

LUIZ CARLOS FONTES BAPTISTA FILHO

**ANÁLISE LEUCOMÉTRICA EM BOVINOS TUBERCULINIZADOS E
SUA APLICAÇÃO NO MONITORAMENTO DA LEUCOSE
ENZOÓTICA EM REBANHOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

RECIFE

2012

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

LUIZ CARLOS FONTES BAPTISTA FILHO

**ANÁLISE LEUCOMÉTRICA EM BOVINOS TUBERCULINIZADOS E
SUA APLICAÇÃO NO MONITORAMENTO DA LEUCOSE
ENZOÓTICA EM REBANHOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Dissertação 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 grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:
Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo

RECIFE

2012

Ficha Catalográfica

B222a Baptista Filho, Luiz Carlos Fontes
 Análise leucométrica em bovinos tuberculizados e
 sua aplicação no monitoramento da leucose enzoótica em
 rebanhos do Estado de Pernambuco / Luiz Carlos Fontes
 Baptista Filho. – 2012.
 61 p. : il.

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

 1. Leucometria 2. Bovino – Doenças 3. Epidemiologia
 4. Doenças transmissíveis em animais I. Melo, Lúcio
 Esmeraldo Honório de, orientador II. Título

CDD 636.2

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por dar forças para superar todas as dificuldades e por me colocar nos caminhos da ciência.

À minha família, em especial meus pais, Luiz Carlos Fontes Baptista e Maria do Rosário de F. de Albuquerque Baptista por todo apoio e preocupação durante toda minha escalada acadêmica.

À minha amada esposa, razão da minha vida, Susilene Nunes Vieira Baptista, ou simplesmente Suzy, por toda compreensão, paciência, ajuda, carinho e suporte emocional em meio a tantas noites em claro, viagens e momentos de folga sacrificados em nome da ciência.

Ao professor Lúcio, meu orientador, pela chance que me foi dada e confiança depositada desde minha matrícula no programa até minha defesa, lutando por nós, sacrificando horários, feriados, fins-de-semana e férias para nos ajudar! (Ainda daremos algum trabalho, viu...)

Às minhas grandes amizades iniciadas e consolidadas durante o mestrado, em especial Artur, Tamyres e Roniery. Tenho certeza que amigos para o resto da vida!

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, minha casa, onde iniciei a mais de 10 anos uma jornada de muitos conhecimentos, felicidades e claro, algumas poucas decepções.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária e seus professores pelos conhecimentos passados e oportunidade de aprender com profissionais tão competentes.

Aos nossos estagiários, que muito ajudaram em nossas pesquisas.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudo.

RESUMO

Leucose Enzoótica (LEB) e Tuberculose bovina (TB) comprometem o estado imunitário dos rebanhos, especialmente pelo potencial imunodepressor do Vírus da Leucose Bovina (VLB). Inúmeros fatores interferem nos valores leucométricos dos bovinos, porém, pouco se sabe dos efeitos da TB sobre os mesmos. O objetivo com o estudo foi avaliar o leucograma de bovinos tuberculizados, com vista ao uso da leucometria como ferramenta epidemiológica no combate à LEB em rebanhos leiteiros de Pernambuco. Amostras séricas de 1.000 bovinos procedentes de 33 rebanhos de diversos municípios do estado foram submetidas ao sorodiagnóstico da LEB (IDGA), sendo 920 bovinos previamente tuberculinizados pela técnica simultânea comparada (TSC). Esfregaços sanguíneos foram confeccionados de todos os bovinos tuberculinizados, sendo a contagem total e diferencial dos leucócitos realizada usando técnicas convencionais. A avaliação da influência da TB no leucograma foi realizada pelo confronto dos resultados de quatro grupos experimentais, em função dos resultados da IDGA e TSC (grupo gTB - 41 positivos ao TSC; grupo gLEB - 151 positivos à IDGA; grupo gNEG - 379 negativos ao TSC e IDGA; grupo gINT - 43 positivos a ambos os testes). As taxas de prevalência da TB e da LEB foram, respectivamente, 11% (99/920) e 28% (282/1000), com 88% (29/33) dos rebanhos contribuindo com ao menos um animal positivo para um ou ambos os testes. Dos 920 bovinos examinados, 43 (4,7%) apresentaram positividade simultânea a ambos os testes. Os valores médios dos leucócitos e linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$ de sangue) dos grupos experimentais foram, respectivamente: gTB $9,6 \pm 2,5$ e $5,9 \pm 1,9$; gLEB $13,3 \pm 6,3$ e $9,1 \pm 6,0$; gNEG $11,5 \pm 3,8$ e $7,6 \pm 5,1$; e gINT $11,8 \pm 4,3$ e $8,0 \pm 3,5$. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os leucócitos e linfócitos, quando confrontados os grupos gTB (valores menores) e gLEB (valores maiores) com o grupo gNEG, enquanto o grupo gINT não diferiu ($p > 0,05$) em nenhum dos parâmetros analisados em relação ao grupo gNEG. Conclui-se que o leucograma dos bovinos sofre influência da TB, devendo programas sanitários de combate à LEB em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco e que incluam a leucometria como ferramenta epidemiológica estratégica preconizar a prévia tuberculinização dos rebanhos envolvidos, sendo descartados os bovinos que apresentarem positividade ao teste imunoalérgico.

Palavras-chave: Leucometria; Leucose Enzoótica dos Bovinos, Tuberculose Bovina.

ABSTRACT

Enzootic Leukosis (EBL) and Bovine Tuberculosis (BT) compromise the immune status of the herds, especially the immunosuppressive potential of bovine leukosis virus (BLV). Several factors interfere with leukocyte values of cattle, but little is known about the effects of BT on them. The aim with the study was to evaluate the leukogram of tuberculinized cattle, with a view to the use of leukocytes as an epidemiologic tool in combating EBL in dairy herds of Pernambuco. 1.000 serum samples from 33 herds of cattle coming from various municipalities in the state were submitted to the serodiagnosis of EBL (AGID), being 920 cattle previously tuberculinized by the simultaneously comparative technique (SCT). Blood smears were prepared of all tuberculinized cattle, and the total and differential leukocyte count was performed using conventional techniques. The evaluation of the influence of BT in leukocyte counts was performed by comparing the results of four experimental groups, according to the results of the AGID and SCT (gTB group - 41 to the positive SCT; group gLEB - the 151 AGID positive, group gNEG - 379 to the negative TSC and AGID, group gINT - 43 positive to both tests). The prevalence rates of TB and LEB were, respectively, 11% (99/920) and 28% (282/1000), with 88% (29/33) of herds contributing at least one animal positive for one or both tests. From the 920 cattle examined, 43 (4,7%) were positive to both tests simultaneously. The mean values of leukocytes and lymphocytes ($\times 10^3/\text{mm}^3$ of blood) of the experimental groups were, respectively: gTB $9,6 \pm 2,5$ and $5,9 \pm 1,9$; gLEB $13,3 \pm 6,3$ and $9,1 \pm 6,0$; gNEG $11,5 \pm 3,8$ and $7,6 \pm 5,1$; and gINT $11,8 \pm 4,3$ and $8,0 \pm 3,5$. There were significant differences ($p < 0,05$) between leukocytes and lymphocytes, when confronted gTB group (lower values) and gLEB (higher values) with the gNEG group, while gINT group did not differ ($p > 0,05$) in none of the parameters analyzed in relation to the group gNEG. It is concluded that the leukogram is influenced by bovine BT, and health programs to combat LEB in dairy herds in the state of Pernambuco, and include the white blood cell count as an epidemiologic tool wish to consider the strategic prior tuberculin test the herds involved, being discarded cattle that are experiencing imunoalergic test positivity.

