the two groups was 1,92  $\gamma$ /ml, so, more elevated in the BLV negative animals than in the BLV positive ones, this revealed how significant is that difference. It can signalize an immune depression state of the immunity system. The obtained results demonstrated the large dissemination of BEL, being the influence, of risk factors in connection with a reduction of levels of lysozyme in animals BLV positives, and suggest that immune serologic tests realized, make possible the validation of an important parameter of evaluation of immune state of BLV positive bovine contributing, this way, to elucidation of immune depressor paper of bovine leucosis virus.

**Key words:** leucosis, bovine, prevalence, lysozyme, immunodiffusion, Tocantins State.

# SUMÁRIO

	Pág.
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
3.1 Leucose Enzoótica dos Bovinos.....	19
3.2 Lisozima.....	23
3.2.1 Aspectos Históricos.....	23
3.2.2 Aspectos Bioquímicos.....	23
3.2.3 Fonte e Funções da Lisozima.....	25
3.3.4 Ação da Lisozima no Sistema Imunológico.....	26
3.3.5 Método para a Titulação da Lisozima.....	29
3.2.6 Aplicabilidade da Lisozima.....	31
<b>4 REFERÊNCIAS</b> .....	32
<b>5 EXPERIMENTO I</b> .....	41
<b>5.1 SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCOSE DOS BOVINOS EM REBANHOS LEITEIROS DA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO TOCANTINS, BRASIL</b> .....	41
5.1.1 Resumo .....	41
5.1.2 SEROPREVALENCE AND RISK FACTORS OF THE INFECTION BY THE BOVINE LEUKOSIS VÍRUS IN DAIRY HERDS IN THE NORTH OF TOCANTINS STATE, BRAZIL	
5.1.3 Abstract .....	42
5.1.4 Introdução .....	42
5.1.5 Material e Métodos .....	45
5.1.6 Resultados e Discussão .....	49
5.1.6.1 Relacionados à prevalência da Infecção pelo VLB	49
5.1.6.2 Relacionados aos Fatores de Risco	52
5.1.7 Conclusão .....	54
5.1.8 Referências .....	54

<b>6 EXPERIMENTO II</b> .....	65
<b>6.1 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA INFEÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA NOS NÍVEIS SÉRICOS DE LISOZIMA EM BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO DO TOCANTINS, BRASIL</b> .....	65
6.1.1 Resumo .....	65
6.1.2 AVALIATION OF THE BOVINE LEUKOSIS VIRUS INFECTION INFLUENCE ON THE LEVEL OF SERUM LYSOZYME IN DAIRY HERDS OF TOCANTINS STATE, BRASIL .....	66
6.1.3 Abstract .....	66
6.1.4 Introdução .....	66
6.1.5 Material e Métodos .....	68
6.1.6 Resultados e Discussão .....	69
6.1.7 Conclusão .....	73
6.1.8 Referências.....	73
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>ANEXOS</b> .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

No âmbito das enfermidades que trazem prejuízos à bovinocultura, destacamos a Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) por ser uma enfermidade infecto-contagiosa, causada pelo Vírus da Leucose dos Bovinos (VLB) e caracterizada por proliferação linfocitária e/ou formação de linfossarcomas (FERRER et al., 1979).

O grande desafio que se apresenta na atualidade, quando se pretende estudar a LEB, vai além do estabelecimento do seu diagnóstico. As laboriosas, embora imprescindíveis, pesquisas voltadas à detecção de bovinos que expressam clinicamente a doença e/ou que sejam portadores de anticorpos séricos específicos contra o VLB devem ser associadas a estudos avaliativos do potencial imunodepressor do VLB e sua provável interferência na integridade do estado imunitário dos bovinos infectados.

Necessário se faz, pois, impulsionar investigações sobre aspectos imunológicos que envolvem o agente causador dessa insidiosa doença (MELO, 1999). Nesse sentido, os ensaios experimentais de AMBROGI (1986), embora relacionados ao estudo dos possíveis efeitos imunodepressores de certas substâncias químicas contidas no fumo sobre o organismo, preservada a inespecificidade dos parâmetros estudados, poderão servir de modelo imunoclínico que permita qualificar, mesmo que preliminarmente, o estado imunitário de bovinos portadores de anticorpos anti-VLB, supostamente infectados.

Ensaio laboratoriais têm sido realizados (CASTRO, 2004; FERNANDES, 2006) com a proposição de apresentar um sistema prático e exequível, a ser usado na rotina laboratorial, para a determinação de um componente imunossorológico, a lisozima, constituinte de um sistema de avaliação “*in vitro*” da funcionalidade do sistema imunitário de bovinos infectados pelo VLB. As experiências vivenciadas nesses ensaios criaram as condições técnico-científicas e operacionais necessárias à aplicação da técnica da Imunodifusão Radial Simples de Mancini (FAHEY e MCKELVEY, 1964; MANCINI et al., 1965).

Fernandes, (2006) afirmou que a técnica da imunodifusão encontra-se definitivamente padronizada para determinar a concentração sérica de lisozima em bovinos submetidos a diferentes situações fisiopatológicas.

A lisozima é um componente imunossorológico inespecífico que participa na promoção do complexo mecanismo de defesa do organismo em diferentes situações fisiopatológicas. Reconhecida como um importante indicador do estado geral de funcionamento do sistema imunitário (AMBROGI, 1986), sua concentração sérica deve ser determinada em função de que sejam estabelecidos os valores referenciais para a espécie bovina.

As ações patogênicas do VLB sobre o organismo infectado, que ocorrem a partir de sua incorporação nos linfócitos e eventualmente nos monócitos, determinam a desorganização do sistema imunitário e promovem, como conseqüência, a diminuição da resistência dos rebanhos as doenças intercorrentes, principalmente no gado leiteiro estressado pela intensidade do manejo (MUSCOPLAT et al., 1974; WYERS, 1975; BURNY e MAMMERICKX, 1987; LORENZ e STRAUB, 1987; CASTRO et al., 1988; HEENEY et al., 1992)

Neste contexto, a ação imunodepressora do VLB é uma hipótese admitida. Os resultados obtidos por Melo, (1999), resguardada a magnitude preliminar de seu significado clínico-epidemiológico, consubstanciaram que vários aspectos do manejo das criações, incluindo a perda da identidade racial devido aos sucessivos e desordenados cruzamentos para melhorar a produtividade dos rebanhos e a alta concentração de indivíduos nos mesmos, promoveram o convívio íntimo e prolongado entre animais doentes e sadios, fato que predispõe sistematicamente os rebanhos à leucose. Trata-se de uma doença infecto-contagiosa caracterizada pelos grandes prejuízos que determinam à pecuária bovina nacional ao comprometerem o desempenho produtivo dos rebanhos, reduzindo a produção, estabelecendo sucessivas condenações de carcaças em matadouros e restringindo o comércio de animais, além do aumento dos custos com serviços veterinários. (MELO, 1999; MELO et al., 2001; DEL FAVA e PITUCO, 2004; CARNEIRO et al., 2003; TOSTES, 2005)

A LEB tem sido mapeada em praticamente todo território nacional, embora para a Região Norte haja escassez de informações, não havendo registro da doença no Estado do Tocantins, sendo registrados apenas quatro trabalhos de pesquisa: Abreu et al. (1990) no Acre e Rondônia; Molnar et al. (1999) no Pará e Carneiro et al. (2003) no Amazonas.

Levantamentos soropidemiológicos realizados por diversos pesquisadores vêm demonstrando o avanço da LEB e sua ampla disseminação nos rebanhos bovinos brasileiros. A prevalência globalizada no país, com base na literatura consultada, é

estimada em 23,7% (7.862/33.138), ocorrendo numa magnitude maior na região Sudeste, com taxa de 39,8% (4.821/12.110). Encontra-se amplamente distribuída, de forma significativa e crescente, nas regiões Centro-Oeste (23,9%), Norte (21,13% - 232/1098), Sul (14,18% - 2053/14.476) e Nordeste (13,86% - 756/5.454) (TENÓRIO, 2003).

Praticamente a metade do efetivo bovino leiteiro do Estado de São Paulo, ou seja, cerca de 43,93% (2.201/5.010), encontra-se na condição de portadores de anticorpos séricos específicos anti-VLB (ALENCAR FILHO, 1978; ALENCAR FILHO et al., 1979; LIMA et al., 1980; BIRGEL et al., 1988; BIRGEL JÚNIOR et al., 1990; D'ANGELINO, 1991; MELO, 1999).

Em Pernambuco, Melo, (1991) detectou sorologicamente a ocorrência da doença no Estado, com prevalência de 15,1 % (67/443). Consubstanciando os estudos realizados até então, Melo et al. (2001) diagnosticaram o primeiro caso clínico da doença na Mesorregião Metropolitana do Recife, demonstrando a coexistência dos aspectos nosológicos, hematológicos, sorológicos e anátomo-patológicos. Em seguida, Mendes, (2002) reafirmou em seus achados sorológicos a difusão da LEB nos rebanhos de Pernambuco, encontrando uma prevalência de 14,7% (39/266).

Em linhas gerais, portanto, a realização de ensaios imunossorológicos em rebanhos de bovinos leiteiros do Estado do Tocantins, (Figura 1) serviu para mensurar a magnitude da infecção pelo VLB da Região Norte do Estado e caracterizar um parâmetro de avaliação do estado imunitário dos bovinos examinados, com vistas a contribuir para a elucidação do potencial imunodepressor do Vírus da Leucose Bovina.

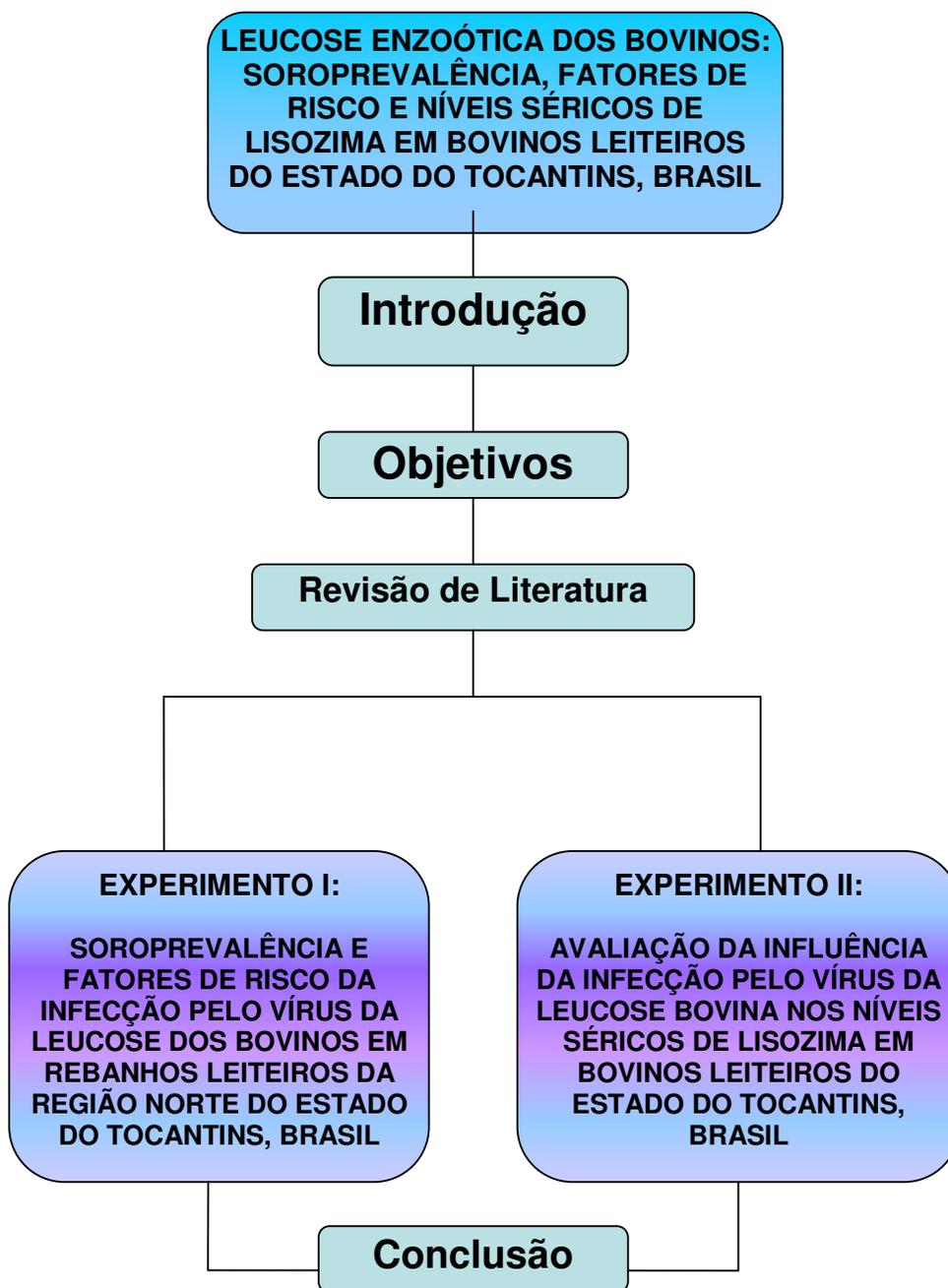


Figura 1 – Representação esquemática dos ensaios imunossorológicos realizados para determinação da soroprevalência da LEB e dos níveis séricos de lisozima em rebanhos bovinos criados no Norte do Estado de Tocantins, Brasil. 2006

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Contribuir para a elucidação do potencial imunodepressor do Vírus da Leucose Bovina realizando ensaios imunossorológicos para dimensionar a infecção e estabelecer um parâmetro de avaliação do estado imunitário de bovinos leiteiros criados na Região Norte do Estado do Tocantins.

### **2.2 Específicos**

- Determinar a soroprevalência de bovinos portadores de anticorpos anti-VLB em rebanhos leiteiros na Região Norte do Estado do Tocantins, utilizando a Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony;
- Caracterizar os fatores de risco associados à gênese da Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB);
- Determinar os níveis séricos de lisozima em bovinos leiteiros, utilizando a Imunodifusão Radial Simples de Mancini;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Leucose Enzoótica dos Bovinos

Historicamente, a primeira referência da leucose no Brasil data de 1959, por Santos et al. (*apud* ANDRADE e ALMEIDA, 1991). O vírus da leucose é um retrovírus similar aos que ocorrem em humanos (HTLV-1 e HTLV-2), causadores da Leucemia Humana de células T, nos termos de sua estrutura genética, seqüência e regulação de expressão (SCHWARTZ e LÉVY, 1994). É uma doença crônica sistêmica, caracterizada pelo desenvolvimento de agregações de linfócitos neoplásicos e com ampla variedade de sinais clínicos (TOSTES, 2005)

A leucose enzoótica dos bovinos (LEB) é uma doença cosmopolita, infecto-contagiosa, crônica, causada por um retrovírus exógeno linfotrópico B, que compromete primariamente o sistema linfóide dos bovinos infectados e determina processos desorganizativos de tecidos e órgãos, especialmente linfonodos. Caracteriza-se pela formação progressiva de linfossarcomas, podendo haver ou não leucemização (INTERNATIONAL COMMITTEE ON BOVINE LEUCOSIS, 1968 ; JAIN, 1993).

A etiologia viral da leucose foi definitivamente estabelecida por Miller et al. (1969), que isolaram o vírus em cultura de linfócitos bovinos com sintomas aparentes ou não da doença. No Brasil, o isolamento pioneiro do VLB foi realizado por Angelo et al. (1985), em cultura primária de fibroblastos provenientes de prepúcios humanos, a partir de linfócitos de bovinos soro-reagentes ao antígeno glicoprotéico do VLB.

A transmissão natural do vírus pode ocorrer naturalmente, pelo contato entre animais sadios e infectados, iatrogênicamente, por meio de agulhas e fômites contaminados, ocorrendo ainda a transmissão *in útero* e a ingestão de colostro (ROMERO et al., 1981; THURMOD, 1991; HOPKINS e DIGIACOMO, 1997).

A transmissão vertical em bovinos pode ser demonstrada pela soropositividade de bezerras recém-nascidos antes da ingestão do colostro (FERRER et al., 1979) O VLB pode infectar linfócitos fetais, caracterizando uma infecção intra-uterina, que ocorre em até 20% dos casos de contágio, estando associado a uma imunossupressão temporária que ocorre na vaca durante a prenhez (GÖTZE et al., 1954; ROSENBERGER, 1961; MILLER e VAN

DER MAATEN, 1977; BIRGEL et al., 1982; EVERMANN et al., 1987; LORENZ e STRAUB, 1987; MAMMERICKX et al., 1987).

A transmissão horizontal é responsável pela maioria das infecções, e como o principal modo de transmissão pode ser o contato direto entre os animais, resultados soropidemiológicos e programas de controle corroboram com essa hipótese (LASSAUZET et al., 1991, in TOSTES, 2005)

O manejo aliado ao desconhecimento da enfermidade pode influenciar na transmissão do VLB, principalmente se este for intensivo. Onde há um convívio mais próximo; o contato prolongado entre animais infectados e sadios; situações de estresse, como mudança recente do pastejo para a estabulação. Comparativamente, a difusão do vírus entre animais das raças de exploração leiteira é mais intensa do que as destinadas ao corte, provavelmente devido às variações do manejo e à permanência mais longa dos animais nos rebanhos (LORENZ e STRAUB, 1987).