Keywords: Leukocyte Count; Enzootic Bovine Leukosis, Bovine Tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	16
Figura 2	42

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Chave leucométrica de Bendixen (adaptado de Flores <i>et al.</i> , 1990).	22
Tabela 2	Interpretação dos resultados da cutimetria do teste simultâneo comparado. Recife, 2012.	29
Tabela 3	Resultados ao TSC no exame dos bovinos para diagnóstico da tuberculose, distribuídos em função dos rebanhos e municípios do estado de Pernambuco. Recife, 2012.	34
Tabela 4	Resultados à IDGA no exame dos bovinos para o diagnóstico da Leucose Enzoótica dos Bovinos, distribuídos em função dos rebanhos e municípios do estado de Pernambuco. Recife, 2012.	35
Tabela 5	Valores dos leucócitos dos bovinos examinados, distribuídos em função dos tipos celulares e analisados pelo confronto dos grupos experimentais gTB e gNEG. Recife, 2012.	36
Tabela 6	Valores dos leucócitos dos bovinos examinados, distribuídos em função dos tipos celulares e analisados pelo confronto dos grupos experimentais gLEB e gNEG. Recife, 2012.	38
Tabela 7	Valores dos leucócitos dos bovinos examinados, distribuídos em função dos tipos celulares e analisados pelo confronto dos grupos experimentais gINT e gNEG. Recife, 2012.	40

LISTA DE SÍMBOLOS

Δ – delta.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- μL – microlitros;
- AC – área contada;
- D – diluição;
- DNA – ácido desoxirribonucleico;
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético;
- ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay;
- gINT – grupo composto por animais positivos à tuberculinização e IDGA;
- gLEB – grupo composto por animais positivos à IDGA;
- gNEG - grupo composto por animais negativos à tuberculinização e IDGA;
- gp – glicoproteína;
- gTB – grupo composto por animais positivos à tuberculinização;
- IDGA – imunodifusão em gel de ágar;
- IgM – imunoglobulina M;
- LEB – Leucose Enzoótica dos Bovinos;
- MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastacimento;
- MB – *Mycobacterium bovis*;
- mL – mililitros;
- mm^3 – milímetros cúbicos;
- OIE - World Organization for Animal Health;
- PC – profundidade da câmara;
- PCR – reação da polimerase em cadeia;
- PNCEBT - Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose da Tuberculose Animal;
- PPD – proteína purificada derivada;
- R1, R2, R3... – rebanho 1, rebanho 2, rebanho 3...;
- RNA – ácido ribonucleico;
- SPSS - Statistical package for the social sciences;
- TB – Tuberculose Bovina;
- TSC – teste simultâneo comparativo;
- UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco;
- VLB – Vírus da Leucose Bovina;
- VLTH – vírus linfotrópicos de células T Humanas.

SUMÁRIO

	Pág.
1. Introdução	12
2. Revisão de literatura	14
2.1 Tuberculose bovina	14
2.2 Leucose enzoótica dos bovinos	20
3. Metodologia	28
3.1 Amostragem	28
3.2 Teste simultâneo comparativo (TSC) para diagnóstico da tuberculose bovina	28
3.3 Sorodiagnóstico da Leucose Enzoótica dos Bovinos	29
3.4 Análises leucométricas	29
3.5 Formação dos grupos experimentais	30
3.6 Análise estatística	31
4. Resultados e discussão	32
4.1 Relacionados à TB e à LEB	32
4.2 Relacionados às análises leucométricas	36
5. Considerações finais	41
6. Conclusão	43
7. Referências bibliográficas	44

1 Introdução

A Tuberculose Bovina (TB) é uma doença transmissível, de caráter zoonótico e causada pelo *Mycobacterium bovis* (MB), sendo caracterizada pela evolução crônica e desenvolvimento progressivo de lesões nodulares (tubérculos) em diversos órgãos ou tecidos (ROSENBERGER, 1983; CORRÊA e CORRÊA, 1992; ROXO, 1996; COSIVE *et al.*, 1998; RADOSTITS *et al.*, 2002).

A doença é um grave problema nos rebanhos leiteiros dos países em desenvolvimento, especialmente quando as criações são submetidas a um manejo mais intensivo e falho em seus aspectos sanitários, condições estas que acarretam queda na produtividade e condenação de carcaças em matadouros, gerando, em decorrência disso, expressivos prejuízos econômicos aos produtores (ROSENBERGER, 1983; LORENZ e STRAUB, 1987; COSIVE *et al.*, 1998; RADOSTITS *et al.*, 2002).

Embora existam alguns trabalhos direcionados à dinâmica leucocitária de bovinos positivos à tuberculinização (JAVED *et al.*, 2010; SHETTAR *et al.*, 2011) e a despeito da possibilidade de ocorrência de agravos secundários ao sistema imune pela natureza crônica e debilitante da doença, pouco se sabe dos efeitos da infecção pelo MB sobre o leucograma de bovinos. Grande parte dos estudos imunocitológicos norteia para a diferenciação linfocitária, produção de anticorpos e titulação de citocinas (POLLOCK *et al.*, 2005; POLLOCK *et al.*, 2006; BLANCO *et al.*, 2011).

Em conexão, admite-se que a Leucose Enzoótica Bovina (LEB) seja um fator de risco da ocorrência da TB e a intercorrência entre as duas doenças nos rebanhos leiteiros, como a registrada em diferentes situações (MELO, 1999; MELO *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2011), demanda atenção de pesquisadores e autoridades sanitárias.

A coexistência dessas infecções compromete o estado imunitário dos bovinos, especialmente pelo potencial imunodepressor da infecção pelo Vírus da Leucose Bovina (VLB) (BURNY e MAMMERICKX, 1987; AZEDO, 2007; AZEDO *et al.*, 2008 e 2011), cuja principal característica refere-se às alterações imunocitológicas observadas nos bovinos VLB positivos, designada leucocitose por linfocitose persistente e observada em aproximadamente um terço dos animais acometidos (FERRER, 1979; WEISS e WARDROP,

2010). Esta resposta linfoproliferativa do organismo é conhecida desde os primórdios do século passado (KNUTH e VOLKMANN, 1916), ocasião em que foi usada como procedimento para eliminação de bovinos enfermos dos rebanhos da Alemanha antes mesmo de se conhecer a natureza viral da doença.

Neste contexto, sabe-se que inúmeros fatores interferem nos valores leucométricos dos bovinos, como o desenvolvimento etário, o padrão racial e as condições edafoclimáticas (COLES, 1984; BIRGEL JUNIOR, 1991; MELO, 1991; RADOSTITS *et al.*, 2002; MENDES *et al.*, 2011), bem como a infecção pelo VLB (FERRER, 1979; MELO, 1991; MENDES, 2002; WEISS e WARDROP, 2010), entretanto não se tem o mesmo conhecimento em relação à TB.

Mediante o exposto e considerando a possibilidade de uma doença ocorrer no decurso da outra, o objetivo com a realização deste estudo foi avaliar o leucograma de bovinos submetidos ao teste da tuberculina, com vista ao uso da leucometria como ferramenta epidemiológica no monitoramento da LEB em rebanhos do estado de Pernambuco.

2 Revisão de literatura

2.1 Tuberculose bovina

A tuberculose é causada por bacilos pertencentes à ordem *Actinomycetales* e ao gênero *Mycobacterium*, com suas espécies de maior importância na saúde pública agrupadas no “Complexo *Mycobacterium tuberculosis*”, sendo composto pelas espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum* (KANTOR *et al.*, 2008).

É uma enfermidade de distribuição cosmopolita, concentrando-se principalmente nos países em desenvolvimento, onde acomete praticamente todas as espécies, inclusive humana, sendo os bovinos, caprinos e suínos mais susceptíveis do que ovinos e equinos, que demonstram alta resistência natural (ROSENBERGER, 1983; COSIVE *et al.*, 1998; RADOSTITS *et al.*, 2002), sendo registrada, também, em búfalos (PORTUGAL *et al.*, 1971; GARINE-WICHATITSKY *et al.*, 2010; JAVED *et al.*, 2010) e cães (MOTA *et al.*, 1997).

A tuberculose bovina (TB) é uma micobacteriose oportunista causada principalmente pelo *Mycobacterium bovis* (MB), e com menor frequência pelo *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium tuberculosis* (BEER, 1988; JONES *et al.*, 2000; RADOSTITS *et al.*, 2002).

A TB caracteriza-se clinicamente como de evolução crônica, com os acometidos manifestando emagrecimento progressivo, proliferações nodulares granulomatosas (em forma de “tubérculos”), com aumento de volume de linfonodos por todo o corpo, podendo haver comprometimento de órgãos como pulmão, fígado, intestino, baço e peritônio. Entre os bovinos é comum a presença de portadores inaparentes de infecções com três a seis semanas desde o contato inicial com o MB (FRANCIS *et al.*, 1978; ROSENBERGER, 1983; CORRÊA e CORRÊA, 1992; ROXO, 1996; COSIVE *et al.*, 1998; RADOSTITS *et al.*, 2002).

Inicialmente a doença não altera o estado geral e nutricional do bovino. Com o avanço da enfermidade, ocorrem hipertermias moderadas que duram dias ou semanas, e a presença de tosse frequente e dolorosa (dispnéica) (WIESNER, 1973; RADOSTITS *et al.*, 2002).

A doença é mais frequente nos rebanhos leiteiros, que usualmente estão submetidos a manejo intensivo ou semi-intensivo, principalmente quando falho em seus aspectos sanitários,

estabelecendo prejuízos econômicos pela queda na produtividade e condenação de carcaças em matadouros (ROSENBERGER, 1983; LORENZ e STRAUB, 1987; RADOSTITS *et al.*, 2002).

A resposta imune ao MB é bastante variável, pois depende de fatores como as peculiaridades do sistema imunológico do hospedeiro, virulência do patógeno e idade (POLLOCK e NEILL, 2002).

A primeira célula do sistema imunológico a interagir com o MB são os macrófagos. Porém tais células possuem papel dicotômico na infecção. Se por um lado, são importantes no efetivo combate ao patógeno, por outro são as células alvo preferidas pelo MB para serem albergados. A debelação ou não da infecção depende de complexas interações entre os macrófagos e o patógeno (POLLOCK e NEILL, 2002).

Em humanos, as células NK (*Natural Killers*) parecem ter importante papel na resposta inicial às micobactérias, pois essas células são capazes de produzir Interferón-gama e podem ser citolíticas com células infectadas pelo MB (YONEDA e ELLNER, 1998).

Apesar de não se saber exatamente a função dos neutrófilos na infecção pelo MB em bovinos, é conhecida sua participação na formação dos granulomas e até mesmo sua capacidade de eliminar o *Mycobacterium tuberculosis* em humanos (BROWN *et al.*, 1987). Caso a micobactéria se evada de tais mecanismos citados, e estabeleça-se no interior de macrófagos, este inicia o processamento e secreção de antígenos, apresentando-os aos linfócitos T (POLLOCK e NEILL, 2002).

Esta interação macrófago - linfócito T é o marco inicial da resposta imune adquirida, onde linfócitos T irão iniciar a expansão policlonal e diferenciação, criando assim a “memória imunológica” (POLLOCK e NEILL, 2002).

Os linfócitos T atuam principalmente na produção de citocinas, como o Interferón-gama, que age na ativação de macrófagos e na proteção contra as micobactérias (DENIS, 1991). Os linfócitos T possuem também a habilidade de lisar macrófagos infectados por micobactérias (LIÉBANA *et al.*, 2000).

Com o avançar da doença, os linfócitos B ganham destaque, com a produção de anticorpos, que apesar de ignorada importância por muito tempo, já se admite importância na proteção conferida por eles (GLATMAN-FREEDMAN e CASDEVALL, 1998). Outro aspecto importante da produção de anticorpos é o aspecto diagnóstico, visto que com a evolução da tuberculose, a resposta mediada por células tende a se tornar indetectável por meio do teste da tuberculina, a detecção de anticorpos tem sido importante nesses casos

(JEON *et al.*, 2010). Um esquema ilustrando as fases da resposta celular e humoral está representado na figura 1.

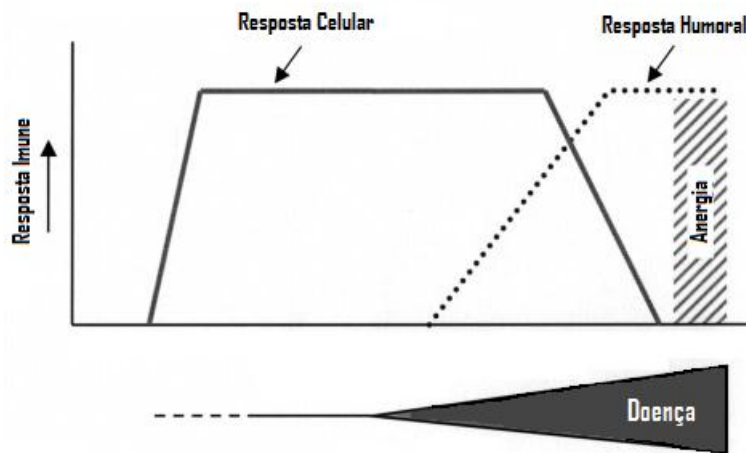


Figura 1. Diagrama representativo de acordo com a progressão da tuberculose bovina (da esquerda para a direita) (adaptado de POLLOCK e NEILL, 2002).

É desconhecido que o MB seja capaz de provocar algum prejuízo direto à produção leucocitária nos bovinos infectados. Porém, por se tratar de uma doença crônica e debilitante em bovinos (FRANCIS *et al.*, 1978; ROSENBERGER, 1983; LORENZ e STRAUB, 1987; RADOSTITS *et al.*, 2002), é quase inevitável a ocorrência de danos secundários ao sistema imune.

São escassos os estudos sobre a tuberculose especificamente dirigidos para alterações leucocitárias na espécie bovina. Em estudo realizado no Paquistão, Javed *et al.* (2010) estudaram as diferenças em hemogramas de bovinos, caprinos, ovinos e bubalinos positivos e negativos ao teste da tuberculina. No leucograma, os bovinos positivos apresentaram menor número de neutrófilos e maior de linfócitos do que os animais negativos, possuindo ambos os grupos, número de leucócitos totais semelhantes.

Na Índia, em estudo recentemente realizado para avaliar parâmetros hematimétricos e bioquímicos de bovinos positivos ao teste tuberculínico em relação aos negativos, o número de leucócitos e linfócitos apresentaram-se em menor número nos animais positivos, apesar de estatisticamente insignificante. No entanto, os indivíduos com lesões típicas de tuberculose apresentaram grande variação na contagem de linfócitos, com 47% (7/15) dos bovinos positivos com linfopenia, e 33% (5/15) com linfocitose. Ou seja, apenas três animais (20%)

positivos possuíam valores de linfócitos considerados dentro da normalidade. Os positivos possuíam também um menor número de neutrófilos, enquanto os monócitos apareceram em maior número (SHETTAR *et al.*, 2011).

O que se espera de mudanças no leucograma de animais doentes, além das inerentes à resposta contra o MB, são àquelas ocasionadas pela TB se tratar de uma doença crônica e debilitante (MORRIS e LARGE, 1990; SILVA *et al.*, 2008).

O estresse causado por doenças crônicas, como a TB, provoca a liberação de corticosteroides endógenos (SILVA *et al.*, 2008). O leucograma de bovinos sob influência de tais esteroides, endógenos ou exógenos, sofre uma resposta mais imprevisível do que em espécies como a canina e felina (MEYER *et al.*, 1995). A resposta leucocitária em bovinos estressados é classicamente caracterizada por neutrofilia, linfopenia e eosinopenia (SILVA *et al.*, 2008).

Embora muitos países ainda não possuam registros regulares, pode-se dizer que a doença concentra-se mais nos países em desenvolvimento, sendo encontrada em diferentes níveis de prevalência na África, Ásia, América Latina e países do Caribe (COSIVE *et al.*, 1998).

A situação da Tuberculose no Brasil não se encontra bem delineada, semelhantemente a outros países em desenvolvimento, pois os estudos são escassos e não sistematizados (FAO, 1993).

As prevalências da TB estabelecidas para o Brasil são de 3,3% (26.698/810.317) e 1,2% (44.256/3.798.893), segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1994), através de demonstrativos epidemiológicos, para os períodos de 1967 a 1976 e de 1980 a 1992, respectivamente.

Já em Pernambuco, a prevalência da doença divulgada pelo MAPA foi de 5,7% (993/17.248) (BRASIL, 2006). Bem inferiores aos valores encontrados em estudos realizados por Mendes *et al.* (2008) e por Melo *et al.* (2010), nos quais as prevalências foram de 15,2% (84/554) e 11,5% (91/794), respectivamente.

O diagnóstico da TB é estabelecido pelo exame clínico dos animais, coadunando-se parâmetros da anamnese (histórico do caso) e físicos (sinais) com exames complementares, que incluem os testes tuberculínicos e os exames anatomopatológicos (*post mortem* e

histopatológicos) e bacteriológicos, bem como pela interpretação dos achados epidemiológicos (OPAS, 1962; DIRKSEN *et al.*, 1993).

Técnicas menos laboriosas para a identificação precoce de bovinos infectados vem sendo estudadas, com destaques para a reação da polimerase em cadeia (PCR) (WARDS *et al.*, 1995; DE PAULA JÚNIOR *et al.*, 2011), o ensaio imunoenzimático (ELISA) (DE ANDA *et al.*, 1996; GOFF *et al.*, 1996; JEON *et al.*, 2010) e o ensaio de interferón-gama (CEPANZO, 1988; RIET-CORREA e GARCIA, 2001). Existem outras técnicas como a fixação do complemento, imunofluorescência, aglutinação bacteriana direta, precipitina e testes de hemaglutinação, porém estes possuem menor valor para a rotina (BIER, 1984; DOMINGO *et al.*, 1995; WHIPPLE *et al.* 1995; RADOSTITS *et al.*, 2002).

Apesar dos avanços alcançados com o uso de técnicas diagnósticas alternativas, os testes tuberculínicos têm sido base de praticamente todos os programas sanitários voltados à identificação nos rebanhos de bovinos com prováveis infecções incipientes, pela hipersensibilidade que apresentam três a seis semanas após a infecção com o bacilo da tuberculose, caracterizadas por uma resposta orgânica ou reação imunoalérgica do tipo celular mediada por linfócitos e macrófagos (FRANCIS *et al.*, 1978; MONAGHAN *et al.*, 1997). Esse estado de hipersensibilidade tardia dos bovinos, previamente expostos ao bacilo da tuberculose, às tuberculinas bovina e aviária pode ser detectável clinicamente pelo aumento de volume, frequentemente doloroso, no local da aplicação das tuberculinas (ROSENBERGER, 1983; LANGENEGGER e HERRMANN, 1994; RADOSTITS *et al.*, 2002).