Há inúmeras formas que rotineiramente difundem a infecção do VLB em um rebanho, tais como: tratamento sistêmico pelas vias intramusculares, subcutâneas ou intravenosas com agulhas contaminadas com sangue, colheitas ou transfusões de sangue, incluindo o processo de premunicação contra anaplasiose e babesiose em animais importados e normas inadequadas de vacinação, além de fômites contaminados usados em castrações e descornas e a palpação retal (BIRGEL et al., 1982; BRIGHTLING e RADOSTITS, 1983; LORENZ e STRAUB, 1987; JOHNSON e KANEENE, 1992; HOPKINS e DIGIACOMO, 1997). A via iatrogênica sendo necessários apenas, 2500 linfócitos (0,0005ml de sangue) para através de inoculação, determinar a infecção (VAN DER MAATEN e MILLER, 1979)

A resposta imunológica é caracterizada quando do início da infecção pelo VLB, provocando a proliferação do número de linfócitos B. O complexo antígeno-anticorpo (VLB – Linfócitos B) após o seu estabelecimento promove a sensibilização dos linfócitos que assumem aspecto de linfoblasto ou imunoblastos com grande capacidade de mitose. O VLB impõe as condições de imunossupressão inibindo ou reduzindo a ação ou produção de anticorpos particularmente o IgM, imunoglobulina precursora da ativação de enzimas do plasma, responsáveis pela lise celular e outros fenômenos da resposta imune primária, inibindo, inclusive, a atividade fagocitária dos neutrófilos, prejudicando o sistema imunocelular. O comprometimento do sistema imunitário orgânico propicia ao VLB desprovido

de envelope, penetrar no citoplasma linfocitário onde, sob ação da transcriptase reversa, converte-se de RNA-vírus monocromossomal a DNA-proviral duplocromossomal, para incorporar-se no genoma celular do linfócito por tempo indeterminado, podendo neste período apresentar falsos negativos nos exames sorológicos. O estresse do hospedeiro, advindo da produção e de doenças intercorrentes, parecem ser elementos importantes no desencadeamento da replicação de VLB, cujas partículas deixam o núcleo celular e, no citoplasma revertem-se à condição primária de RNA-vírus (retrovírus) deslocam-se até a membrana citoplasmática, adquirem forma de “C” (vírus tipo C) e por gemelação replicam-se intensamente, caindo na corrente sanguínea em sua forma madura (WYERS, 1975; JONSON e KANEENE, 1991; EVERMAN e JACKSON 1977; MURPHY et al 1999) (Anexo 1)

O diagnóstico definitivo da LEB é estabelecido pela expressão clínica da doença, associando-a aos achados hematológicos (leucocitose por linfocitose, com atipias linfocitárias) e imunológicos (pesquisa de anticorpos séricos específicos anti-VLB), configurações estas apresentadas por vários pesquisadores como sendo necessárias para a afirmação da ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos em um rebanho (GÖTZE et al., 1954; ROSENBERGER, 1961; MAMMERIKX et al., 1976; RESSANG et al., 1976).

Atualmente os testes sorológicos têm sido a metodologia recomendada para o diagnóstico precoce da leucose enzoótica dos bovinos, destacando-se a IDGA - Imunodifusão em Gel de Agar (MILLER e OLSON, 1972; MILLER e VAN DER MAATEN, 1977). Trata-se de uma técnica padrão para a identificação de bovinos portadores de anticorpos séricos específicos anti-VLB, demonstrando alta especificidade, adequada sensibilidade e grande praticidade, sendo pouco dispendiosa (MAMMERICKX et al. 1976, MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; SHETTIGARA, 1986; EVERMANN et al., 1987; MAMMERICKX et al., 1987). Vale ressaltar que, desde 1980, a utilização desta prova tornou-se obrigatória na importação e exportação de gado, sendo adotada como teste oficial de diagnóstico da Leucose Enzoótica dos bovinos pela Comunidade Econômica Européia (MILLER, 1980).

A aplicabilidade da IDGA no Brasil tem sido freqüente e possibilitou a realização de inúmeros inquéritos soropidemiológicos, que demonstraram uma prevalência maior da LEB nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil. Na Região Norte os primeiros estudos imunossorológicos da LEB foram realizados por Abreu, (1990) nos Estados do Acre (9,7%) e Rondônia (23%), da infecção na Região, em seguida por Molnar et al. (1999) com

o primeiro levantamento imunossorológico do VLB no estado do Pará (26%) e o mais recente trabalho, realizado por Carneiro et al. (2003) no Amazonas (9,6%). Apesar de poucas informações admite-se que a Região Norte possui prevalência numa magnitude próxima de 17%.

Em Pernambuco, a doença foi evidenciada nos achados clínico-hematológicos e histopatológicos pioneiros de Cavalcante et al. (1969) e na detecção inédita de bovinos portadores de anticorpos séricos específicos anti-VLB por Melo, (1991) que demonstrou a ampla difusão da doença em rebanhos de Garanhuns e municípios adjacentes. Reafirmando esses estudos, Melo et al. (2001) relataram um caso clínico inédito da LEB na Mesoregião Metropolitana do Recife, Município de Paulista, acometendo uma vaca da raça Holandesa, com seis anos de idade, doadora de embriões, criada em um rebanho de alto valor zootécnico. O diagnóstico foi estabelecido pela conexão da expressão clínica da doença (hipertrofia generalizada dos linfonodos, nodulações cutâneas e exoftalmia bilateral) com os achados hematológicos (37.000 leucócitos, com 70% de linfócitos, muitos atípicos), sorológicos (linha de precipitação característica de reação positiva) e anátomo-patológicos (abundantes tumorações branco-acinzentadas e brilhantes, de caráter difuso ou nodulares, em diversos órgãos; além de, histologicamente, infiltrações linfoproliferativas compatíveis com linfossarcoma). foram realizadas investigações clínico-epidemiológicas no rebanho a origem do animal, associado a um rastreamento da LEB em propriedades que adquiriram animais do mesmo.

Embora seja um tema ainda pouco esclarecido, admite-se que distúrbios do sistema imune aumentem a ocorrência de doenças nos rebanhos. O comprometimento da integridade do sistema imunitário orgânico pela ação imunodepressora do VLB, ao penetrar e incorporar-se ao genoma linfocitário por tempo indeterminado (MUSCOPLAT et al. 1974; WYERS, 1975; CASTRO et al., 1988), associado as evidências imunocitológicas de que este retrovírus infecta monócitos circulantes (HEENEY et al., 1992), aumenta a susceptibilidade do hospedeiro a outras infecções (BURNY e MAMMERICKX, 1987). Adicionalmente, fatores associados às normas zoosanitárias de criação dos rebanhos, que estressam os animais pela vida produtiva dos mesmos, como lactação, maximização de ganho de peso, entre outros, além das doenças intercorrentes, desempenham, provavelmente, importante papel no desencadeamento da replicação dos retrovírus no organismo infectado (WYERS, 1975). Lorenz e Straub (1987) reforçaram essa tese ao atribuir às variações do manejo e à permanência mais longa dos animais nos

rebanhos a aparente maior susceptibilidade à infecção pelo VLB de raças de exploração leiteira em relação às raças destinadas ao corte.

## 3.2 Lisozima

### 3.2.1 Aspectos Históricos

A descoberta da lisozima ocorreu em Londres, no ano de 1922, por um bacteriologista chamado Alexander Fleming, ao mostrar que a substância antibacteriana que trabalhava era uma enzima, que denominou lisozima – *liso* por sua capacidade de lisar bactérias, e *zima* porque era uma enzima. Também descobriu uma pequena bactéria esférica que era particularmente suscetível à lisozima; ele a chamou de *Micrococcus lysodeikticus* porque era um demonstrador de lise (*deiktikos* significa “capaz de mostrar”, em grego). Fleming descobriu que as lágrimas eram uma fonte rica em lisozima. (WEISER et al., 1969; STRYER, 1992).

### 3.2.2 Aspectos Bioquímicos

Presente praticamente em quase todos os seres vivos, em diferentes formas bioquímicas, a lisozima é uma enzima lisossômica com atividade hidrolítica que digere determinados substratos macromoleculares, como certas paredes bacterianas. (AMBROGI, 1986; STRYER, 1992).

A lisozima dissolve certas bactérias por clivagem hidrolítica do componente poliosídico de suas paredes. A função da parede nas bactérias é a de lhes conferir apoio mecânico. Uma célula bacteriana sem a parede geralmente se rompe devido à alta pressão osmótica dentro da célula. O alvo da lisozima é a porção glicídica das paredes (WEISER et al., 1969; STRYER, 1992; LEHNINGER, 1995; TIZARD, 2002).

O poliosídeo da parede é constituído de dois tipos de oses: a *N-acetil glicosamina* (NAG) e o *N-acetil muramato* (NAM). NAM e NAG são derivados da glicosamina, nos quais a amina é acetilada. O poliosídeo da parede é um polímero de radicais alternados de

NAM e NAG reunidos por ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)-glicosídicas. A lisozima é uma glicosidase que hidrolisa a ligação glicosídica entre C-1 do NAM e o C-4 do NAG. A *quitina*, um glicosídeo encontrado na carapaça de crustáceos, também é um substrato para a lisozima. A quitina é constituída só de NAG, unidas por ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)-glicosídicas (WEISER et al., 1969; FREEDMAN e GOLD, 1976; STRYER, 1992; TIZARD, 2002).

É uma enzima termolábel e relativamente pequena (14,6 Kd) (FREEDMAN e GOLD, 1976; STRYER, 1992; LEHNINGER, 1995). A lisozima obtida da clara do ovo de galinha, uma fonte rica, é uma cadeia polipeptídica única de 129 aminoácidos. Essa proteína, altamente estável, é interligada por quatro pontes dissulfeto (STRYER, 1992; LEHNINGER, 1995). Em 1965, David Philips et al. *apud* Stryer, (1992) determinaram a estrutura tridimensional da lisozima. Seu mapa de densidade eletrônica de alta resolução foi o primeiro para uma molécula enzimática. A lisozima é uma molécula compacta, de forma aproximadamente elipsóide, com dimensões 45 x 30 x 30 Å e seu enovelamento é complexo. Seu interior, assim como o da mioglobina e o da hemoglobina, é quase totalmente apolar. As interações hidrófobas exercem um papel importante no enovelamento da lisozima, como para quase todas as proteínas (STRYER, 1992). Seus segmentos em  $\alpha$ -hélice delimitam uma longa fenda em um dos lados da molécula, chamada de sítio ativo, o qual é o local onde ocorre a ligação do substrato e a ação enzimática. O polissacarídeo bacteriano, que é o substrato para a lisozima, encaixa-se perfeitamente nesta fenda (LEHNINGER, 1995).

Kurimoto et al. (2001) demonstraram, em ensaios *in vitro*, que a lisozima, como outras substâncias bioativas, pode ter sua atividade enzimática potencializada por meio de um mecanismo bioquímico que modifica o colágeno dermal bovino (CDB) pela introdução de um grupo tiol e da lisozima; inicialmente há uma reação “tiolato-CDB” e depois outra com a porção 2-piridil disulfídico presente na lisozima; finalmente, há a formação do composto conjugado “CDB-lisozima”, com o máximo de sua atividade em pH menor e maior estabilidade térmica comparativamente à lisozima original.

### 3.2.3 Fonte e Funções da Lisozima

A lisozima é encontrada nas lágrimas, na secreção nasal, na saliva, na mucosa intestinal (mucos intestinais), na pele, nos leucócitos, nos grânulos lisossomais dos fagócitos, na clara do ovo, no soro e no leite (FREEDMAN e GOLD, 1976; BIER, 1984; LEHNINGER, 1995; TIZARD, 2002). Apesar da lisozima estar presente em quase todos os tecidos e fluidos corpóreos, ela não é encontrada no fluido cerebrospinal (cefalorraquidiano), no suor e na urina (WEISER et al., 1969; TIZARD, 2002). Embora haja afirmações de que ela estaria ausente nos neutrófilos bovinos (TIZARD, 2002). Foram demonstradas, pela espectrofotometria, pequenas quantidades de lisozima, variando entre 0,12 e 0,67 µg/células, em neutrófilos bovinos, após um processo de homogeneização e centrifugação diferencial (BERENJI, 1997).

Os neutrófilos possuem lisozima em seus grânulos citoplasmáticos (TIZARD, 2002), sendo encontrada neste tipo celular e no leite de vacas em teores de aproximadamente 0,13 mg/100ml (NICKERSON, 1985).

Ainda na espécie bovina, foi demonstrada a eficácia de um marcador genético da atividade da lisozima na identificação da resistência das vacas à mastite, bem como o melhoramento da atividade da lisozima do leite (STEINHOFF, 1995). Este pesquisador elaborou o código genético da lisozima com 1530 pares básicos.

Embora a lisozima não esteja normalmente presente na urina, ela aparece em quantidades substanciais durante infecções do trato urinário, além do abundante número de leucócitos. Ela é excretada em enormes quantidades na urina de pacientes com monocitose e leucemia monomielocítica (WEISER et al., 1969). Níveis extremamente altos de lisozima também são encontrados nos lisossomos dos macrófagos alveolares de coelhos e homens tuberculosos. A lisozima provavelmente contribui para a atividade tuberculostática dos tecidos granulomatosos dos pulmões tuberculosos (WEISER et al., 1969; FREEDMAN e GOLD, 1976).

É produzida principalmente pela célula monócito-macrófago e, parcialmente, pelos granulócitos, onde permanece na bagagem enzimática destas células até ser secretada nos variados líquidos orgânicos (soro, lágrima, saliva, mucos) (OSSERMAN e LAWLOR, 1966; AMBROGI, 1986). É considerada um marcador enzimático específico da linhagem monocitária. Ela é produzida, também, por certos vírus bacterianos para assegurar a sua

liberação da bactéria hospedeira, um passo essencial no ciclo da infecção viral (LEHNINGER, 1995).

É um elemento fundamental, juntamente com o complemento, no sistema de defesa antibacteriano específico e não específico, o que possibilita sua concentração no soro ser um índice de bom funcionamento do sistema imunitário em geral, e em particular das células da linha monocitária (AMBROGI, 1986).

A lisozima possui um papel anti-infeccioso, isto é, atua na defesa contra algumas infecções. Microorganismos saprófitos, como o *M. lysodeikticus* e a *Sarcina lútea*, são os que mais sensíveis se tem mostrado à ação da lisozima. Embora necessitando de maiores esclarecimentos científicos sobre o papel da lisozima nos processos infecciosos, são observadas variações do teor da enzima em diferentes condições patológicas, nas secreções normais, ou nas provenientes de inflamação (alergia), o teor de lisozima é baixo ou nulo, ao passo que títulos elevados são encontrados em vários processos infecciosos, como infecções oculares, rinites, sinusites, e ginecopatias (BIER, 1984).

#### 3.2.4 Ação da Lisozima no Sistema Imunológico

A lisozima contribui significativamente com a imunidade natural ao promover um mecanismo imune operacional nas superfícies, nos tecidos e dentro de células fagocíticas (FREEDMAN e GOLD, 1976).

Embora os mamíferos possuam uma variação extensa de mecanismos de defesa dentro dos tecidos, é nas suas superfícies que os microrganismos invasores são primeiramente encontrados e fortemente repelidos ou destruídos, na chamada “imunidade nas superfícies corpóreas” da qual a lisozima faz parte. Reconhece-se a pele como a mais óbvia dessas superfícies, todavia ela representa somente uma pequena fração da área do corpo exposta ao exterior. A concentração de lisozima nas membranas mucosas do intestino e do trato respiratório são pelo menos 100 vezes maiores. Essas superfícies são definidas por uma variedade de mecanismos protetores tanto imunológicos quanto não imunológicos, onde em alguns deles a lisozima presente nos fluidos participa intensamente (TIZARD, 2002).

Os principais mecanismos protetores de superfície não imunológicos dos quais a lisozima participa (WEISER et al., 1969; LEHNINGER, 1995; TIZARD, 2002):

- Olhos – lágrimas;
- Glândula mamária – não lactantes (tampão de ceratina no orifício da teta) e lactantes (lavagem do leite e o próprio leite);
- Sistema Respiratório – filtro de turbulência, muco, cílios, tosse;
- Sistema Urinário – Ação de lavagem e pH baixo;
- Sistema Digestivo – saliva, vômito, pH gástrico, muco, fluxo de fluido, lisozima, enzimas proteolíticas, diarreia, condições anaeróbicas, flora normal.

No sistema digestivo a lisozima é sintetizada na mucosa gástrica e nos macrófagos da mucosa intestinal, sendo, por isso, encontrada em grande quantidade no fluido intestinal. As células de Paneth secretam lisozima e peptídeos chamados de criptidinas (TIZARD, 2002).

Também está presente no leite, juntamente com o complemento, a lactoferrina e a lactoperoxidase, formando inibidores bacterianos chamados lacteninas (TIZARD, 2002). Está presente nas lágrimas em altas concentrações, presumivelmente como uma defesa contra as infecções bacterianas do olho (LEHNINGER, 1995).

As paredes do trato respiratório superior são recobertas por uma camada de muco pegajoso produzida pelas células caliciformes. O muco possui propriedades anti-sépticas através de seu teor de lisozima e de IgA (TIZARD, 2002). Como se sabe, ela pode estar presente na urina devido a processos patológicos, como por exemplo, durante infecções do trato urinário (WEISER et al., 1969).

Embora os imunologistas dêem mais tenção às respostas imunitárias específicas, deve ser enfatizado que estas respostas representam somente uma porção das defesas disponíveis pelo organismo animal. Na realidade, três tipos gerais de mecanismos de resistência bacteriana podem ser identificados: o primeiro tipo é a resistência como resultado da não suscetibilidade da espécie, servindo como exemplo a *B. abortus* que é incapaz de infectar galinhas; o segundo tipo de proteção é devido à presença de substâncias inibidoras não imunológicas; e o terceiro é mediado por respostas imunitárias específicas (TIZARD, 2002).

A lisozima é uma das substâncias inibidoras não imunológicas que atuam na resistência bacteriana inespecífica. Observam-se evidências da capacidade dos tecidos animais em desestimular uma invasão bacteriana, a exemplo do que acontece nos ferimentos menores onde as infecções bacterianas nem sempre ocorre. Uma parte dessa resistência se deve à presença de moléculas antibacterianas nos tecidos, com a mais importante delas sendo justamente a lisozima. Embora muitas das bactérias mortas pela lisozima sejam não patogênicas, poder-se-ia destacar razoavelmente que essa suscetibilidade responderia por sua falta de patogenicidade. A lisozima é encontrada em altas concentrações nos lisossomos dos neutrófilos e, assim, se acumula nas áreas de inflamação aguda, incluindo os locais de invasão bacteriana. O pH ideal para a atividade lisozimica, embora seja um pouco baixo (pH de 3 a 6), é facilmente obtido nos locais inflamatórios, bem como dentro dos fagossomos. A lisozima também é uma opsonina potente, facilitando a fagocitose na ausência de anticorpos específicos e sob condições nas quais a sua atividade enzimática possa ser ineficaz (TIZARD, 2002).