As técnicas de tuberculinização mais difundidas no Brasil, preconizadas pelo MAPA (BRASIL, 2006), pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 1968) e Centro Panamericano de Zoonoses (CEPANZO, 1988) são a intradérmica simples (caudal e cervical), com o uso exclusivo da Proteína Purificada Derivada (PPD) bovina, para fins de triagem do rebanho, e a intradérmica simultânea, com o emprego das PPDs bovina e aviária, para a detecção de reações inespecíficas, possuindo especificidade entre 92% e 99% e sensibilidade entre 72% e 78% (FRANCIS *et al.*, 1978; OMS, 1992).

Reações inespecíficas ocorrem devido a possível interferência de micobactérias atípicas (MONAGHAN *et al.*, 1997), como *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*, presentes

particularmente na região Sudeste do Brasil (CASTRO e NEMOTO, 1972; LANGENEGGER e LANGENEGGER, 1976; LANGENEGGER *et al.*, 1981).

A política brasileira de controle e erradicação da TB é regida pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose e Brucelose Bovina (PNCETB), que foi escrito no ano de 2001 e revisado em 2004. O programa é baseado no abate de todos os animais considerados positivos ao teste imunológico, não sendo permitido o tratamento desses animais (BRASIL, 2006).

Anergia às tuberculinas em bovinos, aspecto importante no estudo da epidemiologia da tuberculose, tem sido motivo de investigações. Admite-se que infecção muito precoce (LEGG e MAUNDER, 1941), doença em estágio muito avançado, caracterizado por lesões em fase de cura ou alterações imunopatológicas (KLEEBERG, 1960), estresse associado ao parto, infecção intercorrente, desnutrição, exaustão e transporte (LEGG e MAUNDER, 1940a, b; MAUNDER, 1948) podem reduzir o grau de reatividade dos testes tuberculínicos e, conseqüentemente, possibilitar aparecimento de falso-negativos em alguns rebanhos. Sendo assim, é crescente a ideia de que um único método diagnóstico é incapaz de detectar todos os animais tuberculosos, sendo necessária a utilização de algumas ferramentas simultaneamente (SALFINGER e PFYFFER, 1994; MEDEIROS *et al.*, 2010).

Por ser uma importante zoonose, a TB ganha dimensão destacada na saúde pública (MICHEL *et al.*, 2010). A Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta para a perspectiva de que entre os anos 2000 e 2020, um bilhão de pessoas estarão infectadas, e 1/5 destas adoecerão, com 35 milhões indo a óbito, principalmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2011). Destes casos, uma proporção potencialmente importante ocorrerá devido ao MB, na chamada Tuberculose Zoonótica, entidade clínica incluída no grupo das doenças infecciosas emergentes (COSIVE *et al.*, 1998).

Apesar da reconhecida capacidade de transmissão do MB para o humano (ABRAHÃO, 1998; KANTOR *et al.*, 2008; LOBUE *et al.*, 2010) e da possibilidade da transmissão do *M. tuberculosis*, agente da tuberculose em humanos, do bovino ao humano, mesmo que não existam relatos de tal transmissão (O'REILLY e DABORN, 1995), a origem da doença em humanos através do contato com animais infectados ainda são negligenciadas em inquéritos epidemiológicos (THOEN *et al.*, 2010; TALARICO *et al.*, 2011).

A tuberculose zoonótica é transmissível do gado para humanos ou vice-versa, diretamente pela via aerógena, mediante a inalação do *Mycobacterium* suspenso no ar, e indiretamente, pelo consumo de leite e de produtos lácteos não fervidos ou pasteurizados (WHO, 1993; GRANGE e YATES, 1994). Assim, materiais biológicos como o produto de tosse, espirro e expectoração, corrimento nasal, leite, urina, fezes, secreções vaginais e uterinas, são considerados potentes meios de contaminação entre homens, animais, e entre homens e animais. Nesse contexto, os principais grupos de risco são os tratadores de animais, funcionários de matadouros ou laticínios, e indivíduos que mantêm o hábito de consumir leite in natura ou derivados lácteos que não sofreram prévio tratamento térmico (SOUZA *et al.*, 2002). Desta forma, instala-se o ciclo zoonótico mediante a estreita relação entre homens e animais (FERNANDES, 2002; MELO *et al.*, 2004).

2.2 Leucose enzoótica bovina

Originária da Europa, a LEB é uma doença insidiosa, de natureza infectocontagiosa e de evolução crônica, cosmopolita, causada por um Deltarretrovírus exógeno linfotrópico B, que compromete primariamente o sistema linfóide do bovino infectado, determinando processos desorganizativos dos seus tecidos e órgãos, especialmente linfonodos, que perdem as características primárias e vão sendo progressivamente substituídos por um novo tecido, de natureza neoplásica, formador de linfossarcomas, podendo haver ou não leucemização (International Committee on Bovine Leucosis, 1968; STÖBER, 1970; FRANCKI *et al.*, 1991; MELO, 1991; MURPHY, 1999; JAIN, 1993; LEITE *et al.*, 2001).

A LEB é registrada nos cinco continentes do mundo, em países da Europa, Ásia, África, Oceania e Américas Central, Norte e Sul (OLSON e MILLER, 1987; CASTRO *et al.*, 1988; MATSUMURA *et al.*, 2011). Sua notificação obrigatória é prevista no Código Zoosanitário Internacional, sendo reconhecida pela OIE (2011) como “uma importante enfermidade transmissível, do ponto de vista socioeconômico e/ou sanitário, cujas repercussões no comércio internacional de animais e produtos de origem animal são consideráveis”.

Estudos citogenéticos e imunossorológicos, que demonstraram haver uma sequência nuclear homóloga entre o VLB e vírus linfotrópicos T humanos, além de ocorrerem reações cruzadas de anticorpos entre soros de bovinos e humanos infectados (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”), espécie Vírus da Leucemia Bovina (FRANCKI *et al.*, 1991), designado mais apropriadamente de Vírus da Leucose Bovina (VLB).

O primeiro caso clínico da LEB foi reportado por Leisering, em 1861, ao descrever nódulos neoplásicos de origem linfóide no baço de uma vaca (STÖBER, 1970; OLSON e MILLER, 1987). A seguir, difundiu-se para outros continentes pela exportação de animais europeus infectados (OLSON e MILLER, 1987; CASTRO *et al.*, 1988).

A etiologia viral da LEB foi definitivamente estabelecida por Miller e Olson (1972), que isolaram o vírus em cultura de linfócitos bovinos com sintomas aparentes ou não da doença, determinando, através da microscopia eletrônica, a presença de partículas virais.

A ocorrência da LEB é determinada, com segurança, quando há registro no histórico do indivíduo ou de seu rebanho de origem da coexistência dos aspectos nosológicos (expressão clínica da doença), hematológico (ocorrência de leucocitose por linfocitose, associada à atipias destas células) e imunológico (detecção sorológica de anticorpos anti-VLB). Essas foram as configurações apresentadas por vários pesquisadores, como sendo necessárias para a afirmação da ocorrência da Leucose Enzoótica dos Bovinos em um indivíduo ou no rebanho (GÖTZE *et al.*; 1954; ROSENBERGER, 1961 e 1968; MAMMERICKX *et al.*, 1976; RESSANG *et al.*, 1976).

Diferentemente do que ocorre na TB, o VLB atua desarranjando diretamente o sistema imunológico dos animais infectados, provocando alterações imunocitológicas que variam desde uma linfocitose persistente (MENDES, 2002; WEISS e WARDROP, 2010), atipias linfocitárias (SPINOLA, 2010), até uma diminuição da atividade fagocitária de macrófagos e monócitos (AZEDO *et al.*, 2011).

A linfocitose persistente, que é uma resposta linfoproliferativa do organismo à infecção, representa uma alteração hematológica associada à leucose, sendo conhecida desde o início do Século XX (KNUTH e VOLKMANN, 1916). Este conhecimento permitiu, a partir da década de 50, o estabelecimento das chaves leucométricas (GÖTZE *et al.*, 1954), que são ferramentas diagnósticas elaboradas para a detecção de linfocitose persistente em indivíduos (FLORES *et al.*, 1990) ou detecção de focos em rebanhos.

A chave leucométrica mais conhecida foi criada por Bendixen em 1959 (tabela 1), que foi bastante utilizada em programas de controle da LEB em diversas nações europeias até meados dos anos 70 (FLORES *et al.*, 1990). Para o adequado funcionamento da chave, valores de referência para cada faixa etária dos bovinos foram criados (FLORES *et al.*, 1990).

Tabela 1. Chave leucométrica de Bendixen (adaptado de Flores *et al.*, 1990).

Idade (anos)	Contagem linfocitária absoluta /mm ³ de sangue		
	Negativo	Suspeito	Positivo
0 – 1	< 10.000	10.000 - 12.000	> 12.000
1 – 2	< 9.000	9.000 - 11.000	> 11.000
2 – 3	< 7.500	7.500 - 9.500	> 9.500
3 – 4	< 6.500	6.500 - 8.500	> 8.500
> 4	< 5.000	5.000 - 7.000	> 7.000

No mínimo dois leucogramas consecutivos, com intervalo mínimo de dois meses entre eles, deveriam ser realizados para o diagnóstico pela Chave de Bendixen.

A linfocitose persistente é uma estratégia utilizada pelo VLB que visa aumentar o número de réplicas virais e aumentar também a população de linfócitos B, para que novas cópias virais possam infectá-los (DEQUIEDT *et al.*, 1999).

O mecanismo exato da fisiopatogenia da linfocitose persistente não está totalmente esclarecido, porém admite-se que o vírus, ao integrar-se ao genoma do hospedeiro, estimula a proliferação de linfócitos, principalmente os do tipo B, ao mesmo tempo em que retarda a apoptose de tais células (SOUZA *et al.*, 2011). Apoptose, também designada como “morte celular programada”, ocorre em diversas situações fisiológicas ou patológicas nos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas, defeituosas ou simplesmente na reposição de tecidos maduros (GRIVICICH *et al.*, 2007). Na LEB, a apoptose pode ser retardada possivelmente por uma inibição da expressão viral no linfócito, impedindo que este seja destruído (GILLET *et al.*, 2007), enquanto que o estímulo para proliferação dos linfócitos B provém de uma maior expressão da Interleucina-2 por linfócitos T (TRUEBLOOD *et al.*, 1998).

Embora seja um campo ainda pouco esclarecido, sabe-se que distúrbios do sistema imune podem aumentar a susceptibilidade do hospedeiro a outras infecções devido ao efeito imunodepressor do VLB (BURNY e MAMMERICKX, 1987; AZEDO, 2007; AZEDO *et al.*, 2008 e 2011).

Aproximadamente 30% dos animais infectados pelo VLB apresentam um quadro hematológico denominado linfocitose persistente (FERRER, 1979; WEISS e WARDROP, 2010), que é uma proliferação persistente de linfócitos B, considerada benigna por diversos autores (DEPELCHIN *et al.*, 1989; WEISS e WARDROP, 2010).

Porém outros autores discordam de que a linfocitose persistente seja uma manifestação benigna da LEB. Foi demonstrado em seus estudos que os bovinos com linfocitose persistente possuíam uma menor imunidade humoral e uma diminuição na atividade fagocítica dos leucócitos (ORLIK e SPLITTER, 1996; AZEDO *et al.*, 2008 e 2011).

A história da etiopatogenia da doença, no Brasil, iniciou-se com Rangel e Machado (1943) que, ao realizarem levantamento sobre frequência de neoplasias nos animais domésticos, no Estado de Minas Gerais, assinalaram, pela primeira vez no país, a ocorrência de linfossarcoma em bovinos. Todavia, relato publicado por Merkt *et al.* (1959), no Rio Grande do Sul parece assinalar, oficialmente, o primeiro diagnóstico clínico autóctone da doença em rebanho criado no Brasil, embora estes pesquisadores tenham mencionado que observações clínico-anatomopatológicas associadas à LEB, não publicadas até aquele momento, haviam sido feitas, em 1958, por Santos *et al.*, no Rio de Janeiro, e por Bueno, em São Paulo (1959).

O acúmulo de informações sobre os aspectos clínico-epizootiológicos e de etiopatogenia da Leucose foram consolidados, no Brasil, com o isolamento pioneiro do VLB por Angelo *et al.* (1985), em cultura primária de fibroblastos provenientes de prepúcios humanos, a partir de linfócitos de bovinos sororreagentes ao antígeno glicoproteico do VLB.

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

Tem-se observado que há uma maior difusão do vírus entre animais das raças de exploração leiteira em relação às raças destinadas ao corte, todavia, Lorenz e Straub (1987) atribuíram às variações do manejo e à permanência mais longa dos animais nos rebanhos, a aparente maior susceptibilidade daquelas raças à infecção pelo VLB.

Os aspectos de transmissibilidade do VLB têm sido exaustivamente estudados ao longo dos últimos anos, demonstrando que transmissão natural do vírus pode ocorrer horizontal ou verticalmente (GÖTZE *et al.*, 1954; ROSENBERGER, 1961 e 1968; FERRER e DIGLIO, 1976; MAMMERICKX *et al.*, 1978; VAN DER MAATEN e MILLER, 1979; WILESMITH, 1980; BUXTON *et al.*, 1982; BIRGEL *et al.*, 1982; BRIGHTLING e RADOSTITS, 1983; LORENZ e STRAUB, 1987).

O convívio íntimo e prolongado entre animais infectados e sadios, particularmente em condições de tensão como mudança recente do pastejo para a estabulação, propicia uma ampla difusão horizontal do vírus o qual pode ser transmitido intensamente pelo leite ou colostro e por outras secreções (salivar, nasal, genital) e excreções, tais como urina e fezes (GÖTZE *et al.*, 1954; ROSENBERGER, 1961 e 1968; MAMMERICKX *et al.*, 1978; WILESMITH, 1980).

A transmissão iatrogênica é, certamente, a via de maior difusão do VLB, sendo necessários, apenas 2.500 linfócitos (0,0005 mL de sangue) para, através de inoculação, determinar-se a infecção (VAN DER MAATEN e MILLER, 1979). Normas inadequadas de vacinação, tratamento sistêmico por injeções intramusculares, subcutâneas ou intravenosas contaminadas com sangue, colheitas ou transfusões de sangue, incluindo o processo de premunição contra anaplasmoses e babesioses a que são submetidos, rotineiramente, os animais importados, além de fômites contaminados usados em castrações e descornas, podem difundir intensamente a infecção pelo VLB em um rebanho (BIRGEL *et al.*, 1982; BRIGHTLING e RADOSTITS, 1983; LORENZ e STRAUB, 1987).

O estabelecimento do complexo antígeno-anticorpo (VLB - linfócitos B) promove a sensibilização imunológica dos linfócitos, que sofrem modificações em sua morfologia e assumem aspecto de linfoblastos ou imunoblastos, células mais jovens, dotadas de grande capacidade de mitose. Adicionalmente, o VLB impõe condição de imunossupressão que inibe ou reduz a ação ou produção de anticorpos, particularmente IgM, imunoglobulina precursora da ativação de enzimas do plasma, responsáveis pela lise celular e outros fenômenos da resposta imune primária, inibindo, inclusive, a atividade fagocitária de neutrófilos, prejudicando o sistema imuno-celular. Esse comprometimento da integridade do sistema imunitário orgânico propicia ao VLB, desprovido de envelope, capacidade de penetrar no citoplasma linfocitário onde, sob ação da transcriptase reversa, converte-se de RNAvírus mono-cromossomal a DNAproviral duplo-cromossomal para incorporar-se no genoma

celular do linfócito por tempo indeterminado, às vezes anos, o que pode promover o aparecimento de falsos negativos nos testes sorológicos.

O estresse do hospedeiro, advindo da produção (lactação, ganho de peso rápido) e principalmente de doenças intercorrentes, 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 RNAvírus (“retrovírus”, do latim retro = para trás), deslocam-se até a membrana citoplasmática, adquirem forma de “C” (vírus tipo C) e, por gemelação, replicam-se intensamente, caindo na corrente sanguínea em sua forma madura (WYERS, 1975; CHEVRIER, 1975).

Atualmente os testes sorológicos têm sido a metodologia recomendada para a identificação precoce de focos da Leucose Enzoótica dos Bovinos, destacando-se o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (MILLER e OLSON, 1972; MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; ALTANER *et al.*, 1982; TRONO *et al.*, 2001; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009).

No passado, o diagnóstico da LEB baseava-se exclusivamente nos sinais clínicos associados à achados hematológicos característicos da enfermidade (ALTANER *et al.*, 1982). Porém, sabe-se que apenas cerca de um terço dos bovinos apresentam alterações hematológicas peculiares aos animais VLB-positivos (linfocitose persistente) e 5% desenvolvem linfossarcomas (FERRER, 1979; WEISS e WARDROP, 2010). Posteriormente então, após o isolamento do VLB, novas ferramentas diagnósticas foram introduzidas, com destaques para a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) desenvolvida por Miller *et al.* (1969) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (ALTANER *et al.*, 1982; TRONO *et al.*, 2001; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009), sendo tais testes sorológicos os mais recomendados para a identificação precoce de focos da LEB (MILLER e OLSON, 1972; MILLER e VAN DER MAATEN, 1977).