Sozinha, a lisozima é bactericida para muitas bactérias gram-positivas, especialmente as consideradas não patogênicas. Contra bactérias gram-negativas é ativa apenas para uma pequena extensão, todavia, é relativamente inativa para a maioria delas, pois a rígida porção mucopéptica da parede celular dessas bactérias é protegida da ação da lisozima pelo material da camada externa, que é uma larga camada lipoprotéica (lipopolissacarídeos) (WEISER et al., 1969; FREEDMAN e GOLD, 1976; AMBROGI, 1986). Como se observa, a lisozima é um componente fundamental no sistema de defesa antibacteriano inespecífico e específico, juntamente com o complemento. (AMBROGI, 1986; TIZARD, 2002).

A atuação da lisozima, juntamente com o complemento, é um elemento importante na resistência bacteriana específica (imunidade específica às bactérias) (AMBROGI, 1986), tornando-a capaz de destruir algumas bactérias gram-negativas, já que sua ação bacteriolítica terá sua potência melhorada (FREEDMAN e GOLD, 1976; TIZARD, 2002).

A morte das bactérias através dos anticorpos, do complemento e da lisozima é parte integrante do mecanismo básico em que as respostas imunes específicas combatem as infecções bacterianas (TIZARD, 2002).

Enquanto algumas bactérias são fagocitadas e destruídas pelos neutrófilos ou macrófagos, ou ambos, outras são mortas quando livres na circulação. As bactérias podem

ser destruídas por anticorpos e complemento ativado através do trajeto clássico. Em animais insensíveis, as bactérias são destruídas pelo complemento que age através do trajeto alternativo. As paredes celulares bacterianas, que não possuem o ácido siálico, inativam o Fator H e, conseqüentemente, permitem a produção de C3-convertase alternativa (C3bBbP). Como resultado, as bactérias são opsonizadas ou são lisadas. A importância desse trajeto é vista nas infecções micoplasmáticas bovinas, nas quais os microrganismos patogênicos e não patogênicos podem ser diferenciados com base em sua capacidade de ativar o trajeto alternativo (TIZARD, 2002).

A ativação do trajeto de complemento terminal leva ao desenvolvimento de um complexo de ataque de membrana (CAM), que consiste de poli-C9. O CAM sozinho é insuficiente para matar muitas bactérias gram-negativas. Uma vez inserido na membrana bacteriana externa, no entanto, acredita-se que o CAM permita o acesso da lisozima, que age na membrana bacteriana interna provocando uma lise bacteriana (TIZARD, 2002).

Em bovinos, publicações têm referido a participação da lisozima nos mecanismos de defesa da glândula mamária, sendo suas principais ações voltadas à lise bacteriana, exercidas em um complexo mecanismo formado por vários componentes imunológicos como os anticorpos, as imunoglobulinas (IgM e IgA), o complemento, entre outros (GUIDRY, 1985; NICKERSON, 1985; SORDILLO et al., 1997; PEREIRA et al, 2000).

Em relação aos mecanismos de resistência antiviral, as defesas não imunológicas influenciam o resultado de muitas infecções virais. A lisozima, por exemplo, é capaz de destruir vários vírus, assim como muitas das enzimas intestinais e bile (TIZARD, 2002).

### 3.2.5 Método para a Titulação da Lisozima

A maioria dos métodos descritos para a determinação da atividade da lisozima em líquidos orgânicos tem limitações importantes que se incluem: substratos difíceis de encontrar no comércio, falta de sensibilidade, necessidade de padrões puros nem sempre disponíveis, instrumentos especializados e procedimentos trabalhosos (PESCE e KAPLAN, 1990).

As técnicas mais aceitas para a determinação da atividade desta enzima são os métodos turbimétrico e da lisoplaca de difusão. Ambos são afetados por diversos fatores

que devem ser controlados para obter resultados que possam servir como referência (PESCE e KAPLAN, 1990).

A titulação da lisozima pode ser facilmente executada utilizando um microrganismo particularmente sensível à sua atividade lítica, o *Micrococcus lysodeikticus*, com um método de titulação em um meio de cultura (agarose). É utilizado no homem e em algumas espécies animais (AMBROGI, 1986).

O método de imunodifusão em placa de agarose foi desenvolvido para quantificar a lisozima ativa em pequenas amostras (aproximadamente 25 µl) de soro, urina e de outros fluidos biológicos (OSSERMAN e LAWLOR, 1966).

A imunodifusão consiste em um método de análise imunoquímica de componentes de uma mistura antigênica, em que os antígenos reagem com seus anticorpos no seio de um meio gelatinoso, no qual se formam múltiplas linhas de precipitações, que correspondem as reações específicas de cada componente da mistura (BIER, 1984).

Duas modalidades técnicas são referendadas na literatura: imunodifusão dupla de Ouchterlony (OSSERMAM e LAWLOR, 1966; MILLER e VAN DER MAATEN, 1975; MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; BIRGEL, 1982; BIER, 1984) e a radial simples de Mancini (FAHEY e MCKELVEY, 1964; MANCINI et al., 1965).

A primeira consiste, fundamentalmente, na difusão do antígeno e do anticorpo, um ao encontro do outro, a partir de poços ou cavidades equidistantes perfurados em um meio gelatinoso. É amplamente utilizada no campo da veterinária, sendo preconizada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para a identificação, nos rebanhos, de animais portadores de anticorpos séricos específicos produzidos pelo organismo contra agentes infecciosos causadores de várias doenças de importância clínico-epidemiológica, como os Vírus da Leucose Bovina (MILLER e VAN DER MAATEN, 1975; MAMMERICKX et al. 1976, MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; SHETTIGARA et al., 1986; EVERMANN et al., 1987; MAMMERICKX et al., 1987; BIRGEL, 1982), da artrite encefalite caprina (ABREU et al, 1998) e da anemia infecciosa equina.

Diferentemente do método de Ouchterlony, que faz difundir o antígeno e o anti-soro pelo meio gelatinoso a partir dos poços perfurados separadamente, a imunodifusão radial simples de Mancini caracteriza-se pela incorporação do anti-soro no próprio gel e pela distribuição do antígeno, em diferentes diluições, nos diversos poços perfurados no meio gelatinoso. Têm-se a expectativa, após certo tempo de difusão, variável em função do

peso molecular do antígeno, que sejam formados “halos de precipitação” limitados por um anel periférico ou “zona de equivalência”, cujo diâmetro elevado ao quadrado corresponde, proporcionalmente, à concentração do antígeno (OMS, 1968; BIER, 1984; TIZARD, 2002). A área de um halo está diretamente relacionada com a quantidade de antígeno adicionado ao poço. Se a técnica é inicialmente padronizada usando-se quantidades conhecidas de antígeno, então uma curva padrão pode ser construída e pode se ensaiar com precisão soluções desconhecidas de antígeno. Um teste de imunodifusão radial reverso empregando ágar impregnado de antígeno tem sido usado com sucesso para dosagem de anticorpos contra *Mycoplasma mycoides* e alguns outros organismos (TIZARD, 2002).

O método de Mancini tem sua principal aplicação na titulação das imunoglobulinas IgA, IgG e IgM (FAHEY e MCKELVEY, 1964; MANCINI et al., 1965; OMS, 1968). É utilizado, também, em ensaios experimentais relativos à dosagem de enzimas e de outros componentes protéicos que participam da atividade bactericida do soro (DORN et al., 1980), como a lisozima (AMBROGI, 1986), com o objetivo de avaliar a eficiência da resposta imunológica inespecífica do organismo.

### 3.2.6 Aplicabilidade da Lisozima

O aspecto de maior relevância nesta pesquisa permeia pela necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre a imunologia clínica das espécies ruminantes em diferentes situações fisiopatológicas. Um exemplo disso refere-se a Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB), caracterizada pela evolução crônica e grande infectividade (MELO, 1999; BLOOD, 1991).

Garcia et al. (2005), em pesquisa realizada visando determinar a eficiência na dosagem de lisozima como indicador de imunidade em bovinos sugerem que novos trabalhos devam ser realizados para que tal parâmetro seja utilizado como indicador biológico da imunidade nos animais.

Necessário se faz impulsionar estudos avaliativos do potencial imunodepressor de determinadas doenças. O Vírus da Leucose Bovina (VLB) serve de exemplo, pois exerce uma provável interferência na integridade do estado imunitário dos bovinos infectados, fato que nos leva a direcionar investigações ao estudo preliminar de alguns parâmetros imunológicos, com a proposição de apresentar resultados que possam revelar significância

entre bovinos leiteiros portadores de anticorpos específicos anti-VLB utilizando um sistema imunossorológico prático e exequível, constituído de técnicas fundamentadas no método da imunodifusão, para avaliação “*in vitro*” da funcionalidade do sistema imunitário dos bovinos. Um desses parâmetros imunológicos é exatamente a titulação da lisozima (AMBROGI, 1986).

#### 4 REFERÊNCIAS

ABREU, S.R.O. et al. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite encefalite caprina e comparação com o vírus Maedi-visna para utilização em teste de imunodifusão em ágar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18(2), p.57-60, 1998.

ABREU, V. L. V.; MODENA, C. M.; SILVA, J. A. et al. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina nos Estados de Rondônia e Acre. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 42, p. 203-210, 1990.

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

ALENCAR FILHO, R.A. A imunodifusão como recurso diagnóstico da leucemia linfática crônica em bovinos. **O Biológico**, v. 44, p.27-8, 1978.

AMBROGI, C. **Studio di Parametri Immunologici atti a Valutare Fenomini Immunodepressivi Nell’animale da Esperimento**. Milano, Tese de Láurea, 1986.

ANDRADE, J. M. G. e ALMEIDA, M. M. R. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina na Bacia Leiteira de Goiana. **A Hora Veterinária**. v. 60, p. 299 – 305, 1991.

ANGELO, M.J.O. et al., Isolamento do vírus da leucose bovina de animais com linfocitose persistente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 13, São Paulo, 1995. **Anais**. São Paulo, USP, Instituto de Ciências Biomédicas, 1985. p.289

BERENJI, H. S. N. Lysozyme content of bovine neutrophils. **Journal of the Faculty of Veterinary Medicine – University of Tehran**, v. 51, n. 3-4, p. ar11-ar20, 1997.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 3 ed. Rio de Janeiro, Melhoramentos, 1984. 1234p.

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

BIRGEL, E.H. et al. Ocorrência de 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: CONFERENCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINARIA, 43., Campinas, 1988. **Anais...** p.31.

BIRGEL, E.H. Leucose linfática enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnóstico. In: **SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA**. Patologia clínica veterinária. São Paulo, 1982. p. 249-60.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O. M. **Clínica Veterinária**, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1991. 1263p.

BRIGHTLING, P.; RADOSTITS, O.M. Bovine leukosis virus infection in a dairy herd in Saskatchewan. **Canadian Veterinary Medicine**, v. 44, p. 168-75, 1983.

BURNY, A.; MAMMERICKX, M. Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus. **Developments in Veterinary Virology**. Boston (Series III), 1987. 282p.

CARNEIRO, P. A. M.; Araújo, P.W.; Biergel, E. H.; Sousa, K. W. prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado do Amazonas. **Acta Amazônia**, v 33, p. 111 – 125. 2003

CASTRO, V. B. **Avaliação e padronização da imunodifusão para a determinação dos teores de lisozima sérica em bovinos. Perspectiva de implantação de um ensaio imunossorológico “in vitro” para avaliação do estado imunitário de bovinos em diferentes situações fisiopatológicas.** ) Relatório Final (PIBIC/CNPq/UFRPE) 2004

CASTRO, N.H.C. et al. Cytogenetics study of cattle affected by persistent lymphocytosis. **Journal of Veterinary Medicine**, v.35, p.380-4, 1988.

CAVALCANTE, M.I. et al. Sobre a ocorrência da leucose bovina no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, p. 225-7, 1969.

D'ANGELINO, J.L. **Leucose enzoótica dos bovinos. Estudo retrospectivo da performance produtiva e reprodutiva de animais infectados e não infectados.** São Paulo, 1991. 1...p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

EVERMANN, J. F.; JACKSON, M. K. Laboratory Diagnostic Tests for Retroviral for infections in Dairy and Beef Cattle. **The Veterinary Clinics of North American: Food animal practice – Food Animal Retrovirology**. v. 13, n. 1, p. 87 – 106, 1977.

DEL FVA, C.; PITUCO E.M. Infecção Pelo Virus da Leucemia Bovina (BLV) no Brasil. **Instituto Biológico**, São Paulo, v.66 n1/2, p.1-8 2004

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

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

FERNANDES, A C. C. **IMUNOLOGIA CLÍNICA DA LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS**(Avaliação e padronização da imunodifusão para a determinação dos teores de lisozima sérica em bovinos. Perspectiva de implantação de um ensaio imunossorológico

“*in vitro*” para avaliação do estado imunitário de bovinos em diferentes situações fisiopatológicas) Relatório Final (PIBIC/CNPq/UFRPE) 2006

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

HEENEY, J. L.; VALLI, P. J.; JACOBS, R. M.; VALLI, V. E. Evidence for bovine leukemia virus of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. **Laboratory Investigation**, v.66, n.5, p. 608 – 611, 1992.

HOPKINS, S.G.; DIGIACOMO, R. F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. **Vet. Clin. Nort Am**, v.13, n.1, p107-128, 1997).

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

JAIN, N.C.; AH. **Essentials of Veterinary hematology**. Lea & Febiger. Philadelphia, 1993. 348p.

JOHNSON, R.; KANEENE, J.B. Bovine Leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. **Vet. Bull**, v62, n.4, p.287-321, 1992

KURIMOTO, A. et al. Thiolated dermal bovine collagen as a novel support for bioactive substances: Conjugation with lysozyme. **Journal of Biotechnonology**, v. 86, n.1, p. 1-8, 2001.

LEHNINGER, A.L. **Princípios da Bioquímica**, 2 ed. São Paulo, Savier, 1995. p.132-234.

LORENZ, R. J.; STRAUB, O. C. The epidemiology of enzootic bovine leukosis. In:

BURNY, A.; MAMMERICKX, M. ed. Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus. Boston, **Martinus Nijhoff**, 1987. p.51-68.

MAMMERICKX, M. et al. The immunodifusion tests for the detecion of bovine leukemia virus infected animais. In: BURNY, A; MAMMERICKX, M. ed. **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus**. Boston, Martinus Nijhoff, 1987. p.195-200.

MAMMERICKX, M. et al. Diagnostic tests of bovine leukemia. Comparison between and hematological test and the serological diagnosis. **European Journal of Cancer**, v.12, p.433-9, 1976.

MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v.2, p.235-254.1965

MELO, L.E.H. **Avaliação da Intercorrência entre Leucose Enzoótica, Tuberculose e Leptospirose do bovinos em rebanhos produtores de leite C do Estado de São Paulo**. USP, 1999, São Paulo – Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo.

MELO, L.E.H. **Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco**. São Paulo, 1991. 102p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

MELO, L.E.H.; RÊGO, E. W.; CASTRO, R. S et al. Registro do Primeiro Caso Clínico de Leucose Enzoótica dos Bovinos na Mesorregião Metropolitana do Recife In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28., Salvador, 2001a. **Anais...** Salvador. 2001a. p. 116.

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

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

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

MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Serological Detection of Bovine Leukemia Virus infection. **Proceedings of the 2nd CEC Seminar on Bovine Leukosis**, Copenhagen Oct. 17-18, 1975.

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

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

MOLNÁR, E. et al. **Ocorrência da Leucose Enzoótica dos Bovinos no Estado do Pará, Brasil**. Pesquisa Veterinária Brasileira. v. 19, n. 1, p. 7 – 11, 1999.

MURPHY, F. A. et al. **Veterinary Virology**. 3 ed. USA: Academic Press. 1999. 629p.

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

NICKERSON, S. C. Immune Mechanisms of the Bovine Udder: An Overview. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.187, n.1, p. 41-45, 1985.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUDE. **Comité de expertos de la OMS en patrones biológicos**: 20. Informe. Ginebra, 1968. 104p. (Serie Informes tecnicos, n.384)

OSSERMAN, E.F.; LAWLOR, D.P. Serum and urinary Lysozyme (Muramidase) in Monocytic and Monomyelocytic Leukemia. **The Journal of Immunology**, 1966.

PEREIRA, A. R.; MACHADO, P. F.; SARRIÉS, G.A. Mecanismos de Defesa da Glândula Mamária de Bovinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 3, n. 3, p. 176 – 190 – setembro – dezembro, 2000.

PESCE, A.J.; KAPLAN, L.A. **Química Clínica Métodos**, Panamericana, 1990. p.755-759.

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

ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis virus in Brasil. **Tropical Animal Health and Production**. v. 13, n. 2; p.107-11, 1981.

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

SCHWARTZ, T; LÉVI, D. Pathobiology of Bovine Leukemia Virus. **Vet. Res.** **25**: 827-833.1994

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

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K; DeROSA, D. Immunobiology of the Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, Chanpaing EUA, v. 80, p. 1851-1865, ago. 1997.

STEINHOFF, U. M. Molecular genetics applied to improved defences of the bovine udder against mastitis. The cDNA sequence of a new bovine lysozyme gene, active in polymorph sandin the udder.1995,175p. **Fachbereich Veterinarmedizin**, Justus-Liebig-Universitat,Giessen;Germany.

STRYER, L. **Bioquímica**, 3 ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1992. 881p.

TENÓRIO, T.G.S. Aspectos Sanitários Da Leucose Enzoótica, Da Leptospirose E Da Brucelose Dos Bovinos Em Rebanhos Leiteiros De Pernambuco. **UFRPE, 2003, Recife – Tese (Mestrado) Universidade Federal Rural de Pernambuco.**

THURMOND, M. C. Economics of enzootic bovine leucosis. In Burny, A.; Mammerickx, M. *Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus.* **M Artinus** Nijhoff, Boston. P 71-84. 1987

TIZARD, I.R. **Introdução à Imunologia Veterinária**, São Paulo, 6 ed. Roca, 2002. 531 p.

TOSTES R.A. Situação da leucose bovina no Brasil. **Colloquium Agrariae**. V.1 n.1, 2005

VAN DER MAATEN, M.J.; MILLER, J.M. Appraisal of control measures for bovine leukosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.175. p.1287-90, 1979.

WEISER, R.S.; MYRVIK, Q.N.; PEARSALL, N.N. **Fundamentals of Immunology**, Philadelphia, Lea & Febiger, 1969. p.305-335.

WYERS, M. Rappel sur les oncornavirus des animaux. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.151, n.3, 1975.

## **EXPERIMENTO I**

## 5 EXPERIMENTO I

### 5.1 SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCOSE DOS BOVINOS EM REBANHOS LEITEIROS DA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO TOCANTINS, BRASIL

#### 5.1.1 RESUMO

Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) é uma retrovirose cosmopolita, que se alastra progressivamente pelos rebanhos determinando grandes prejuízos à bovinocultura nacional. O objetivo com a realização deste estudo foi determinar a soroprevalência da LEB e investigar os fatores de risco associados à infecção em rebanhos leiteiros criados na Região Norte do Estado do Tocantins. Para isso, 881 amostras séricas, colhidas de 38 rebanhos leiteiros de 15 municípios do norte do Estado do Tocantins, foram examinadas pelo teste da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony em gel de Agar (IDGA-LEB) para detecção de anticorpos específicos anti-VLB. O teste de IDGA-LEB realizado em 881 amostras de bovinos leiteiros resultou em uma prevalência globalizada de 37% (326/881), com intervalo entre 32,8% a 41,2%. Entre os fatores de risco analisados, o estado nutricional dos rebanhos e o tipo de ordenha praticado nas propriedades mantiveram associação significativa ( $p < 0,05$ ) com a prevalência da LEB. A soropositividade observada na ampla maioria dos rebanhos examinados (94,7% - 36/38), evidenciando o alastramento expressivo da LEB, sugere a conexão de sua gênese com a expansão da bovinocultura leiteira no Norte do Estado do Tocantins.

**Palavras-chave:** Leucose Enzoótica, Vírus, Prevalência, Imunodifusão, Bovino.

## **5.1.2 SEROPREVALENCE AND RISK FACTORS OF THE INFECTION BY THE BOVINE LEUKOSIS VÍRUS IN DAIRY HERDS IN THE NORTH OF TOCANTINS STATE, BRAZIL**

### **5.1.3 ABSTRACT**

Bovine Enzootic Leukemia (BEL) is a cosmopolitan retrovirus that progressively spread in herds causing great damage to the national bovine culture. The objective with the development of this study was to determine the seroprevalence of the BEL and to research into the risk factors associated to the infection. For this purpose, 881 serum samples, collected from 38 dairy herds raised in the North Region of Tocantins State, were examined by the test agar gel Immunodiffusion test (AGID-LEB) for detection of antibody specific anti- BLV. The test of AGID-LEB made in 881 samples of dairy herds resulted in a global prevalence of 37% (326/881), with intervals of 32.8% to 41.2%. Among the analyzed risk factors, the nutritional score of the herds and the kind of milking used in the properties kept significance ( $p < 0,05$ ) with the prevalence of BEL. The seropositivity observed in the majority of the examined herds, exhibiting the expressive spreading of the BEL, suggests the connection of its genesis with the spread of the dairy bovine culture in the North of Tocantins State.

**Key words:** Leukosis Enzootic, Prevalence, Retrovirus, Immunodiffusion, Bovine

### **5.1.4 INTRODUÇÃO**

O Estado do Tocantins tem a pecuária como atividade predominante, possuindo um efetivo bovino de 7.961.926 cabeças, o segundo maior da Região Norte do Brasil, com uma evolução média de 3,93% ao ano. Têm-se verificado uma expansão significativa na produção leiteira do Estado, praticamente dobrando de 1990 (106 milhões de litros) a 2004 (215 milhões de litros), com o crescimento de mais de 40% de vacas ordenhadas no período de 1996 (306.960) a 2003 (435.006). A expansão qualificada deste importante setor produtivo para a economia do Estado do Tocantins se deve, certamente, as condições

climáticas, técnicas e estruturais favoráveis ao desenvolvimento da pecuária leiteira, resultando em um efetivo bovino de melhor qualidade genética e eficiência produtiva (BRASIL, 2006).

No âmbito das enfermidades que trazem prejuízos a bovinocultura, destacamos a Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB), que é uma doença cosmopolita, infecto-contagiosa, de evolução crônica, causada por um retrovírus exógeno linfotrópico B. O Vírus da Leucose Bovina (VLB) compromete primariamente o sistema linfóide dos bovinos infectados e determina processos desorganizativos de tecidos e órgãos, especialmente linfonodos, promovendo, por leucemização, a formação progressiva de linfossarcomas (INTERNATIONAL COMMITTEE ON BOVINE LEUCOSIS, 1968; JAIN, 1993).

A LEB é de significativa importância econômica, pois seus impactos financeiros em rebanhos leiteiros comerciais têm sido sempre descritos na literatura (THURMOND, 1987; POLLARI et al., 1993; BIRGEL et al., 1994; MELO, 1999; CARNEIRO et al., 2003). Os efeitos da infecção pelo VLB têm sido estudados especialmente, no gado leiteiro, cuja performance reprodutiva é comprometida pela queda na produção de leite e intervalos interpartos maiores (D'ANGELINO, 1992; DA et al., 1993; JACOBS et al., 1995). As perdas incluem, ainda, gastos com tratamentos e diagnóstico, redução da capacidade produtiva, mortes, reposição de animais, condenação de carcaças e impossibilidade de exportação dos mesmos. (DA et al., 1993; CARNEIRO et al., 2003; TOSTES, 2005).

Originária da Europa, a LEB teve seu primeiro caso clínico reportado por Leisering, em 1861 (STÖBER, 1970; OLSON e MILLER, 1987). Posteriormente, difundiu-se para outros continentes através da introdução de animais europeus infectados (OLSON e MILLER, 1987; CASTRO et al., 1988).

O isolamento mundial do VLB ocorreu pela primeira vez nos E.U.A, em cultura celular de linfócitos bovinos, por Miller et al. (1969). No Brasil, seu isolamento pioneiro foi realizado por Ângelo et al. (1995) em cultura primária de fibroblastos provenientes de prepúcios humanos, a partir de linfócitos de bovinos soro-reagentes ao antígeno glicoprotéico do VLB.

A introdução da LEB no Brasil é atribuída às importações de animais soropositivos oriundos da América do Norte e Europa, principalmente, para produtores de leite das regiões do Sul e Sudeste, se disseminando por todo o país como consequência do intenso trânsito de animais entre os Estados (KANTEK et al., 1982; ABREU et al., 1994; MORAES et al., 1996).

Levantamentos soroepidemiológicos realizados por diversos pesquisadores têm demonstrando o avanço da LEB e sua ampla disseminação nos rebanhos bovinos brasileiros (Quadro 1). A prevalência globalizada no país, com base na literatura compulsada, pode ser estimada em 23,7% (7.862/33), ocorrendo numa magnitude maior na região Sudeste, com taxa em torno de 39,8% (4.821/12.110). A LEB Encontra-se amplamente distribuída, de forma significativa e crescente, nas regiões Centro-Oeste (23,9%), Sul (14,18% - 2.053/14.476) e Nordeste (13,86% - 756/5.454).

Quadro 1 – Taxas de Prevalências de bovinos sororreagentes aos antígenos do VLB determinadas pelo teste de IDGA, distribuídas segundo Regiões e Estados do Brasil, de acordo com autor e ano. Recife – 2007.

Pesquisadores	ANO	Estados	PREVALÊNCIA (%)
<b>Região Sudeste</b>			
Alencar Filho	1978	São Paulo	60,0
Alencar Filho et al.	1979	São Paulo	35,6
Lima et al.	1980	São Paulo	33,0
Birgel et al.	1988a	São Paulo	52,6
Birgel et al.	1988b	São Paulo	44,9
Birgel Júnior et al.	1990	São Paulo	45,3
D' Angelino	1991	São Paulo	52,5
Birgel et al.	1991	São Paulo	42,9
Birgel et al.	1994	São Paulo	4,1
Birgel Júnior et al.	1995	São Paulo	49,2
Birgel et al.	1996	São Paulo	11,4
Samara et al.	1997	São Paulo	29,8%
D' Angelino et al.	1998	São Paulo	54,0
Melo	1999	São Paulo	46,4
Romero e Rowe	1981	Rio de Janeiro	53,3
Cunha et al.	1982	Rio de Janeiro	27,0
Leite et al.	1980	Minas Gerais	70,9
Modena	1981	Minas Gerais	70,9
Modena et al.	1983	Minas Gerais	12,5
Modena et al.	1984	Minas Gerais	26,7
Leite et al.	1984	Minas Gerais	1,7
Santos et al.	1985	Minas Gerais	28,4
Castro	1988	Minas Gerais	23,0
Camargos et al.	2002	Minas Gerais	38,7
<b>Região Sul</b>			
Kantek et al.	1982	Paraná	18,3
Kantek et al.	1983	Paraná	20,7
Carvalho	1994	Paraná	7,0
Scarci et al.	1980	Rio Grande do Sul	19,0
Gomes et al.	1985	Rio Grande do Sul	32,6
Flores et al.	1988	Rio Grande do Sul	14,2
Flores et al.	1990	Rio Grande do Sul	20,6
Moraes et al.	1996	Rio Grande do Sul	9,2
<b>Região Nordeste</b>			
Távora	1990	Bahia	16,1
Melo	1991	Pernambuco	15,1
Abreu	1994	Ceará	10,5
Melo et al.	1997	Sergipe	8,8
Simões	1998	Paraíba	8,3
Birgel et al.	1999	Alagoas	10,6
Simões et al.	2001	Rio Grande do Norte	5,1
Silva	2001	Piauí	16,9
Tenório	2003	Pernambuco	16,0
Mendes	2002	Pernambuco	14,7
<b>Região Norte</b>			
Abreu et al.	1990	Acre	9,7
Abreu et al.	1990	Rondônia	23,0
Molnár et al.	1999	Pará	26,0
Carneiro	2003	Amazonas	9,6
<b>Região Centro-Oeste</b>			
Andrade e Almeida	1991	Goias	13,2 – 36,5
Camargos et al.	2000	Mato Grosso do Sul	22,0

Na Região Norte estima-se uma prevalência próxima a 17%, sendo relatada sorologicamente nos Estados do Acre (9,7%) e Rondônia (23%) (ABREU et al., 1990), Pará (26%) (MOLNAR et al., 1999) e Amazonas (9,6%) (CARNEIRO et al., 2003). Em Tocantins, até a realização deste estudo, não se havia registrado a LEB.

O desconhecimento da enfermidade pelos criadores e a ausência de uma política sanitária rigorosa contribui para sua disseminação pelos rebanhos brasileiros, uma vez que não é exigido o exame da LEB para compra e venda de animais, incluindo participação em feiras e exposições, tão pouco se faz o controle sistemático nas propriedades (MELO et al., 2001; MENDES, 2002; TENÓRIO, 2003; DEL FAVA e PITUCO 2004).

Diante do exposto, a realização deste estudo teve como objetivo determinar a soroprevalência da LEB e investigar os fatores de risco associados à infecção em rebanhos leiteiros criados na Região Norte do Estado do Tocantins.

### **5.1.5 MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi realizado em rebanhos criados na Microrregião de Araguaína, localizado na mesorregião Ocidental do Tocantins situado no norte do Estado do Tocantins. Possui uma área de 26.493 km<sup>2</sup>, com predominância de clima tropical (IBGE, 2006) O Estado possui uma população de 1.262.644 habitantes e uma área de 277.620 Km<sup>2</sup>; (TOCANTINS, 2005). O experimento envolveu 15 municípios dos 17 que constituem a microrregião: Aragominas, Araguaína, Arapoêma, Babaçulândia, Bandeirantes, Colinas, Filadélfia, Muricilândia, Nova Olinda, Palmeirante, Pau D'Arco, Piraquê, Santa Fé do Araguaia, Wanderlândia e Xambioá (Figuras 1 e 2).

Os municípios possuem sua economia baseada em atividades agropecuárias, onde predomina a tradicional pecuária extensiva de gado de corte, concentrada em médios e grandes produtores, e a dinâmica e em expansão pecuária leiteira, por sua vez concentrada em pequenos e médios produtores.

As propriedades de exploração leiteira envolvidas neste estudo encontravam-se submetidas a práticas de manejos semelhantes, onde os rebanhos eram criados de forma semi-intensiva, sendo realizada ordenha manual ou mecânica, a maior parte deles com limitados recursos técnicos e intensa rotatividade de animais.

Na determinação do *número de amostras* a serem testadas e da *prevalência da LEB* foram usados ensaios de amostragem relacionados ao estudo de prevalência de enfermidades infecciosas crônicas preconizados por Astudillo, (1979), em função de alguns critérios epidemiológicos, como tipo de exploração, categoria animal e a área geográfica:

a) Número mínimo de amostras:

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

Onde: p = prevalência esperada da LEB; g = fator determinante do grau de confiança (1,962  $\cong$  4) e  $\alpha$  = margem de erro admissível. Desta forma, n'  $\cong$  868 amostras.

Como a população de bovinos nos municípios da microrregião de Araguaína não é homogênea foi utilizada para cálculo do numero de rebanhos por município, amostra estratificada de tamanho proporcional ao efetivo bovino existente em cada município por favorecer uma amostra mais representativa da população (Reis, 2003).

Com base em resultados regionais (ABREU et al. 1990; MOLNAR et al., 1999; CARNEIRO et al, 2003) foi definido 17% como prevalência esperada para a LEB, admitindo-se uma margem de erro de 15%, com um grau de confiança de 95%. A prevalência da LEB, globalizada e por rebanho, foi estabelecida pela fórmula:

b) Prevalência da LEB:

$$p = \frac{nr}{n'(\text{ou } n)} \cdot 100\%$$

Onde: nr = número de amostras que reagiram positivamente; n' = número total de bovinos testados dos rebanhos; n = número de bovinos testados no rebanho

Com o objetivo de melhor caracterizar a magnitude da infecção por VLB, as taxas de prevalência estabelecidas em cada rebanho foram classificadas e agrupadas em baixa (até 10%), média (entre 11 e 30%) e alta (maior do que 30%), conforme critérios preconizados por Shettigara et al., (1986).

Foram colhidas no período de fevereiro a junho de 2006, amostras sanguíneas de 881 vacas, criadas em 38 rebanhos sendo uma média de 20 animais por propriedade, com

predominância racial resultante do cruzamento de animais de raças européias (Holandesa) com raças zebuínas (Gir), com idade igual ou superior a 24 meses, em lactação e mais de 30 dias de paridas.

As amostras de sangue foram colhidas e processadas por meio de técnicas convencionais (BIRGEL. et al., 1982; GARCIA-NAVARRO e PACHALY, 1994) e alíquotas do soro obtido foram identificadas e acondicionadas em tubos *ependorfs*, sendo mantidas sob refrigeração a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a efetiva realização do exame sorológico no Laboratório de Pesquisa em Clínica de Grandes Animais, do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

As amostras séricas foram examinadas pela Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony – IDGA-LEB (MILLER e VAN DER MAATEN, 1975; MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; BIRGEL et al., 1982), utilizando-se um antígeno glicoprotéico (gp 51), extraído do envelope do vírus da leucose bovina e produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR<sup>1</sup>. A leitura foi realizada 72 horas após a montagem do sistema (Anexo 2).

Os fatores de risco e sua provável conexão clínico-epidemiológica com a infecção pelo VLB foram analisados a partir da aplicação de um questionário investigativo, versando sobre as seguintes variáveis: tipo de exploração, procedência dos animais, estado nutricional, manejo alimentar, assistência veterinária e tipo de ordenha.

Os cálculos estatísticos foram obtidos através do programa SAS (Statistical Analysis System), na versão 8.0, sendo os testes realizados com uma margem de erro de 5,0%. Nesta análise foram obtidas as distribuições absolutas e percentuais uni e bivariadas (Técnicas de estatística descritiva) e utilizou-se o teste Qui-quadrado de Pearson ou, quando as condições para isso não foram possíveis, o teste Exato de Fisher, incluindo o valor do *Odds Ratio* (OR) e um intervalo de confiança para este parâmetro (ALTMAN e HALL, 1991; ZAR, 1999).

---

<sup>1</sup> TECPAR – Lote: 002/05



## 5.1.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1.6.1 Relacionados à prevalência da Infecção pelo VLB

O teste de IDGA-LEB realizado em 881 amostras de bovinos leiteiros resultou em uma prevalência globalizada de 37% (326/881), depositando neste resultado 95% de confiança, uma vez que, pela técnica de intervalo, a prevalência da LEB na população da qual a amostra foi extraída era estimada entre 32,8% a 41,2% (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados de soroprevalência obtidos pelo teste da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony em gel de Agar (IDGA-LEB), segundo os rebanhos leiteiros na Microrregião de Araguaína TO, 2006.

Rebanho Examinado	VLB positivos		VLB negativos		total	
	N	%	N	%	N	%
R1	10	52,6	9	47,4	19	100,0
R2	9	29,0	22	71,0	31	100,0
R3	27	32,1	57	67,9	84	100,0
R4	20	25,6	58	74,4	78	100,0
R5	11	57,9	8	42,1	19	100,0
R6	9	50,0	9	50,0	18	100,0
R7	5	33,3	10	66,7	15	100,0
R8	5	25,0	15	75,0	20	100,0
R9	13	65,0	7	35,0	20	100,0
R10	10	50,0	10	50,0	20	100,0
R11	8	40,0	12	60,0	20	100,0
R12	6	30,0	14	70,0	20	100,0
R13	7	38,9	11	61,1	18	100,0
R14	12	54,5	10	45,5	22	100,0
R15	7	35,0	13	65,0	20	100,0
R16	4	16,0	21	84,0	25	100,0
R17	11	57,9	8	42,1	19	100,0
R18	9	42,9	12	57,1	21	100,0
R19	12	60,0	8	40,0	20	100,0
R20	0	0,0	20	100,0	20	100,0
R21	11	55,0	9	45,0	20	100,0
R22	9	45,0	11	55,0	20	100,0
R23	4	23,5	13	76,5	17	100,0
R24	8	40,0	12	60,0	20	100,0
R25	9	47,4	10	52,6	19	100,0
R26	8	40,0	12	60,0	20	100,0
R27	3	15,0	17	85,0	20	100,0
R28	6	30,0	14	70,0	20	100,0
R29	10	58,8	7	41,2	17	100,0
R30	7	35,0	13	65,0	20	100,0
R31	8	42,1	11	57,9	19	100,0
R32	8	40,0	12	60,0	20	100,0
R33	7	35,0	13	65,0	20	100,0
R34	3	15,0	17	85,0	20	100,0
R35	0	0,0	20	100,0	20	100,0
R36	15	75,0	5	25,0	20	100,0
R37	7	35,0	13	65,0	20	100,0
R38	8	40,0	12	60,0	20	100,0
<b>Total</b>	<b>326</b>	<b>37,0</b>	<b>555</b>	<b>63,0</b>	<b>881</b>	<b>100,0</b>

Em relação a outros estados da Região Norte do Brasil, preservadas as peculiaridades de cada ensaio soroepidemiológico realizado, com ênfase à população referencial, o Tocantins registra a maior taxa de prevalência para LEB, comparativamente as estabelecidas no Acre (9,7%) por Abreu et al. (1990), no Amazonas (9,6%) por Carneiro et al. (2003), no Pará (26,0%) por Molnár et al. (1999) e em Rondônia (23%) por Abreu et al. (1990).