O estabelecimento desses instrumentos diagnósticos levou a alterações na situação epidemiológica da LEB e com perspectivas de mudanças ainda maiores com o desenvolvimento das mesmas. A IDGA e o ELISA são considerados os testes referência para a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2011) e para a União Europeia (Commission Decision of 15 December, 2009).

A imunodifusão radial dupla de Ouchterlony foi progressivamente padronizada (MILLER e OLSON, 1972; MILLER e VAN DER MAATEN, 1977), e, atualmente, utilizando uma glicoproteína (gp51), extraída, concentrada e purificada a partir do envelope do mencionado vírus, é considerada a técnica padrão para a identificação de bovinos portadores de anticorpos séricos específicos anti-VLB, demonstrando uma boa especificidade, adequada sensibilidade e grande praticidade, sendo pouco dispendiosa (MAMMERICKX *et al.* 1976, MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; SHETTIGARA, 1986; MAMMERICKX, 1987).

Em Pernambuco, a LEB teve sua ocorrência registrada nos achados clínico-hematológicos e histopatológicos pioneiros de Cavalcante *et al.* (1969), em bezerros procedentes do Agreste. Mais tarde, em 1991, Melo confirmou sorologicamente a ocorrência da doença no estado, verificando uma prevalência de 15,1 % (67/443) em rebanhos de Garanhuns e municípios adjacentes. Mendes (2002) encontrou uma frequência de 14,7 % (39/265) de bovinos reagentes à IDGA, em rebanhos examinados no Estado de Pernambuco. Em dados mais recentes, Fernandes *et al.* (2011) apresentaram uma prevalência de 24% (343/1.421) de bovinos VLB positivos em rebanhos localizados em municípios do Agreste, Sertão, Zona da Mata e Região Metropolitana do Recife, no Estado de Pernambuco.

As prováveis causas da disseminação da LEB são atribuídas à falta de programas de controle da doença e a desconhecimento por parte da população sobre a doença (DE BARROS FILHO *et al.*, 2010).

A LEB é descrita por inúmeros autores como uma doença naturalmente apenas de bovino. Porém, experimentalmente, a infecção pode facilmente ser reproduzida em caprinos, ovinos e coelhos (BURNY *et al.*, 1985; BURNY *et al.*, 1988; WYATT *et al.*, 1989).

Pouco se sabe a respeito da capacidade do BLV em infectar humanos. Alguns estudos já foram realizados e com resultados semelhantes entre si. Burridge (1981) afirmou após alguns experimentos que o VLB não é capaz de causar nenhum tipo de doença em humanos. Em estudo sorológico realizado por Buhering *et al.* (2003) em humanos com câncer foi pesquisada a presença de anticorpos específicos contra o VLB, sendo encontrados em alguns pacientes. Entretanto a presença de anticorpos séricos significa que o indivíduo foi exposto ao antígeno e seu sistema imunológico reagiu contra ele.

Porém recentemente Nikbakht *et al.* (2010) encontrou expressivos 12,5% (57/454) de amostras de soro humano que reagiram positivamente ao ELISA para detecção de anticorpos séricos anti-VLB e desses 57, em sete foi confirmada a presença do DNA proviral do BLV através da *Nested* PCR. Os achados não confirmam que os soros com DNA proviral são oriundos de indivíduos ativamente infectados pelo BLV, tendo em vista que há a possibilidade destes provirus estarem circulantes nos fluidos corpóreos, sem estarem necessariamente integrados ao genoma hospedeiro. Entretanto tal evidencia só aumenta a vigilância sobre a LEB como possível zoonose, apesar de ainda não existirem relatos sobre tal doença em humanos (NIKBAKHT *et al.*, 2010).

Apesar da LEB não ter caráter zoonótico, a mesma possui importante papel na saúde pública. Admite-se que a doença desempenhe um importante papel no desencadeamento da tuberculose bovina, em decorrência das evidências de que o Vírus da Leucose Bovina (VLB) compromete o estado imunitário dos bovinos VLB infectados (WYERS, 1975; FERRER, 1979; BURNY e MAMMERICKX, 1987; HEENEY *et al.*, 1992; BURNY e MAMMERICKX, 1987; AZEDO *et al.*, 2008 e 2011; SPINOLA, 2010).

3 Metodologia

3.1 Amostragem

Foi utilizado no estudo um total de 1000 bovinos, oriundos de 33 rebanhos localizados nos municípios de Paudalho, Belo Jardim, São Lourenço da Mata, Jaboatão dos Guararapes, Camaragibe, Recife, Canhotinho, Serrinha, Tacaimbó, Vitória de Santo Antão, Nazaré da Mata, Gravatá, Ipojuca, Brejo da Madre de Deus, São José do Egito e Sanharó, no Estado de Pernambuco, em período compreendido entre os anos de 2002 e 2011.

Foi colhido sangue dos animais, por meio da venopunção jugular, em tubos com ou sem ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), para realização do leucograma e obtenção do soro para diagnóstico da LEB, respectivamente.

Desse total de 1000 animais, em 920 foi realizada a tuberculinização por meio da técnica simultânea comparada (TSC). As amostras de sangue foram processadas no Laboratório de Pesquisa em Clínica de Grandes Animais, do Departamento de Medicina Veterinária (LPCGA-DMV) da UFRPE.

3.2 Teste simultâneo comparativo (TSC) para diagnóstico da tuberculose bovina

O diagnóstico da TB foi estabelecido pelo Teste da Tuberculina (Teste Simultâneo Comparativo - TSC), cujo resultado era estabelecido 72 horas após a inoculação das tuberculinas aviária e bovina (Derivado Proteico Purificado - PPD)¹, a partir da avaliação das reações imunoalérgicas resultantes, circunscritas aos locais da inoculação, pela inspeção, palpação e cutimetria.

Foi medida a espessura da dobra pele em duas etapas, sendo calculada a diferença entre ambas: os valores obtidos antes da inoculação das tuberculinas (1ª cutimetria) foram subtraídos dos obtidos 72 horas após a inoculação (2ª cutimetria), considerando os respectivos antígenos. O resultado final do teste foi aferido pelo cálculo da diferença entre os dois antígenos (PPD aviária subtraídos da PPD bovina) e interpretado de acordo com os

¹ Produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR®, sob controle de qualidade do MAPA.

procedimentos preconizados no Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (BRASIL, 2006), como descrito na tabela 2.

Tabela 2. Interpretação dos resultados da cutimetria do teste simultâneo comparado. Recife, 2012.

Δ Bovina - Δ Aviária (mm)	Resultado
< 0	Negativo
0,0 – 1,9	Negativo
2,0 – 3,9	Inconclusivo
\geq 4,0	Positivo

Δ = diferença

3.3 Sorodiagnóstico da Leucose Enzoótica dos Bovinos

Foi estabelecido pelo exame das amostras de soro à Imunodifusão em gel de ágar (IDGA), usando a técnica da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony (MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; BIRGEL *et al.*, 1982). Essencialmente, a técnica se presta 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 VLB².

Os resultados eram aferidos 72 horas após a montagem do sistema da IDGA, a partir da leitura da placa de *Petri*, usando incidência de luz artificial (lanterna) em sua porção inferior, sendo consideradas sororreagentes as amostras que apresentavam linha de precipitação na zona de contato antígeno-anticorpo idênticas às estabelecidas entre os poços controle e antígeno.

3.4 Análises leucométricas

A contagem dos leucócitos foi realizada mediante a diluição da solução com um pipetador automático de 20 μ L: foram colocados 0,4 mL do fluido diluidor de *Türk* (solução de ácido acético glacial 2%, à qual foi adicionado um mL de uma solução aquosa de violeta de genciana 1%) em tubos de ensaio de cinco mililitros; após homogeneização da amostra de sangue, este foi aspirado com o pipetador automático e colocado no tubo contendo o fluido

² Produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR®, sob controle de qualidade do MAPA.

diluidor de *Türk*; parte do conteúdo, homogeneizado por dois minutos, foi pipetado para preenchimento da câmara de *Neubauer*. Após breve repouso do sistema montado foram contados os leucócitos contidos nos quatro milímetros angulares, multiplicando o valor encontrado por 50³. O resultado foi expresso em leucócitos/mm³ de sangue.

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada confeccionando-se esfregaços sanguíneos de todos os bovinos examinados, após os cuidados convencionais para limpeza e desengorduração das lâminas. Foi utilizada a técnica de coloração rápida, empregando-se o conjunto de corantes *Instant Prov*⁴, que é um corante panóptico para coloração diferencial dos elementos figurados do sangue (IÓVINE e SELVA, 1975; LILLIE e CONNLS, 1977; LILLIE e CONNLS, 1981; LIMA, 1992; SILVA e HASHIMOTO, 1999).