Essa soropositividade (37%) foi compatível com as médias obtidas para as regiões Sudeste (39,8%) e Centro-Oeste (23,9%), com destaque para inquéritos sorológicos realizados em São Paulo, Minas Gerais e Goiás, cujas taxas de prevalência foram 35,6 % (ALENCAR FILHO et al., 1979), 38,7% (CAMARGOS et al., 2002) e 36,5 % (ANDRADE e ALMEIDA, 1991), respectivamente.

A gênese da LEB nos rebanhos do Norte do Estado de Tocantins pode estar associada à expansão desenfreada por que passa a bovinocultura leiteira nesta região do Estado. Trata-se de uma demanda que tem exigido a rápida reformulação dos rebanhos, com a incorporação de reprodutores e/ou matrizes geneticamente qualificados e mais produtivos, de raças européias, principalmente a Holandesa. Todavia, a introdução negligente desses animais nos rebanhos, geralmente advindos de outros estados das regiões Norte (Pará), Centro-Oeste (Goiás) e Sudeste (São Paulo e Minas Gerais), sem a observância de critérios rígidos de sanidade, cria condições favoráveis para a difusão da infecção pelo VLB.

A soropositividade observada na ampla maioria dos rebanhos examinados neste estudo (94,7% - 36/38), com taxas expressivas da prevalência como 25,6% (20/78), 32,1% (27/84), 57,1% (9/21) e 65% (13/20), demonstrou que a LEB encontra-se disseminada na população examinada. Uma vez introduzida, a infecção pelo VLB pode ter se disseminado nos rebanhos examinados devido à homogeneidade do sistema de produção regional, caracterizado pelo intenso fluxo de animais, desconhecimento da doença pelos produtores, assistência médico-veterinária deficiente, além dos efeitos negativos advindos da pouca estrutura de órgãos oficiais competentes envolvidos com a sanidade animal, não havendo estratégia adequada para o controle e erradicação desta insidiosa retrovírose, que tanto interfere negativamente na produtividade dos rebanhos. (GOMES et al., 1985; BIRGEL et al., 1988b; BIRGEL JÚNIOR et al., 1990; D'ANGELINO, 1991; MELO, 1999). Trata-se, por conseguinte, de um contexto clínico-epidemiológico potencialmente crítico, precursor

do alastramento incontrolável da LEB, principalmente porque não se têm implementado medidas voltadas ao combate dessa retrovirose na região estudada.

É imperiosa, pois, a avaliação da dinâmica da infecção na região estudada, com vistas à implementação de efetivas e rigorosas medidas sanitárias para o controle estratégico da LEB. Neste sentido, os critérios preconizados por Shettigara et al. (1986) permitiram avaliar que a maioria dos rebanhos (94% - 36/38) que apresentaram taxas de prevalência, foram classificados como média (15,8% - 6/38) e alta (78,9% - 30/38), sendo observado que em apenas dois deles (5,3%) não havia bovinos portadores de anticorpos anti-VLB (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição das frequências de prevalência de bovinos sororreagentes ao teste da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony em gel de Agar (IDGA-LEB), segundo a intensidade das taxas de prevalência nos rebanhos estudados na Microrregião de Araguaína-TO, 2006

Intensidade de Prevalência <sup>1</sup>	Frequência (%)
Baixa (0 – 10 %)	2 (5,3)
Média (10 - 30 %)	6 (15,8)
Alta (> 30 %)	30 (78,9)
<b>Total</b>	<b>38 (100)</b>

<sup>1</sup>Shettigara et al., 1986.

Em relação aos municípios e às correspondentes taxas de prevalência da LEB, obtiveram-se taxas que variaram de 16,6% (10/60) a 75% (15/20), respectivamente nos municípios de Santa Fé do Araguaia e Wanderlândia (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores absolutos e relativos obtidos pelo teste da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony em gel de Agar (IDGA-LEB), distribuídos por município na Microrregião de Araguaína TO, 2006

Município	Nº rebanhos	Número de Amostras	Amostras Examinadas			
			VLB positivos		VLB negativos	
			N	%	N	%
Araguaína	7	264	91	34,0	173	65,5
Aragominas	2	40	18	45,0	22	55,0
Arapoema	4	78	31	39,7	47	60,3
Babaçulândia	3	67	23	34,3	44	65,7
Bandeirantes	4	80	32	40,0	48	60,0
Colinas do Tocantins	3	57	23	40,3	34	59,7
Filadélfia	2	39	17	43,5	22	56,5
Muricilândia	2	40	11	27,5	29	72,5
Nova Olinda	1	20	6	30,0	14	70,0
Palmeirante	1	17	10	58,0	7	42,0
Pau D' Arco	2	39	15	38,4	24	61,6
Piraquê	1	20	8	40,0	12	60,0
Santa Fé do Araguaia	4	60	10	16,6	50	83,4
Wanderlândia	1	20	15	75,0	5	25,0
Xambioá	2	40	15	37,5	25	62,5
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>881</b>	<b>326</b>	<b>37,0%</b>	<b>557</b>	<b>63,0%</b>

### 5.1.6.2 Relacionados aos Fatores de Risco

Observando-se fatores que colocavam em risco a saúde dos rebanhos examinados percebeu-se que apenas o estado nutricional dos rebanhos e tipo de ordenha praticado nas propriedades (Tabela 4) manteve associação significativa com a prevalência da LEB.

Em relação ao estado nutricional, observou-se que a prevalência da LEB foi 7,3% mais elevada nas propriedades que tinham animais em estado bom do que nas que possuíam animais em estado nutricional regular (39,9% x 32,6%), sendo observada associação significativa a 5,0% ( $p < 0,05$  e o intervalo para OR exclui o valor 1,00).

Quanto ao tipo de ordenha, observou-se que a prevalência da LEB foi bem mais elevada nos animais de propriedades onde se praticava ordenha mecânica (54,0%) comparativamente as que implementavam ordenha manual (36,3%) e a associação se mostrou significativa a 5,0% ( $p < 0,05$ , OR igual a 2,07 e intervalo para OR que não inclui o valor 1,00).

Considerando que a LEB encontra-se estreitamente associada ao manejo implementado nas criações, admite-se que o bom estado nutricional dos animais e a prática da ordenha mecânica representam aspectos relacionados à sofisticação tecnológica e maior intensidade do manejo, fatores estes considerados de influência na gênese da doença. Além disso, o bom estado corpóreo retarda o descarte de animais e potencializa, mediante a evolução crônica da LEB, as condições favoráveis à transmissibilidade da doença pela grande infectividade do VLB e o convívio íntimo e prolongado entre bovinos sadios e VLB positivos (MILLER et al. 1969; BIRGEL et al., 1982; D'ANGELINO, 1991 ; MELO, 1999 SILVA, 2001)

Tabela 4 – Prevalência da leucose enzoótica dos bovinos nos rebanhos estudados segundo as variáveis o estado nutricional e tipo de ordenha, na Microrregião de Araguaína-TO,2006

Variáveis	Positivo		Negativo		Total		Valor de p	OR e IC com 95,0%
	n	%	n	%	n	%		
<b>Estado nutricional</b>								1,37 (1,03 a 1,82)
regular	113	32,6	234	67,4	347	100,0	$P^1=0,0278^*$	1,00
bom	213	39,9	321	60,1	534	100,0		
<b>Total</b>	326	37,0	555	63,0	881	100,0		
<b>Tipo de ordenha</b>								
Manual	306	36,3	538	63,7	844	100,0	$p^{(1)} = 0,0282^*$	1,00
Mecânica	20	54,0	17	46,0	37	100,0		
<b>Total</b>	326	37,0	555	63,0	881	100,0		

(\*) – Associação significativa ao nível de 5.0%.

(1) – Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

Por outro lado, observou-se que os demais fatores analisados, incluindo *assistência veterinária, procedência dos animais, manejo alimentar e tipo de exploração* (Tabela 5), preservadas as peculiaridades de cada situação, não interferiram nas taxas de prevalência ao nível de significância de 5%.

Entretanto, merece destaque o fato de que a prevalência da LEB foi 5,2% mais elevada nas propriedades que mantinham *assistência veterinária* em relação as que não mantinham, diferença esta que não revelou associação significativa entre as duas variáveis ( $p > 0,05$  e intervalo para OR que exclui o valor 1,00) (Tabela 5). Este achado, embora caracterize-se apenas como uma tendência, pode estar associado à intervenção humana, incluindo médicos veterinários e auxiliares envolvidos com a pecuária, cujos procedimentos técnicos como palpação retal para o controle ginecológico e ou obstétrico de vacas, colheita de sangue e ou administração de medicamentos, atos cirúrgicos e medidas de controle para Brucelose e Tuberculose, possibilitam a troca de sangue entre bovinos sadios e VLB positivos, principalmente se não se obedecerem normas sanitárias adequadas (FERRER et al., 1979; WILESMITH, 1980; EVERMANN et al., 1987; WENTINK et al., 1993).

Tabela 5 – Prevalência da leucose enzoótica dos bovinos nos rebanhos estudados segundo as variáveis assistência veterinária, procedência dos animais, manejo alimentar e tipo de exploração, na Microrregião de Araguaína-TO, 2006

Variáveis	Positivo		Negativo		TOTAL		Valor de p	OR e IC com 95,0%
	n	%	n	%	n	%		
<b>Assistência veterinária</b>								
Sim	143	40,1	214	59,9	357	100,0	$p^{(1)} = 0,1214$	1,25 (0,94 a 1,64)
Não	183	34,9	341	65,1	524	100,0		
<b>Total</b>	<b>326</b>	<b>37,0</b>	<b>555</b>	<b>63,0</b>	<b>881</b>	<b>100,0</b>		
<b>Procedência dos animais</b>								
Compra, exposição/Leilão/etc.	46	47,4	51	52,6	97	100,0	$p^{(1)} = 0,0720$	1,66 (1,07 a 2,57)
Nasceram na propriedade	92	36,8	158	63,2	250	100,0		
Compra e Nasceram na propriedade	188	35,2	346	64,8	534	100,0		1,00
<b>Total</b>	<b>326</b>	<b>37,0</b>	<b>555</b>	<b>63,0</b>	<b>881</b>	<b>100,0</b>		
<b>Manejo alimentar</b>								
Pasto	243	35,8	435	64,2	678	100,0	$p^{(1)} = 0,1815$	1,00
Pasto com suplementação	83	40,9	120	59,1	203	100,0		
<b>Total</b>	<b>326</b>	<b>37,0</b>	<b>555</b>	<b>63,0</b>	<b>881</b>	<b>100,0</b>		
<b>Tipo exploração</b>								
Leite	164	35,0	304	65,0	468	100,0	$p^{(1)} = 0,1991$	1,00
Mista	162	39,2	251	60,8	413	100,0		
<b>Total</b>	<b>326</b>	<b>37,0</b>	<b>555</b>	<b>63,0</b>	<b>881</b>	<b>100,0</b>		

(\*) – Associação significativa ao nível de 5.0%.

(1) – Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

### 5.1.7 CONCLUSÃO

A soropositividade observada na ampla maioria dos rebanhos examinados, evidenciando o alastramento expressivo da LEB, sugere a conexão de sua gênese com a expansão da bovinocultura leiteira no Norte do Estado do Tocantins.

### 5.1.8 REFERÊNCIAS

ABREU, J. M. G.; Araújo W. P. BIRGUEL, E. H. **Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina em animais criados na bacia leiteira de Fortaleza** Estado do Ceará. 1994. **Arquivos da escola de Medicina Veterinária** da Universidade Federal da Bahia, v. 17: 67-89.

ABREU, V. L. V.; MODENA, C. M.; SILVA, J. A. et al. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina nos Estados de Rondônia e Acre. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 42, p. 203-210, 1990.

ALENCAR FILHO, R. A. A imunodifusão como recurso diagnóstico da leucemia linfática crônica em bovinos. **O Biológico**, v. 44, p.27-8, 1978.

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

ALTMAN, D.G.; HALL, C.A. **Practical Statistics for Medical Research**. London, Great Britain. 1991, 611 p.

ANDRADE, J. M. G. e ALMEIDA, M. M. R. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina na Bacia Leiteira de Goiana. **A Hora Veterinária**. v. 60, p. 299 – 305, 1991.

ANGELO, M.J.O. et al., Isolamento do vírus da leucose bovina de animais com linfocitose persistente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 13, São Paulo, 1995. **Anais**. São Paulo, USP, Instituto de Ciências Biomédicas, 1985. p.289

ASTUDILLO, V.M. **Encuesta por muestra para estudios epidemiológicos en poblaciones animales**. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Febre Aftosa, 1979. 60p. (Serie de Manuales Didáticos n. 12)

BIRGEL JUNIOR, E. H. et al. Prevalência da leucose enzoótica dos bovinos adultos, em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO MUNDIAL DE BUIATRIA, 16, Salvador, 1990. **Anais...** Salvador, Associação Mundial de Buiatria, 1990. p. 789 - 793.

BIRGEL JÚNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; 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**. v. 15, n. 4, p. 93 – 99, 1995.

BIRGEL, E. H.; AYRES, M. C. C.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Prevalência da leucose enzoótica dos bovinos, em animais criados na bacia leiteira do Estado de Alagoas, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 3., 1999, São Paulo. **Anais....** São Paulo: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1999. p. 129.

BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J.; D'ANGELINO, J. L. et al Características leucométricas do sangue de bovinos de rebanhos acometidos por leucose enzoótica dos bovinos adultos. In: SEMANA DE VETERINÁRIA DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE DE SAO PAULO, 1, 1982, Campinas, **Anais...**Campinas, 1982, p.73.

BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J.; D'ANGELINO, J. L. et al Prevalência da Leucose Enzoótica dos Bovinos em zebuínos da raça nelore, criados no Estado de São Paulo. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária de Universidade Federal da Bahia**. v. 17, n. 1, p. 55 - 66, 1994.

BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M. et al Ocorrência da infecção causada pelo Vírus da Leucose Bovina no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v. 28, n. 1, p. 67 - 73, 1991.

BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M. et al. Estudo preliminar sobre a ocorrência da leucose dos bovinos adultos em animais criados na região de Campinas. In: CONFERENCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINARIA, 43., 1988a, Campinas. **Anais...**Campinas, 1988a, p.30.

BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M. et al. Ocorrência de 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:

CONFERENCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINARIA, 43., 1988b, Campinas, **Anais...**Campinas, 1988b, p.31.

BIRGEL, E. H.; TÁVORA, J. P. F.; SOUZA, P. M. et al Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da Leucose dos Bovinos em zebuínos da raça Gir, criados no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1996, Goiana. **Anais...** Goiana: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1996. p. 165.

BIRGEL, E.H. et al. Ocorrência de 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: CONFERENCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINARIA, 43., Campinas, 1988b. **Anais...** p.31.

BIRGEL, E.H. Leucose linfática enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnóstico. In: **SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA**. Patologia clínica veterinária. São Paulo, 1982. p. 249-60.

BRASIL- EMBRAPA, Embrapa gado de Leite CNPGL, **Produção de Leite Tocantins por microregiões**. Disponível na Internet <http://www1.ibge.buiatria.org.br/asprebanhos.asp>. Capturado em 25 dezembro. 2006. On line.

CAMARGOS, M. F. et al. Frequência de anticorpos para o vírus da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) em bovinos pantaneiros do Núcleo de Conservação da Fazenda Nhumirim – EMBRAPA Pantanal. In: SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO SOBRE CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS, 1, Corumbá, 2000. **Anais....**Corumbá. p. 32.

CAMARGOS, M. F.; MELO, C. B.; LEITE, R. C. et al. Frequência de soropositividade para a leucose enzoótica bovina em rebanhos de Minas Gerais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 5, n. 1, p. 20 - 26. 2002.

CARNEIRO, P. A. M.; Araújo, P.W.; Biergel, E. H.; Sousa, K. W. prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado do Amazonas. **Acta Amazônia**, v 33, p. 111 – 125. 2003

CARVALHO, L. **Leucose enzoótica dos bovinos. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina em bovinos da raça Holandesa Preto e Branca e zebuínos da raça Nelore, criados no Polo Regional de Londrina, Estado do Paraná**. São Paulo, 1994. 79 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

CASTRO, N. H. C.; WALTER, J.; SANTOS, R. C. S. et al. Cytogenetics study of cattle affected by persistent lymphocytosis. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 35, p. 380-4, 1988.

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**. 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**. São

Paulo, 1991. 85 p. Tese (Livre-Docência). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

DA, Y.; SHANKS, R. D. STEWART, J. ET AL. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 147-161, 1993

DEL FVA, C.; PITUCO E.M. Infecção Pelo Virus da Leucemia Bovina (BLV) no Brasil. **Instituto Biológico**, São Paulo, v.66 n1/2, p.1-8 2004

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

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

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. **A Hora Veterinária**, n. 58, p. 25 - 29, 1990.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; REBELATTO, M. C. et al. Evolução sorológica da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos do Município de Santa Maria/RS. **Revista do Centro de Ciências Rurais**. v. 18, p. 263-71, 1988.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. São Paulo : Varela, 1994. 123p.

GOMES, M.; MOOJEN, V.; FERNADES, J. C. T. et al Detecção de anticorpos séricas contra o vírus da Leucose Enzoótica Bovina (VLEB) em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. v. 13, p. 15 -22, 1985.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Brasil. Disponível na internet [http://www.ibge.org . br](http://www.ibge.org.br)/capturado em 27 dez. 2006. On line.

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

JACOBS, R.M.; POLLARI, F.L.;Mcnab, W.B. A Sorológica survey of bovine Syncitial Vírus in ontário: Associations with Bovine Leukemia Vírus and Imunodeficiency- like viruses, Pratices. **Can J. Vet Res.** **59**: p271-278, 1995

JAIN, N.C.; AH. **Essentials of Veterinary hematology**. Lea & Febiger. Philadelphia, 1993. 348p.

KANTEK, C. E.; KRUGER, E. R.; WELTE, V. R. Infecção com o vírus da leucose enzoótica bovina em um lote de vacas produtoras de leite importadas do Uruguai. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 2, n. 2, p.125 - 126, 1982.

KANTEK, C. E.; KRUGER, E. R.; WELTE, V. R. Prevalência do vírus da leucose enzoótica bovina no rebanho leiteiro do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, n. 4, p. 125 - 129, 1983.

Leisering, 1861 *apud* STOBER, 1970. p. 54.

LEITE, R. C.; MODENA, C. M.; MOREIRA, E. C. et al. Evolução clínica da leucose enzoótica bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.6, p.47-17, 1984.

LEITE, R. C.; MODENA, C. M.; MOREIRA, E. C. et al. 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.

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.

MELO, C. B.; OLIVEIRA, A. M.; FIGUEIREDO, H. C. P. et al. Prevalência de anticorpos contra Herpesvírus Bovino-1, vírus da Diarréia Bovina a Vírus e Vírus da Leucose enzoótica Bovina em bovinos do Estado de Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 21, p. 160, 1997.

MELO, L.E.H. **Avaliação da Intercorrência entre Leucose Enzoótica, Tuberculose e Leptospirose do bovinos em rebanhos produtores de leite C do Estado de São Paulo**. USP, 1999, São Paulo – Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo.

MELO, L.E.H. **Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco**. São Paulo, 1991. 102p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

MELO, L.E.H.; RÊGO, E. W.; CASTRO, R. S et al. Registro do Primeiro Caso Clínico de Leucose Enzoótica dos Bovinos na Mesorregião Metropolitana do Recife In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28., Salvador, 2001. **Anais...** Salvador. 2001a. p. 116.

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

MILLER, J. M.; MILLER, L. D.; OLSON, C. et al. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphocyte

cultures with reference to bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute.** v. 43, p. 1297 - 1305, 1969.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Serological Detection of Bovine Leukemia Virus infection. **Proceedings of the 2nd CEC Seminar on Bovine Leukosis**, Copenhagen Oct. 17-18, 1975.

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

MODENA, C. M.; ABREU, V. L. V.; SILVA, J. A. et al Ocorrência de Infecção pelo vírus de Leucose enzoótica bovina em animais importados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 35, p. 565 - 567, 1983.

MODENA, C. M.; ABREU, V. L. V.; SILVA, J. A. et al. Leucose enzoótica bovina. I - Prevalência em rebanhos de alta linhagem no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 36, n. 1, p. 39-45, 1984.

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

MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L.; DIAS, H. T. et al. Ocorrência da Leucose Enzoótica dos Bovinos no Estado do Pará, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 19, n. 1, p. 7 – 11, 1999.

MORAES, M. P., WEIBLEN, R., FLORES, E. F.; et al. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina nos rebanhos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.2, p.257-262, 1996.

OLSON, C.; MILLER, I. History and terminology of enzootic bovine leukosis. In:

BURNY, A.; MAMMERICKX, M. ed. *Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus*. Boston, **Martinus Nijhoff**, 1987, p. 3-11.

POLLARI, F.L.; DIGIACOMO, R.F.; EVERMMAN, J.F. Use of several analysis to compare cull rates between bovine leukemia Vírus seropositive and seronegative dairy cows. **American Journal veterinary Research**, 54 (9): p.14000-3. **1993**

ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis virus in Brasil. **Tropical Animal Health and Production**. v. 13, n. 2; p.107-11, 1981.

SAMARA, S.L.; LIMA, E.G.; NASCIMENTO, A.A. Monitoração da Leucose Bovina do Gado Leiteiro da Região de Pitangueiras-SP. *Braz. J. Vet Res. Aniom. Sci*, v34, n.6, 349-351, 1997..

SANTOS, J. L.; FARIA, J. E.; RIBEIRO, M. F. B. Epidemiologia da Leucose Enzoótica Bovina no Estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos na Zona da Mata. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 37, p.359-68, 1985.

SCARCI, R. M.; BENTO, C. L.; MEDEIROS, E. L. et al Avaliação dos testes sorológicos e hematológicos no diagnóstico da leucose bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 1980, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: 1980. p. 137.

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

SILVA, S. V. D. **Leucose Enzoótica Bovina - Prevalência de anticorpos sérios 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. 176 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

SIMÕES, S. V. D.; BIRGEL JR., E. H; AYRES, M. C. C. Prevalência de anticorpos sérios anti-vírus da leucose enzoótica dos bovinos em animais criados no Estado do Rio Grande

do Norte. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4, 2001, Campo Grande. **Anais eletrônicos...** Campo Grande, 2001. Disponível em <<http://www.buiatria.com.br/>> Anais.

SIMÕES, V. D. **Leucose enzoótica dos bovinos. Prevalência de anticorpos séricos antivírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado da Paraíba.** São Paulo, 1998. 118p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

STÖBER, M. Lymphatische Leukose erwachsener Rinder. In: ROSENBERGER, G. **Krankheiten des Rindes.** Berlin, Paul Parey, p. 54 - 73, 1970.

TAVORA, J. P. F. **Prevalência da infecção pelo vírus da Leucose Bovina em rebanho leiteiros criados na região do Pólo de Itabuna, Estado da Bahia.** São Paulo, 1990. 106p. Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

TENÓRIO, T.G.S. **Aspectos Sanitários da Leucose Enzoótica, da Leptospirose e da Brucelose dos Bovinos em Rebanhos Leiteiros de Pernambuco.** UFRPE, 2003, Recife – Dissertação (Mestrado) Universidade Federal Rural de Pernambuco.

THURMOND, M. C. Economics of enzooticbovine leucosis. In Burny, A.; Mammerrickx, M. **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus.** **M Artinus** Nijhoff, Boston. P 71-84. 1987

TOCANTINS. **Atlas do Tocantins:** subsídios ao planejamento da gestão territorial. Secretaria do Planejamento e Meio Ambiente - SEPLAN. Diretoria de Zoneamento Ecológico-Econômico - DZE. 4 ed. rev. atu. Palmas: Seplan, 2005. 54 p.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis.** 4 edition, New Jersey-USA: Prentice Hall, 1999, 929 p.

## **EXPERIMENTO II**

## 6 EXPERIMENTO II

### 6.1 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA INFEÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA NOS NÍVEIS SÉRICOS DE LISOZIMA EM BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO DO TOCANTINS, BRASIL

#### 6.1.1 RESUMO

A lisozima é uma enzima lisossômica que participa da imunidade orgânica inespecífica. Sua concentração sérica pode servir de importante parâmetro imunológico indicador do estado funcional do sistema imunitário. A realização deste estudo teve como objetivo principal avaliar a possível influência da infecção pelo VLB sobre os níveis de lisozima sérica de bovinos criados na Região Norte do Estado do Tocantins, como contribuição para o estudo da imunologia clínica da Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB). Foram colhidas e submetidas à imunodifusão (Radial Dupla de Outcherloni) para detecção de anticorpos específicos anti-VLB 881 amostras bovinas extraídas de 38 rebanhos. Dessas, em função dos resultados para LEB, 400 foram divididas em dois grupos: G1 (VLB negativos), com 200 amostras, e G2 (VLB positivos), com 200 amostras. As amostras de ambos os grupos foram submetidas à imunodifusão (Radial Simples de Mancini) para determinar a concentração sérica da lisozima, cujos resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste t-Student. A prevalência foi de 37,0% (326/881), sendo a soropositividade de bovinos observada na ampla maioria dos rebanhos examinados (94,7% -36/38), com prevalências em níveis expressivos de até 75%. Os níveis séricos de lisozima encontrados foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) nos bovinos VLB negativos ( $G1 = 8,94 \gamma/ml$ ) do que nos VLB positivos ( $G2 = 7,05 \gamma/ml$ ), sendo a diferença (1,92  $\gamma/ml$ ) decorrente, provavelmente, da influência da infecção pelo VLB. Os resultados sugerem que os rebanhos leiteiros da Região Norte do Estado Tocantins encontram-se mais susceptíveis às doenças.

**Palavras-chave:** Lisozima, Leucose, Imunodifusão, Bovino, Estado do Tocantins.

## **6.1.2 AVALIATION OF THE BOVINE LEUKOSIS VIRUS INFECTION INFLUENCE ON THE LEVEL OF SERUM LYSOZYME IN DAIRY HERDS OF TOCANTINS STATE, BRASIL**

### **6.1.3 ABSTRACT**

The lysozyme is a lysosome enzyme that takes part in the unspecific organic immunity. Its serum concentration may server as important immunological parameter indicator of the functional state of the immune system. The carrying out of this study had as main objective to evaluate the possible influence of the infection by the BLV on the level of serum lysozyme of bovine raised in the North Region of Tocantins State, as a contribution for the study of clinical immunology of Bovine Enzootic Leukemia (BEL). Were collected and submitted to agar gel Immunodiffusion test for detection of antibody specific anti- BLV, 881 bovine samples collected from 38 herds. Among these, in function to the results to BEL, 400 were divided in two groups G1 (BLV negative), with 200 samples, and G2 (BLV positive), with 200 samples. The samples of both groups were submitted to Immunodiffusion (agar gel Immunodiffusion test) to determine the serum concentration of the lysozyme, which achieved results statistically analyzed by the T-student Test. The prevalence was 37.0% (326/881), being the bovine seropositivity observed in the majority of herds examined (94.7% - 36/38), with prevalence in expressive levels up to 75%. The serum levels of lysozyme achieved were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in bovine BLV negative ( $G1 = 8.94 \gamma/ml$ ) than in the BLV positive ( $G2 = 7.05 \gamma/ml$ ), being the difference (1.92  $\gamma/ml$ ) owing, probably, to the influence of the infection by the BLV. The results suggest that the dairy herds of the North Region of Tocantins State are more susceptible to the diseases.

**Key-words:** Lysozyme, Leukosis, Immunodiffusion, Bovine, Tocantins State

## 6.1.4 INTRODUÇÃO

Descoberta por Alexander Fleming em 1922 e dotada de ação lítica sobre a bactéria *Micrococcus lysodeikticus*, que passou a ser considerada um demonstrador de lise, a lisozima é uma enzima lisossômica com atividade hidrolítica, relativamente pequena, termolábil e altamente estável (WEISER et al., 1969; FREEDMAN e GOLD, 1976; AMBROGI, 1986; STRYER, 1992; LEHNINGER, 1995).

Está presente em quase todos os seres vivos, na maioria dos fluidos orgânicos como saliva, secreção nasal, mucosa intestinal e leite, exceto fluido cerebrospinal, urina e suor, que não possuem a enzima em sua composição em situações fisiológicas normais (WEISER et al., 1969; FREEDMAN e GOLD, 1976; BIER, 1984; LEHNINGER, 1995; TIZARD, 2002).

É principalmente produzida pelo monócito-macrófago e, parcialmente, pelos granulócitos, onde permanece até ser secretada nos vários líquidos orgânicos como o soro, a lágrima, entre outros (OSSERMAN e LAWLOR, 1966; AMBROGI, 1986). Nos neutrófilos, a lisozima localiza-se nos grânulos citoplasmáticos (TIZARD, 2002), sendo encontrada neste tipo celular e no leite de vacas, em teores de aproximadamente 0,13 mg/100ml (NICKERSON, 1985).

Sabe-se que os teores de lisozima variam em função das diferentes situações fisiopatológicas: em condições normais são comumente baixos e em processos infecciosos os teores são geralmente elevados (BIER, 1984). Sua contribuição ao sistema imunológico é estratégica, para a efetivação da imunidade natural, ao promover um mecanismo imune operacional nas superfícies, nos tecidos e dentro de células fagocíticas (FREEDMAN e GOLD, 1976).

A lisozima é peça essencial, juntamente com o complemento, no sistema de defesa anti-bacteriano inespecífico e mecanismo de resistência anti-viral orgânico, sendo capaz de destruir vários vírus, à semelhança de muitas das enzimas intestinais e bile (WEISER al., 1969; FREEDMAN e GOLD, 1976; AMBROGI, 1986; TIZARD, 2002).

Em relação à Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) e a possível influência da infecção pelo seu agente etiológico nos níveis séricos de lisozima, admite-se que há o comprometimento da integridade do sistema imunitário orgânico pela ação imunodepressora do Vírus da Leucose Bovina (VLB), que, ao penetrar e incorporar-se no

genoma linfocitário por tempo indeterminado (MUSCOPLAT et al. 1974; WYERS, 1975; CASTRO et al., 1988) e também nos monócitos circulantes (HEENEY et al., 1992), aumenta a susceptibilidade do hospedeiro a coinfeções (BURNY e MAMMERICKX, 1987) e pode contribuir para o desencadeamento de bacterioses oportunistas de importância clínico-epidemiológica e em saúde pública, como a tuberculose, a brucelose e a leptospirose.

Estudos citogenéticos e imuno-sorológicos (MARUYAMA et al., 1989) levaram o Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus a incluí-lo no gênero VLTH-VLB (vírus linfotrópicos de células T Humanas-Vírus linfotrópicos de células B), da espécie Vírus da Leucemia Bovina (FRANCKI et al., 1991), comumente chamado de Vírus da Leucose Bovina (VLB).

Com o objetivo de contribuir para o estudo da imunologia clínica da LEB, foi avaliada a possível influência da infecção pelo VLB sobre os níveis de lisozima de bovinos criados na Região Norte do Estado do Tocantins. Adicionalmente, o trabalho teve a finalidade de validar os conhecimentos já adquiridos sobre a padronização da técnica da imunodifusão radial simples de Mancini (FAHEY et al., 1964; MANCINI et al., 1965).

### **6.1.5 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram examinadas 881 amostras séricas de bovinos leiteiros criados em 38 rebanhos localizados em 15 municípios da Região Norte do Estado do Tocantins. As amostras de sangue foram colhidas no período de fevereiro a junho de 2006 e processadas por meio de técnicas convencionais (BIRGEL. et al., 1982; GARCIA-NVARRO e PACHALY, 1994). Duas alíquotas séricas do soro obtido foram identificadas e acondicionadas em tubos *ependorf*, sendo mantidas sob refrigeração a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até a efetiva realização da imunodifusão para LEB e, subseqüentemente, para dosagem da lisozima sérica. Os exames sorológicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Clínica de Grandes Animais, do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

Inicialmente, e com a finalidade de detectar a presença de anticorpos séricos específicos anti-VLB, as amostras foram submetidas à técnica da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony – IDGA-LEB (MILLER e VAN DER MAATEN, 1975; MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; BIRGEL et al 1982), que consistiu, em um substrato de

difusão gelatinoso, utilizando o antígeno glicoprotéico (gp 51), extraído do envelope do Vírus da Leucose Bovina. Em essência, consiste na análise imunoquímica de componentes de uma mistura, em que os antígenos reagem com seus anticorpos no seio de um meio gelatinoso e os resultados são lidos, segundo o aparecimento de linhas de precipitação, que correspondem às reações específicas de cada componente da mistura (BIER, 1984) A leitura foi realizada 72 horas após a montagem do sistema (Anexo 2).

Na seqüência, e em função dos resultados obtidos para LEB, 400 amostras foram selecionadas e divididas nos grupos G1 (VLB negativos), constituído de 200 amostras, e G2 (VLB positivos), também com 200 amostras. Desta forma, as amostras foram submetidas à técnica de Imunodifusão Radial Simples de Mancini – IDGA-Lisozima (FAHEY et al., 1964; MANCINI et al., 1965; OSSERMAM; LAWLOR, 1966; AMBROGI, 1986) por meio de lisoplasmas de difusão, que se presta para a titulação da lisozima sérica dos bovinos ao usar uma bactéria gram-positiva sensível a sua ação lítica (*Micrococcus lysodeikticus*) em um meio de cultura gelatinoso de agarose, medindo-se os diâmetros dos halos de lise bacteriana, os quais são proporcionais as concentrações de lisozima (Anexo 3).

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste *t-Student* para a comparação de médias entre dois grupos e verificação da hipótese de igualdade de variâncias. (ALTMAN e HALL, 1991; ZAR, 1999).

## 6.1.6 RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram executadas 1.281 determinações, sendo 881 exames imunossorológicos para LEB e 400 para a determinação da concentração sérica de lisozima.

O teste de IDGA-LEB, realizado em 881 amostras de bovinos leiteiros, resultou em uma prevalência globalizada de 37% (326/881), contribuindo para a formação desse índice prevalências com intensidades que variaram a um intervalo de 0% (0/20) a 75% (15/20), com destaque para taxas de 25,6% (20/78), 32,1% (27/84), 57,1% (9/21) e 65% (13/20).

Segundo Shettigara et al., (1986) a maior concentração de rebanhos soropositivos ocorreu nos níveis de intensidade média (15,8% - 6/38) e alta (78,9% - 30/38), sendo observados apenas dois rebanhos (5,3%) com prevalência de intensidade baixa, sem que houvesse bovinos portadores de anticorpos anti-VLB.

A soropositividade observada na ampla maioria dos rebanhos examinados (94,7% - 36/38), com prevalências em níveis expressivos, demonstrou que a Leucose encontra-se amplamente disseminada nos rebanhos examinados. Este fato caracteriza um contexto clínico-epidemiológico potencialmente crítico pelo risco do alastramento incontrolável da LEB, principalmente porque não se tem implementado efetivas e rigorosas medidas sanitárias de combate a essa insidiosa retrovírose na região estudada. Nessas condições, pode haver a progressiva diminuição da resistência desses rebanhos a diversas doenças, pelo comprometimento da integridade do sistema imunitário orgânico, a partir de uma possível ação imunodepressora do VLB (MUSCOPLAT et al. 1974; WYERS, 1975; CASTRO et al., 1988; HEENEY et al., 1992; BURNY e MAMMERICKX, 1987).

Mediante os resultados obtidos em circunstância semelhantes (MELO, 1999), sugere-se que uma atenção maior seja dada à possibilidade da intercorrência nesses rebanhos entre a LEB e bacterioses oportunistas como a tuberculose e leptospirose, que têm importância clínico-epidemiológica pelas perdas econômicas e implicações em saúde pública.

A titulação da lisozima sérica de bovinos desses rebanhos, embora represente apenas um dos componentes de um pretense sistema de avaliação “*in vitro*” do estado imunitário de bovinos, pode contribuir preliminarmente para a elucidação do papel imunodepressor de VLB.