A técnica de coloração seguiu os seguintes procedimentos: as laminas foram submersas, uma a uma, no corante *Instant prov I*, pelo tempo de 15 segundos, deixando-as escorrer, por cinco segundos; em seguida, de forma semelhante, foram submersas sucessivamente no *Instant prov II* (por 10 segundos) e no *Instant prov III* (por 20 segundos). Finalmente, os esfregaços corados foram submetidos à lavagem em água corrente, estando preparadas para serem lidas.

3.5 Formação dos grupos experimentais

Foram criados quatro grupos experimentais, de acordo com os resultados obtidos ao TSC e à IDGA, denominados:

- Grupo gTB – Composto por 41 bovinos positivos ao TSC;
- Grupo gLEB – Composto por 151 bovinos positivos à IDGA;
- Grupo gNEG – Composto por 379 bovinos negativos ao TSC e à IDGA;
- Grupo gINT – Composto por 43 bovinos positivos a ambos os testes.

³ Fator de multiplicação = $PC \times D / AC = 10 \times 20 / 4$; PC = Profundidade da Câmara (10); D = Diluição (1:20) e AC = Área contada (4);

⁴ Laboratório Newprov - Pinhais, Paraná.

Os animais que resultaram inconclusivos foram excluídos da formação dos grupos. O grupo gNEG foi considerado como grupo controle por estarem inclusos no mesmo animais aparentemente hígidos.

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 15.0 para Windows Evolution Version (Teste *t* de *Student*) (SAMPAIO, 2007).

Com o objetivo de avaliar possíveis diferenças nas médias das variáveis leucométricas sob a influência da TB, foram procedidos ensaios pelo confronto dos grupos experimentais: 1) gTB e gNEG; 2) gLEB e gNEG; e 3) gNEG e gINT. A análise e interpretação dos resultados foram realizadas pelo teste *t* de *Student*, depositando nos mesmos um grau de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4 Resultados e discussão

4.1 Relacionados à TB e à LEB

Os resultados relativos à tuberculinização e ao sorodiagnóstico da LEB estão descritos detalhadamente nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Depreende-se das referidas tabelas que as taxas de prevalência da TB e da LEB foram 11% (99/920) e 28% (282/1000), respectivamente, com 88% (29/33) dos rebanhos contribuindo com ao menos um animal positivo para um ou ambos os testes.

Os resultados demonstram que as duas doenças encontram-se disseminadas e em expansão nos rebanhos leiteiros examinados, com índices expressivos, o que as torna um grave problema sanitário, demandando atenção das autoridades sanitárias, sobretudo pela intensidade de suas prevalências, classificadas como média para a TB e de média à alta para a LEB (SHETTIGARA, 1986), ambas superiores a índices registrados no país (BRASIL, 1994, 2006; MELO, 1999; MENDES, 2002; TENÓRIO, 2003; BIRGEL JÚNIOR *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2010; LAVAGNOLI *et al.*, 2010). Tais contrastes de resultados podem indicar que as estimativas da prevalência da TB e da LEB precisam ser revistas e atualizadas sistematicamente em vários setores da pecuária regional e nacional.

Em relação à LEB, a doença vem demonstrando um estado de recrudescimento em Pernambuco, após dados pioneiros de Melo, em 1991, com 15% de prevalência, permanecendo-se estável até 2003, com 17% de prevalência (TENÓRIO, 2003). Após esse período, mais precisamente em 2008, a leucose apresentou-se com prevalências de 33,4% (MENDES *et al.*, 2008) e 30,9% (MELO *et al.*, 2010), semelhantes ao encontrado no presente estudo.

Fatores como intenso influxo de animais entre os rebanhos, oriundos de outros estados sem obedecer a rígidos critérios de sanidade, principalmente das regiões Sul e Sudeste, especialmente de São Paulo e de Minas Gerais, o desconhecimento do produtor sobre as doenças em estudo, a desestruturação de órgãos oficiais envolvidos com a sanidade animal, bem como a assistência médico-veterinária deficiente, influenciam certamente na gênese e disseminação da TB e da LEB nos rebanhos leiteiros de Pernambuco (MELO, 1991;

MENDES, 2002; TENÓRIO, 2003; FERNANDES *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2011) e outros estados do país (MELO *et al.*, 1997; D'ANGELINO *et al.*, 1998; MELO, 1999; SILVA, 2001; MATOS *et al.*, 2005; BIRGEL JÚNIOR *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2010; LAVAGNOLI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010).

Aspecto clínico-epidemiológico relevante refere-se à intercorrência observada entre TB e LEB em alguns rebanhos examinados. Dos 920 bovinos examinados, 43 (4,7%) deles apresentaram positividade simultânea a ambos os testes (IDGA e teste da tuberculina), evidenciando provável intercorrência entre LEB e TB, isto é, que uma doença ocorre no decurso da outra, fenômeno este registrado em diferentes situações (MELO, 1999; MENDES *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2011).

A explicação mais consistente para isso refere-se ao comprometimento da integridade do sistema imunitário orgânico pela ação imunodepressora do VLB, que penetra e incorpora-se no genoma linfocitário por tempo indeterminado (MUSCOPLAT *et al.* 1974; WYERS, 1975; CASTRO *et al.*, 1988). Adicionalmente, as evidências imunocitológicas de que VLB infecta monócitos circulantes (HEENEY *et al.*, 1992) aumenta a susceptibilidade do hospedeiro a outras infecções (BURNY e MAMMERICKX, 1987), como a determinada pelo *Mycobacterium bovis*, que é o agente etiológico de eleição da tuberculose na espécie bovina.

Do ponto de vista do saneamento dos rebanhos envolvidos neste estudo, é importante salientar que 88% (29/33) das propriedades tinham ao menos um bovino reagente a um ou ambos os testes, fato que resultou na positividade de 32% (323/1000) à IDGA e/ou teste da tuberculina do total de bovinos examinados.

Neste sentido, e considerando o caráter irreversível da infecção pelo VLB, a inclusão da LEB e TB na lista de notificação obrigatória da Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE, 2008), o PNCEBT (BRASIL, 2001) para o saneamento de rebanhos e o caráter zoonótico da TB, admite-se que um terço das vacas examinadas (323/1000) deveriam ser eliminadas de seus rebanhos de origem, o que implicaria em grandes prejuízos para os produtores e, conseqüentemente, para a pecuária leiteira do Estado de Pernambuco.

Tabela 3. Resultados ao TSC no exame dos bovinos para diagnóstico da tuberculose, distribuídos em função dos rebanhos e municípios do estado de Pernambuco. Recife, 2012.

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

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

Tabela 4. Resultados à IDGA no exame dos bovinos para o diagnóstico da Leucose Enzoótica dos Bovinos, distribuídos em função dos rebanhos e municípios do estado de Pernambuco. Recife, 2012.

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

4.2 Relacionados às análises leucométricas

Os valores dos leucócitos dos bovinos examinados estão descritos na tabela 5, 6, e 7. Com o objetivo de avaliar possíveis diferenças nas médias das variáveis leucométricas, sob a influência da TB, foram procedidos ensaios pelo confronto dos grupos experimentais, a saber:

- **Ensaio 1: análise leucométrica entre os grupos gTB e gNEG**

Em conformidade com o que se observa na tabela 5, foi encontrada diferença nas médias ($p < 0,05$) de leucócitos totais e linfócitos quando comparados gTB e gNEG.

Tabela 5. Valores dos leucócitos¹ dos bovinos examinados, distribuídos em função dos tipos celulares e analisados² pelo confronto dos grupos experimentais gTB e gNEG. Recife, 2012.

Leucócitos	Grupos	
	gTB ³	gNEG ⁴
Totais	9,6 ± 2,5 ^a	11,5 ± 3,8 ^b
Linfócitos	5,9 ± 1,9 ^a	7,6 ± 5,1 ^b
Neutrófilos segmentados	3,3 ± 3,9 ^a	3,0 ± 2,3 ^a
Neutrófilos bastões	0,1 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,2 ^a
Monócitos	0,1 ± 0,2 ^a	0,2 ± 0,3 ^a
Eosinófilos	0,8 ± 0,7 ^a	0,8 ± 0,8 ^a

¹ Em valores médios ($\times 10^3/\text{mm}^3$ de sangue);

² Letras distintas na mesma linha indicam diferenças entre grupos ($p < 0,05$);

³ Grupo composto por bovinos positivos à tuberculinização;

⁴ Grupo composto por bovinos negativos à tuberculinização e VLB-negativos.