Nesse sentido, têm-se as medidas dos diâmetros dos halos de lise bacteriana (Tabela 1), em valores médios, obtidos a partir da leitura das 45 lisoplacas, utilizando-se a lisozima padrão, cujos valores permitiram a elaboração da *curva de calibração* ou *experimental* e, por conseguinte, os teores de lisozima sérica das amostras examinadas (Anexo 4).

Tabela 1 - Diâmetros médios dos halos de lise bacteriana das lisoplacas, segundo as concentrações padrão de lisozima (Placas de 01 a 45), 2006

Concentrações padrão de lisozima (γ/ml)	Diâmetros dos halos das lisoplacas (s <sup>1</sup> )(mm)	
CpL <sub>1</sub>	50	11,1 (±1,5)
CpL <sub>1,1</sub>	50	11,0 (±1,5)
CpL <sub>2</sub>	2,5	9,6 (±1,5)
CpL <sub>2,2</sub>	2,5	9,6 (±1,4)
CpL <sub>3</sub>	12,5	8,9 (±1,5)
CpL <sub>3,3</sub>	12,5	8,8 (±1,6)
CpL <sub>4</sub>	6	8,3 (±1,2)
CpL <sub>4,4</sub>	6	8,3 (±1,1)
CpL <sub>5</sub>	3	7,3 (±1,1)
CpL <sub>5,5</sub>	3	7,3 (±1,0)
CpL <sub>6</sub>	1,5	6,9 (±0,9)
CpL <sub>6,6</sub>	1,5	6,9 (±0,9)

s<sup>1</sup> = desvio padrão

Na maioria das situações, ainda na Tabela 1, como era desejável, houve equivalência dos diâmetros dos halos entre si, correspondentes às concentrações padrão de lisozima e suas respectivas repetições considerando uma mesma lisoplaca. Estes achados consolidam os ensaios realizados anteriormente (CASTRO, 2004; FERNANDES, 2006) e validam a técnica para ser utilizada na rotina laboratorial, como parte integrante de um sistema de avaliação “*in vitro*” da funcionalidade do sistema imunitário de bovinos infectados pelo VLB ou submetidos a diferentes situações fisiopatológicas.

Nessas condições e considerando as 400 amostras previamente selecionadas em função dos resultados para LEB, foram confrontadas as médias dos diâmetros dos halos entre os grupos experimentais, sendo observada uma diferença de 0,46 mm mais elevada nos bovinos VLB negativos (8,54 mm) do que nos animais VLB positivos (8,08 mm). Esta diferença se revelou significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ) e a variabilidade, expressa através do coeficiente de variação, se mostrou reduzida desde que esta medida foi no máximo igual a 14,93% no grupo dos animais positivos (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise estatística do diâmetro (mm) dos halos, segundo os grupos experimentais de bovinos leiteiros da microrregião de Araguaína-TO, 2006

Medidas estatísticas	Grupos Experimentais		Valor p
	G1 (VLB negativos)	G2 (VLB positivos)	
Média <sup>(2)</sup>	8,54	8,08	p <sup>(1)</sup> < 0,001*
Desvio padrão <sup>(2)</sup>	1,09	1,21	
Coefficiente de variação (%)	12,80	14,93	
Mínimo <sup>(2)</sup>	6,00	5,00	
Percentil 25 <sup>(2)</sup>	8,00	7,00	
Mediana <sup>(2)</sup>	8,50	8,00	
Percentil 75 <sup>(2)</sup>	9,00	9,00	
Máximo <sup>(2)</sup>	12,00	11,00	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – Através do teste t-Student com variâncias desiguais.

(2) – Medidas em mm.

Em relação aos níveis de lisozima (Tabela 3), destaca-se que, no exame das 400 amostras examinadas, obteve-se uma diferença média de 1,92  $\gamma$ /ml entre os grupos, sendo mais elevada nos bovinos VLB negativos (8,97  $\gamma$ /ml) do que nos VLB positivos (7,05  $\gamma$ /ml). Esta diferença se revelou significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ) e a variabilidade, expressa através do coeficiente de variação, se mostrou reduzida desde que esta medida tenha sido no máximo igual a 11,64% no grupo dos animais VLB positivos.

Tabela 3 – Análise estatística dos valores séricos da lisozima ( $\gamma$ /ml), segundo os grupos experimentais de bovinos leiteiros da microrregião de Araguaína-TO, 2006

Medidas estatísticas	Grupos Experimentais		Valor p
	VLB negativos	VLB positivos	
Média <sup>(2)</sup>	8,97	7,05	p <sup>(1)</sup> < 0,001*
Desvio padrão <sup>(2)</sup>	0,98	0,82	
Coefficiente de variação (%)	10,90	11,64	
Mínimo <sup>(2)</sup>	7,28	5,44	
Percentil 25 <sup>(2)</sup>	8,14	6,41	
Mediana <sup>(2)</sup>	8,90	6,82	
Percentil 75 <sup>(2)</sup>	9,89	7,63	
Máximo <sup>(2)</sup>	10,60	8,88	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – Através do teste t-Student com variâncias desiguais.

(2) – Medidas em  $\gamma$ /ml.

Seria precipitado caracterizar o fenômeno de imunodepressão universalmente associado à infecção pelo VLB (MUSCOPLAT et al. 1974; WYERS, 1975; CASTRO et al., 1988; HEENEY et al., 1992; BURNY e MAMMERICKX, 1987), por apenas um parâmetro imunossorológico inespecífico, a lisozima. É preciso considerar, ainda, que em um outro ensaio imunossorológico (GARCIA et al, 2005), realizado para determinar a concentração da lisozima e monitorar a resposta imune de bezerros acometidos de diferentes fases de diarréia, não obteve índices significantes para afirmar a eficiência da lisozima como um indicador de imunidade.

Entretanto, os níveis mais elevados de lisozima encontrados nos bovinos VLB-negativos em relação aos VLB positivos, ratificados estatisticamente, sugerem que a infecção pelo VLB interferiu nos níveis de lisozima. Neste sentido, trata-se de um achado promissor e estimulante para a montagem de um sistema “*in vitro*” mais abrangente, confiável e exequível na rotina laboratorial, para avaliar o estado imunitário de bovinos submetidos a diferentes situações fisiopatológicas, com vistas à elucidação do papel imunodepressor do VLB.

Adicionalmente, mediante os resultados satisfatórios acima, admite-se que a Imunodifusão Radial Simples de Mancini – IDGA-Lisozima (FAHEY ET AL., 1964; MANCINI et al., 1965; OSSERMAM; LAWLOR, 1966; AMBROGI, 1986) padronizada em ensaios realizados anteriormente por Castro, (2004) e Fernandes, (2006) encontra-se, doravante, validada para determinar a titulação da lisozima sérica dos bovinos e funcionar como um parâmetro de imunidade.

## 6.1.7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, caracterizados pela ampla disseminação da LEB nos rebanhos examinados, em conexão com a redução dos teores de lisozima nos animais VLB positivos, sugerem que os rebanhos leiteiros da Região Norte do Estado Tocantins encontram-se mais susceptíveis a doenças.

## 6.1.8 REFERÊNCIAS

ALTMAN, D.G.; HALL, C.A. *Practical Statistics for Medical Research*. London, Great Britain. 1991, 611 p.

AMBROGI, C. **Studio di Parametri Immunologici atti a Valutare Fenomini Immunodepressivi Nell'animale da Esperimento**. Milano, Tese de Láurea, 1986.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 3 ed. Rio de Janeiro, Melhoramentos, 1984. 1234p.

BIRGEL, E.H. Leucose linfática enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnóstico. **In: SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA**. Patologia clínica veterinária. São Paulo, 1982. p. 249-60.

BURNY, A.; MAMMERICKX, M. **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus. Developments in Veterinary Virology**. Boston (Series III), 1987. 282p.

CASTRO, N.H.C. et al. Cytogenetics study of cattle affected by persistent lymphocytosis. **Journal of Veterinary Medicine**, v.35, p.380-4, 1988.

CASTRO, V. B. **Avaliação e padronização da imunodifusão para a determinação dos teores de lisozima sérica em bovinos. Perspectiva de implantação de um ensaio imunossorológico “in vitro” para avaliação do estado imunitário de bovinos em diferentes situações fisiopatológicas.** ) Relatório Final (PIBIC/CNPq/UFRPE) 2004

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

FERNANDES, A C. C. **IMUNOLOGIA CLÍNICA DA LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS**(Avaliação e padronização da imunodifusão para a determinação dos teores de lisozima sérica em bovinos. Perspectiva de implantação de um ensaio imunossorológico “*in vitro*” para avaliação do estado imunitário de bovinos em diferentes situações fisiopatológicas) Relatório Final (PIBIC/CNPq/UFRPE) 2006

FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, C.M.; KNUDSON, D.L.; BROWN, F. Classification and nomenclature of viruses. supplementum de **Archives of Virology**, New York, v.2 , p.47-298, 1991.

FREEDMAN, S.O.; GOLD, P. **Clinical Immunology**, 2 ed. EUA, 1976. p.65-77.

GARCIA, M, et al. Dosagem de lisozima para avaliação da resposta imune em bezerros. **Rev. Brás. de Ciênc. Vet.** v.12 n. 1-3. p. 66-71 jan-dez. 2005

GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. São Paulo : Varela, 1994. 123p.

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

LEHNINGER, A.L. **Princípios da Bioquímica**, 2 ed. São Paulo, Savier, 1995. p.132-234.

MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v.2, p.235-254.1965.

MARUYAMA, K.; FUKUSHIMA, T.; MOCHIZUKI, S. Cross-reactive antibodies to BVL and HTLV in bovine and humanhosts with retrovirus infection. Amsterdam. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v . 22 p. 265- 273, 1989.

MELO, L.E.H. **Avaliação da Intercorrência entre Leucose Enzoótica, Tuberculose e Leptospirose do bovinos em rebanhos produtores de leite C do Estado de São Paulo.** USP, 1999, São Paulo – Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Serological Detection of Bovine Leukemia Virus infection. **Proceedings of the 2nd CEC Seminar on Bovine Leukosis**, Copenhagen Oct. 17-18, 1975.

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

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

NICKERSON, S. C. Immune Mechanisms of the Boviner Udde: An Overview. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.187, n.1, p. 41-45, 1985.

OSSERMAN, E.F.; LAWLOR, D.P. Serum and urinary Lysozime (Muramidase) in Monocitic and Monomyelocytic Leukemia. **The Journal of Immunology**, 1966.

SHETTIGARA, P. T.; SAMAGH, B.S.; LOBINOWICH, H. M. Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel immunodifusion test. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.50, n.2, p.221-6, 1986.

STRYER, L. **Bioquímica**, 3 ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1992. 881p.

TIZARD, I.R. **Introdução à Imunologia Veterinária**, São Paulo, 6 ed. Roca, 2002. 531 p.

WEISER, R.S.; MYRVIK, Q.N.; PEARSALL, N.N. **Fundamentals of Immunology**, Philadelphia, Lea & Febiger, 1969. p.305-335.

WYERS, M. Rappel sur les oncornavirus des animaux. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.151, n.3, 1975.

ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. 4 edition, New Jersey-USA: Prentice Hall, 1999, 929 p.

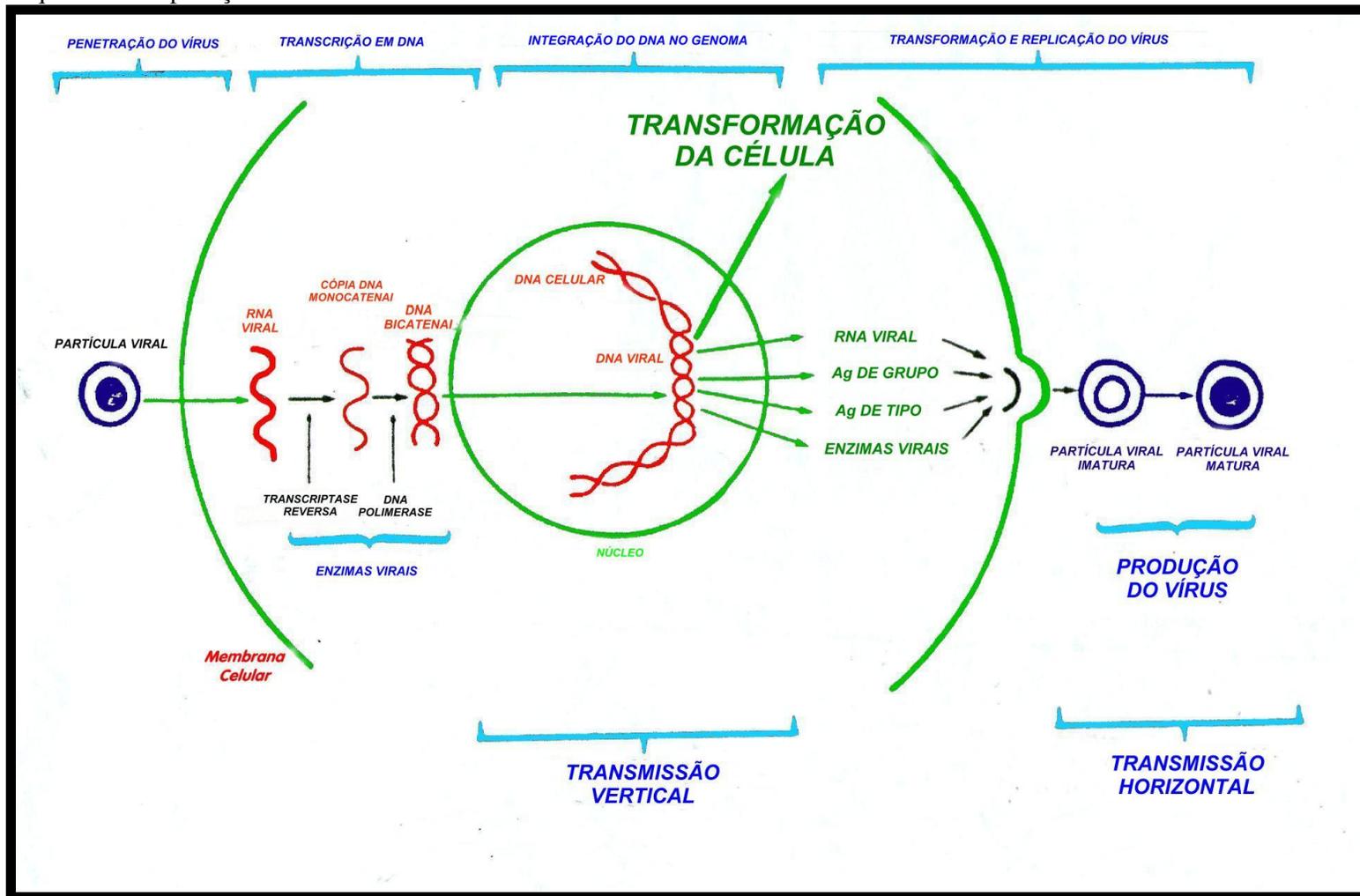
## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos demonstraram a ampla disseminação da LEB, sob a influência de fatores de risco, em conexão com a redução dos teores de lisozima nos animais VLB positivos, sugerem que os ensaios imunossorológicos realizados possibilitaram a validação de um importante parâmetro de avaliação do estado imunitário de bovinos VLB positivos, contribuindo, desta forma, para a elucidação do papel imunodepressor do Vírus da Leucose Bovina.

## **ANEXOS**

### ANEXO 1

Esquema de Replicação e transmissão de Oncovirus.



Fonte: Adaptado de Wyers, 1075; Jonhson e Kaneene, 1991.

## ANEXO 2

### 1 LEUCOSE

#### Detecção de Anticorpos Anti-VLB e Frequências de Bovinos Soropositivos e Soronegativos

As amostras de soro foram submetidas à técnica da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony (Miller e van der Maaten, 1975; Miller e van der Maaten, 1977; Birgel, 1982) para detecção de anticorpos séricos específicos anti-VLB, através de um substrato de difusão gelatinoso, utilizando o antígeno glicoproteico (gp 51), extraído do envelope do Vírus da Leucose Bovina.

#### 1.1 MATERIAL UTILIZADO:

BIOQUÍMICOS: “Kit” para teste de anticorpos para Leucose Bovina<sup>1</sup> (antígeno glicoproteico gp 51, extraído do envelope do Vírus da Leucose Bovina; diluente para antígeno; soros referências - negativo, positivo e fracamente positivo); agarose; solução salina a 8,5%.

1.1.1 EQUIPAMENTOS, VIDRARIA E OUTROS: placa de Petri com 84 mm de diâmetro; ponteiros plásticas; pipetador automático (40-200µl); agitador magnético com aquecimento controlado; balança analítica; espátula; estantes; papel absorvente; molde de perfuração de poços (rosetas); fichas de leitura; motor de compressão adaptado p/vácuo; frascos para acondicionamento do soro bovino.

#### 1.1.2 PROCEDIMENTOS

1<sup>0</sup>) Preparação do gel:

- a) Solução salina (8,5%): 85g de NaCl foram dissolvidos em um litro de água destilada;
- b) Solução de agarose a 0,9%: 9g de agarose dissolvidos em um litro da solução salina

---

<sup>1</sup> Behringwerke AG, Malburg (RFA).

- c) A mistura foi aquecida utilizando-se um agitador magnético com aquecimento controlado, até a completa dissolução da agarose, caracterizada pelo seu aspecto transparente;
- d) A mistura foi distribuída em tubos com rosca, contendo 15ml cada, deixando-se esfriar em temperatura ambiente e armazenando-os em refrigeração (2-5<sup>o</sup>C) até o momento de sua utilização.
- 2<sup>o</sup>) Montagem do sistema:
- a) Os tubos contendo agarose foram aquecidos em banho maria (100<sup>o</sup>C), com o auxílio de um bequer e um bico de bunsen, até a sua completa degeleificação (aspecto transparente);
- b) Foi colocado o conteúdo de cada tubo (15 ml da agarose a 0,9%) em uma placa de petri plástica de 84 mm de diâmetro, livres de arranhões no fundo, disposta sobre uma superfície plana, deixando resfriar em temperatura ambiente (20 a 25<sup>o</sup>C), durante uma hora, até ocorrer a geleificação;
- c) As amostras de soros a serem examinadas foram descongeladas e sua identificação foi organizada no formulário específico;
- d) Após a completa geleificação e resfriamento, o gel de agarose foi perfurado, com auxílio de um molde específico, de modo a constituir sete rosetas de sete poços de 4 mm; o gel foi removido por sucção (cânula conectada a um motor de compressão);
- e) Os quatro poços equidistantes de cada roseta foram preenchidos com soros a serem examinados;
- f) Dois poços diametralmente opostos de cada roseta foram preenchidos, com o soro padrão controle positivo e o antígeno foi depositado no poço central;
- g) As placas foram mantidas em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 48 a 72 horas.

### 1.1.3 LEITURA

Foi realizada 72 horas após a montagem do sistema, com incidência de luz artificial (lanterna) na porção inferior da placa de petri, considerando-se reagentes positivos os soros que apresentaram linha de precipitação na zona de contato antígeno-anticorpo idênticas às estabelecidas entre os poços controle e antígeno.

Obs: amostras que apresentaram reações inespecíficas ou não conclusivas foram retestadas.

## ANEXO 3

### 1 LISOZIMA

#### 1.1 Titulação da Lisozima.

A Imunodifusão Radial Simples (Fahey et al., 1964; Mancini et al., 1965; Ossermam; Lawlor, 1966; Ambrogi, 1986) foi o método utilizado, para a titulação da lisozima sérica dos bovinos. Fundamentou-se na quantificação da lisozima sérica de bovinos a partir de sua propriedade lítica frente a germes gram-positivos (*Micrococcus lysodeikticus*), medindo-se os diâmetros dos halos de lise bacteriana, os quais são proporcionais as concentrações de lisozima.

#### 1.1 MATERIAIS:

BIOQUÍMICOS: agarose a 1% (REO 15, 5g, BEHRING); fosfato salino M/15 (fosfato dibásico de sódio dihidratado -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e fosfato monobásico de potássio -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); lisozima padrão (Muramidase; mucopeptide N-acetylmuramoyl-hidrolase; EC 3.2.1.17, nº de catálogo Sigma L- 6876); cultura de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizada (Lyophilized cells, nº de catálogo Sigma M-3770, ATCC 4698); soro bovino fresco/congelado;  $\text{H}_2\text{O}$  estéril (destilada, deionizada, recentemente fervida = a.d.e.); solução fisiológica; álcool.

1.1.2 VIDRARIA: placas de Petri (vidro) de 14 cm de diâmetro; tri-perfurador de gel; balões volumétricos de 100 ml; pipetas volumétricas graduadas de 20, 2 e 1ml; béqueres de 5 ml; frascos para acondicionamento das diluições de lisozima a partir da concentração padrão; frascos para acondicionamento do soro bovino.

1.1.3 EQUIPAMENTOS E OUTROS: pipeta automática (100-20-10 $\mu\text{l}$ ); halômetro; agitador magnético com aquecimento controlado; estufa com aquecimento controlado (24-26 $^{\circ}$  C); autoclave; balança analítica; espátula; compressor; estantes; luvas cirúrgicas

estéreis; papel manteiga; papel absorvente; Parafilm<sup>®</sup>; Rolopac<sup>®</sup>; esquema de perfuração de poços; fichas de leitura; papel milimetrado.

#### 1.1.4 PROCEDIMENTOS:

1<sup>o</sup>) Pesagem do material:

- a) 1,18 g de fosfato dibásico de sódio dihidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ );
- b) 0,90 g de fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ );
- c) 0,10g (100mg) de lisozima;
- d) 0,05g do *M. lysodeikticus*;
- e) 1g de agarose (1%.)

2<sup>o</sup>) Preparação da solução tampão (pH 6,3):

- a) Foi colocado 1,18 g de fosfato dibásico de sódio dihidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )<sup>1</sup> em um balão volumétrico e completou-se até 100 ml com a.d.e.;
- b) Repetiu-se o mesmo procedimento com 0,90 g de fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )<sup>2</sup>;
- c) Em um terceiro balão volumétrico, foi colocado 22,1 ml de (1) e completou-se para 100ml (77,9 ml) com a solução (2).

Obs: objetivando aferir o pH da solução tampão, preparou-se, inicialmente, 10 ml (2,21 ml de **1** + 7,79ml de **2**); verificou-se o pH com o pHmetro, ajustando-o com o tampão 7,0 e 4,0. Como o pH aferido foi 6,3 (**6,26**) preparou-se os 100 ml da solução.

3<sup>o</sup>) Preparação da lisozima padrão (Figura 1):

- a) Preparação da “solução-mãe” (**100 $\gamma$ /ml**)
  - a.1) Primeiramente, preparou-se uma solução de 100.000 $\gamma$ /ml, dissolvendo 0,10g (100mg) em 1ml de a.d.e, utilizando um béquer de 5ml;
  - a.2) A seguir, preparou-se soluções subseqüentes de 10.000 $\gamma$ /ml (1:9), 1.000 $\gamma$ /ml (1:9) e de **100 $\gamma$ /ml** (1:9), diluindo, respectivamente, 50 $\mu$ l da primeira em 450 $\mu$ l de a.d.e., 50 $\mu$ l da segunda em 450  $\mu$ l de a.d.e. e 50 $\mu$ l da terceira em 450  $\mu$ l de a.d.e., utilizando béqueres de 5 ml;
- b) Preparação das concentrações padrões preconizadas (0,5 ml de cada, em frascos com rolha, devidamente identificados):
  - b.1) **50 $\gamma$ /ml** (1:1)<sup>(1)</sup>, diluindo 250 $\mu$ l da solução-mãe (100 $\gamma$ /ml) em 250 $\mu$ l de a.d.e.;

- b.2) **25 $\gamma$ /ml** (1:1)<sup>(2)</sup>, diluindo 250 $\mu$ l de (1) em 250 $\mu$ l de a.d.e.;
- b.3) **12,5 $\gamma$ /ml** (1:1)<sup>(3)</sup>, diluindo 250 $\mu$ l de (2) em 250 $\mu$ l de a.d.e.;
- b.4) **6 $\gamma$ /ml** (0,24 : 0,26)<sup>(4)</sup>, diluindo 240 $\mu$ l de (3) em 260 $\mu$ l de a.d.e.;
- b.5) **3 $\gamma$ /ml** (1:1)<sup>(5)</sup>, diluindo 250 $\mu$ l de (4) em 250 $\mu$ l de a.d.e.;
- b.6) **1,5 $\gamma$ /ml** (1:1), diluindo 250 $\mu$ l de (5) em 250 $\mu$ l de a.d.e..



Figura 1 - Preparação das concentrações padrões da Lisozima.

4<sup>o</sup>) Preparação da suspensão da bactéria (para cada placa):

Dissolveu-se 0,05g do *M. lysodeikticus* liofilizado em 0,5 ml de solução fisiológica, utilizando um béquer de 5 ml.

5<sup>o</sup>) Montagem do sistema:

- a) Adicionou-se 1g de agarose 1% na solução tampão (100 ml);
- b) Homogeneizou-se e aqueceu-se a mistura resultante em um agitador magnético com aquecimento controlado ( $\cong$  60-70°C) até a total dissolução da agarose (transparência da solução) (Figura 2);



Figura 2 - Mistura sendo homogenizada através do agitador magnético.

- c) Com a total dissolução da agarose, atingindo a transparência, os 100ml da solução foram distribuídos em 5 tubos de 20ml para serem acondicionados sobre refrigeração.

- d) Para a desgelificação do gel, se colocou os tubos em água fervendo por 3 minutos, posteriormente colocando-o em banho-maria com temperatura controlada a 40°C;
- e) Adicionou-se a suspensão da bactéria na agarose, deixando homogeneizar por alguns minutos;
- f) A seguir, colocou-se a mistura resultante na placa de Petri (14 cm), deixando-a em temperatura ambiente por 3-4 horas ou, preferencialmente, em refrigeração (5-6°C), envolvida com parafilme, até sua solidificação;
- g) Após a solidificação do gel, perfurou-se no mesmo 21 poços, três a três, de cerca de 4 mm de diâmetro, distando 2,5 cm um do outro, utilizando o tri-perfurador padronizado, conforme figura esquemática pré-estabelecida (Figuras 3 e 4);



Figura 3 - Perfuração do gel, utilizando-se um tri-perfurador padronizado

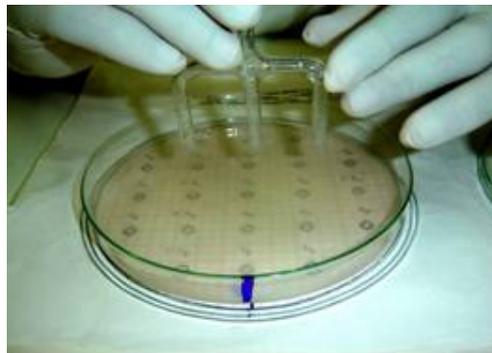


Figura 4 - Perfuração do gel, utilizando-se um tri-perfurador padronizado

- h) Retirou-se via sucção, as peças de gel que resultam da perfuração, para de fato se caracterizar os poços (Figura 5);



Figura 5 Após perfuração, o gel que fica nos poços são retirados através de um motor de sucção.

- i) Preencheu-se 12 poços, um a um, com 20 µl de lisozima padrão, fazendo duas repetições de cada concentração, a partir da maior concentração ( $L_1$  e  $L_{1.1} = 50\gamma$ ;  $L_2$  e  $L_{2.2} = 25\gamma$ ;  $L_3$  e  $L_{3.3} = 12,5\gamma$ ;  $L_4$  e  $L_{4.4} = 6\gamma$ ;  $L_5$  e  $L_{5.5} = 3\gamma$ ;  $L_6$  e  $L_{6.6} = 1,5\gamma$ ) (Figura 11);

j) Preencheu-se 9 poços, um a um, com 20 µl de soro bovino (fresco/congelado) de cada amostra a ser examinada (Figuras 6 e 7);



Figura 6 - Os 21 poços com concentração padrão respeitam uma ordem pré-determinada.

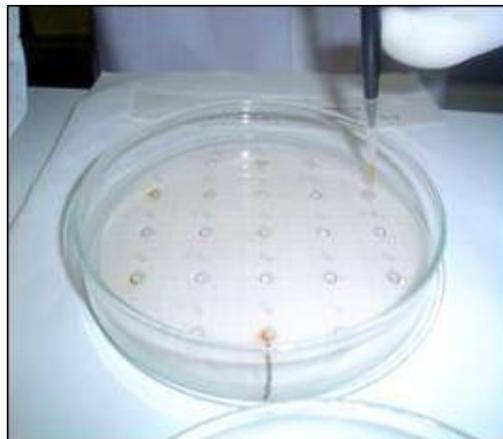


Figura 7 - Os 9 poços com soro bovino, assim como as concentrações padrões, respeitam uma ordem pré-estabelecida..

l) Incubou-se o sistema em uma estufa, a 24-26<sup>0</sup> C, por 18 horas.

### 1.1 LEITURA DOS RESULTADOS:

#### a) MEDIDA DOS HALOS

Após a incubação das seis lisoplasca, procedeu-se a leitura das mesmas no halômetro medindo, em mm, os diâmetros dos halos de lise bacteriana que circundam os poços, quer os referentes às concentrações padrões de lisozima (montagem da “curva experimental ou de calibração”) ou os referentes às amostras em exame, registrando seus valores na ficha de leitura (Figuras 8 e 9).

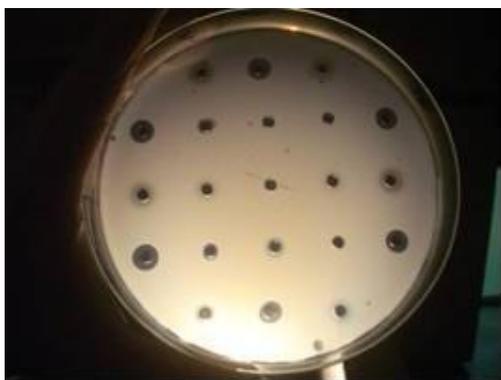


Figura 8 - Os diâmetros dos Halos correspondentes a lise bacteriana, são lidos 18 horas após aplicação da técnica.



Figura 9 - Os diâmetros dos Halos correspondentes a lise bacteriana, são lidos 18 horas após aplicação da técnica.

b) CURVA EXPERIMENTAL OU DE CALIBRAÇÃO

Em um papel semilogarítmico, montou-se o gráfico referente à curva experimental, tendo na abscissa os valores correspondentes às concentrações padrões de lisozima (1,5; 3; 6; 12,5; 25 e 50  $\gamma$ /ml) e na ordenada os valores obtidos dos diâmetros dos respectivos halos de lise bacteriana (em mm).

c) CONCENTRAÇÃO DA LISOZIMA

Inicialmente, foi estabelecida a curva experimental ou de calibração em um gráfico, em escala semilogarítmica, com base no diâmetro dos halos de lise correspondentes às diversas concentrações de lisozima padrão. Em seguida, foram estimadas as concentrações séricas de lisozima das amostras da população bovina examinada projetando-se na abscissa os valores correspondentes às concentrações de lisozima das amostras, a partir do confronto dos diâmetros dos halos de lise destas amostras (eixo da ordenada) com a curva de calibração, obtendo-se os resultados em  $\gamma$ /ml.

Na prática, uma vez montado o sistema de imunodifusão, em cada lisoplaca, lia-se os diâmetros dos halos de lise correspondentes às concentrações de lisozima padrão. Desta forma, em um gráfico, elaborado em uma escala logarítima, procedia-se o confronto dos halos formados (ordenada) pela ação lítica das correspondentes concentrações de lisozima padrão (abscissa), previamente conhecidas, que resultava em uma reta (equação de regressão). A partir dos ângulos formados, definiam-se os coeficientes linear (A) e angular (B), necessários ao cálculo da concentração de lisozima das amostras dos bovinos examinados, através da fórmula:

$$C_L = A + B \cdot Dh$$

Onde:  $C_L$  = Concentração de lisozima; A = coeficiente linear; B = coeficiente angular e Dh = diâmetro do halo.

## ANEXO 4

Anexo 4 - Diâmetros dos halos de lise bacteriana por lisoplaca, segundo as concentrações padrão de lisozima (Placas de 01 a 45). Recife – 2007.

CONCENTRAÇÕES		Diâmetros dos halos por lisoplaca (mm)																																														
Padrão	(U/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	Média (s)	
CpL <sub>1</sub>	50	10	9	12	12	12,5	12,5	12	13	12,5	13	11	10,5	13,5	12	10	11	11	11,5	11	13	12,5	12	12	12	10	9	9,5	12	10,5	9	8	8	8,5	10	13	13,5	11	10,5	11,5	12	10	10	9,5	9	12,5	11,1 (±1,5)	
CpL <sub>1.1</sub>	50	10	9	12	12	12,5	12,5	12	13	12	13	11	11	13	11	10	11	11	11,5	11	12	12	12,5	12,5	11,5	10	8,5	9	12	11	9	8,5	8	8	10,5	13	13,5	10,5	10,5	11,5	12	10	10	9,5	10	12,5	11,0 (±1,5)	
CpL <sub>2</sub>	25	9	8	11,5	11	11	12	11	11	12	11,5	10	12	12	9	9	10	9	11	10	10	10	11	11	10,5	9	7,5	6,5	8,5	8	7	7,5	8,5	8	7	8	8,5	9	9	11	11	9	9	9	9	11	9,6 (±1,5)	
CpL <sub>2.2</sub>	25	9	8	11,5	11	11	11	12	11	11,5	10	12	11	9	9	10	9	11	9,5	10	10	11	10,5	10	8	7,5	7	9	8,5	7,5	7	8	8	7	8	8,5	10	9	11	11	9	9	8	9	11	9,6 (±1,4)		
CpL <sub>3</sub>	12,5	8	8	11	10,5	10	10	10,5	11	10	10	10	11	10	8,5	9	9	8,5	10	9	10	9	10	9,5	10	8	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	8	12	9	8	10	10	8	8,5	10	8	8	8,9 (±1,5)
CpL <sub>3.3</sub>	12,5	8	8	11	10	10,5	10,5	10,5	11	11	10	10	10,5	10	8,5	8	9	8,5	10	9,5	10	9	10	10	10	10	6	6	6	7	7	7,5	6	6	6,5	7	7,5	11,5	9,5	8	10	10	8	8	8,5	8	8	8,8 (±1,6)
CpL <sub>4</sub>	6	7	7	10	10	10	10	9,5	10,5	10	9,5	9	10	9	8	8	9	8	9	8,5	9	9	9	8,5	9	7	7	7,5	8	8	7,5	7	7	7	7	6,5	7	7,5	6,5	8	9	9	7	7,5	7	7	9	8,3 (±1,2)
CpL <sub>4.4</sub>	6	7	6	10	9,5	10	10	9,5	10	10	10	8,5	10	9	8	8	9	8	9	8,5	9	8,5	9	9	8,5	7	7	7	8	8	7,5	7	7	7,5	7	7	7,5	8,5	8	9	9	7	7,5	6,5	7	9	8,3 (±1,1)	
CpL <sub>5</sub>	3	5	5	9,5	9	9	9	9	9	9,5	8,5	7	8	6	7,5	7,5	8	7	8	7,5	8	7	7,5	7,5	8	7	7	6	7	7	7	6,5	6,5	7	6,5	7	7	7,5	7	7	7	6,5	6,5	6	6,5	6,5	7	7,3 (±1,1)
CpL <sub>5.5</sub>	3	5	5	9	9	9	9	9	9		8,5	7	7,5	6	7,5	7,5	8	7,5	8	7,5	8	7,5	8	7,5	8	6	7	6,5	7	7,5	7	6,5	6	6	6,5	6,5	7	7	7,5	6,5	6,5	6	6	6	6,5	6,5	7	7,3 (±1,0)
CpL <sub>6</sub>	1,5	5	5	8,5	8,5	8	8	8	8	8	7,5	6,5	8	8	7,5	7	7	7	7,5	7	7,5	7	7	7,5	8	7	6,5	6	7	7	6,5	6	6	6,5	5,5	7	6,5	6,5	6,5	6,5	6	6	6	5,5	6	6,5	6,9 (±0,9)	
CpL <sub>6.6</sub>	1,5	5	5	8,5	8,5	8	8	8	8	7,5	7,5	6,5	8	8	7,5	7	7,5	7	7	7,5	7	7	7,5	8	6	7	6	6,5	7	6,5	6,5	6	6,5	6	6	7	6	6	7	6,5	7	6	6	5,5	6	6,5	6,9 (±0,9)	