O menor número de leucócitos totais ($p < 0,05$) encontrados no grupo TB em relação ao grupo NEG (tabela 5) se deve à diminuição ($p < 0,05$) no número de linfócitos circulantes, pois o bovino por ser um animal linfocítico (SWENSON, 1996; JONES e ALLISON, 2007), ou seja, que possui mais linfócitos do que os outros tipos celulares juntos, quando há uma diferença significativa no número de linfócitos, geralmente o número de leucócitos acompanha (JONES e ALLISON, 2007).

Os resultados do presente estudo diferem dos apresentados por Javed *et al.* (2010), que encontraram um maior número de linfócitos e menor número de neutrófilos em bovinos positivos em relação aos negativos à tuberculinização.

Já os resultados de Shettar *et al.* (2011) foram de certa forma semelhantes aos do presente estudo. Apesar de estatisticamente insignificante, os autores encontraram um menor número de leucócitos e linfócitos nos animais positivos à tuberculinização, com inclusive 47% (7/15) dos bovinos apresentando linfopenia. Os positivos possuíam também um menor número de neutrófilos, enquanto os monócitos apareceram em maior número, diferentemente do encontrado no presente trabalho, em que tais tipos celulares não diferiram ($p > 0,05$) entre os grupos.

Tal diminuição no número de linfócitos, apesar de ainda mantida na faixa considerada fisiológica (MORRIS, 2006), pode ser encontrada em doenças de evolução crônica (MORRIS e LARGE, 1990), pois os linfócitos, juntamente com os eosinófilos, são os tipos celulares mais sensíveis aos corticosteroides endógenos (JAIN, 1993), liberados em situações estressantes (TRALL, 2007), como por exemplo, em animais com TB.

O mecanismo com que os corticosteroides atuam na diminuição dos linfócitos é meramente especulativo (MEYER *et al.*, 1995). Culpam-se a lise linfocitária causada pelos hormônios (BUSH, 2004) ou por meio da recirculação linfática de tal tipo celular (SILVA *et al.*, 2008).

Essa diminuição de linfócitos evidencia um estado de imunossupressão em que os animais tuberculosos se enquadram.

- **Ensaio 2: análise leucométrica entre os grupos gLEB e gNEG**

Os valores leucométricos descritos na tabela 6, na comparação entre os grupos gLEB e gNEG, apresentaram diferença significativa nas médias ($p < 0,05$) de leucócitos totais e linfócitos.

Tabela 6. Valores dos leucócitos¹ dos bovinos examinados, distribuídos em função dos tipos celulares e analisados pelo confronto dos grupos experimentais gLEB e gNEG. Recife, 2012.

Leucócitos	Grupos ²	
	gLEB ³	gNEG ⁴
Totais	13,2 ± 6,3 ^a	11,5 ± 3,8 ^b
Linfócitos	9,1 ± 6,0 ^a	7,6 ± 5,1 ^b
Neutrófilos Segmentados	3,1 ± 2,3 ^a	3,2 ± 2,9 ^a
Neutrófilos Bastões	0,1 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,2 ^a
Monócitos	0,2 ± 0,3 ^a	0,5 ± 3,1 ^a
Eosinófilos	0,9 ± 0,8 ^a	0,8 ± 0,8 ^a

¹ Em valores médios ($\times 10^3/\text{mm}^3$ de sangue);

² Letras distintas na mesma linha indicam diferenças entre grupos ($p < 0,05$);

³ Grupo composto por bovinos VLB-positivos;

⁴ Grupo composto por bovinos negativos à tuberculinização e VLB-negativos.

O maior número de leucócitos totais ($p < 0,05$) encontrado no grupo gLEB em relação ao grupo gNEG se deve a um aumento no número de linfócitos circulantes ($p < 0,05$) pela ação patogênica de VLB (WYERS, 1975; FERRER, 1979; BURNY e MAMMERICKX, 1987; HEENEY *et al.*, 1992; BURNY e MAMMERICKX, 1987; AZEDO *et al.*, 2008 e 2011; SPINOLA, 2010).

Esse aumento no número de linfócitos se deve a um mecanismo utilizado pelo VLB, que ao integrar-se ao genoma do hospedeiro, estimula a proliferação de linfócitos, principalmente os do tipo “B”, ao mesmo tempo em que retarda a apoptose programada de tais células (SOUZA *et al.*, 2011). A linfocitose é observada em cerca de um terço dos animais com LEB (FERRER, 1979). Sabe-se que o estímulo para proliferação dos linfócitos B provém de uma maior expressão da Interleucina-2 por linfócitos T (TRUEBLOOD *et al.*, 1998), e a apoptose pode ser retardada por uma inexpressão viral no linfócito, impedindo que este seja destruído (GILLET *et al.*, 2007). Essa estratégia é utilizada pelo vírus por dois motivos: aumentar o número de réplicas virais e aumentar o número de linfócitos B, para que outras cópias virais possam infectá-los (DEQUIEDT *et al.*, 1999).

Apesar de apresentarem diferentes influências, até mesmo aparentemente opostas, pode-se dizer, no leucograma, tanto a LEB quanto a TB resultam em imunossupressão do indivíduo.

A TB, de acordo com os resultados, pode atuar interferindo negativamente na produção leucocitária através de mecanismos diretos, por meio da produção de corticosteroides endógenos (JAIN, 1993; TRALL, 2007), como também de maneira indireta, através da diminuição na alimentação e exercício, por exemplo, pela ação debilitante da tuberculose.

No caso específico da LEB, apesar de haver um aumento no número de leucócitos, mais precisamente linfócitos, tais células não estão em perfeito funcionamento, principalmente naqueles casos em que há linfocitose persistente (WYERS, 1975; FERRER, 1979; BURNY e MAMMERICKX, 1987; HEENEY *et al.*, 1992; BURNY e MAMMERICKX, 1987; AZEDO *et al.*, 2008 e 2011; SPINOLA, 2010), que ocorre em cerca de 30% dos animais VLB positivos (FERRER, 1979).

- **Ensaio 3: análise leucométrica entre os grupos gINT e gNEG**

As médias dos parâmetros leucométricos estudados, dos grupos gINT e gNEG, foram confrontadas para avaliar a interferência da co-positividade ao TSC e IDGA no leucograma de bovinos, visto que ambos resultados, isoladamente, interferiram na leucometria (tabelas 5 e 6).

Na comparação entre os grupos gINT e gNEG não foi encontrada diferença nas médias ($p > 0,05$) em nenhum dos parâmetros avaliados, como pode ser observado na Tabela 7. Tal diferença não foi observada entre os grupos, pelas influências inversas sobre o leucograma observadas na LEB e TB. Enquanto os animais VLB-positivos tiveram um aumento nos leucócitos totais e linfócitos (tabela 6), os bovinos positivos a tuberculinização apresentaram uma diminuição nos mesmos parâmetros (tabela 5), resultando assim em efeito antagônico.

Tabela 7. Valores dos leucócitos¹ dos bovinos examinados, distribuídos em função dos tipos celulares e analisados pelo confronto dos grupos experimentais gINT e gNEG. Recife, 2012.

Leucócitos	Grupos ²	
	gINT ³	gNEG ⁴
Totais	11,8 ± 4,3 ^a	11,5 ± 3,8 ^a
Linfócitos	8,0 ± 3,5 ^a	7,6 ± 5,1 ^a
Neutrófilos Segmentados	2,7 ± 1,6 ^a	3,2 ± 2,9 ^a
Neutrófilos Bastões	0,1 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,2 ^a
Monócitos	0,1 ± 0,2 ^a	0,5 ± 3,1 ^a
Eosinófilos	0,8 ± 0,5 ^a	0,8 ± 0,8 ^a

¹ Em valores médios ($\times 10^3/\text{mm}^3$ de sangue);

² Letras distintas na mesma linha indicam diferenças entre grupos ($p < 0,05$);

³ Grupo composto por bovinos simultaneamente positivos à tuberculinização e VLB-positivos;

⁴ Grupo composto por bovinos negativos à tuberculinização e VLB-negativos.

A criação de chaves leucométricas para diagnóstico da LEB teve início com Götze *et al.* em 1954. Tais chaves possuem como princípio a identificação de animais/focos da LEB por meio da linfocitometria, levando em conta a característica do VLB, que provoca uma linfocitose persistente em cerca de 30% dos indivíduos infectados (FERRER, 1979). O uso da leucometria como ferramenta diagnóstica auxiliaram diversos países, como por exemplo, a Finlândia, que erradicaram a doença do país (NUOTIO *et al.*, 2003). Para detecção de focos, a leucometria pode ser extremamente útil, como discutido anteriormente no comparativo entre os grupos gLEB e gNEG (tabela 6), onde um aumento na média dos linfócitos ($p < 0,05$) foi observada no grupo gLEB em relação ao gNEG.

5 Considerações finais

- O estado de enzootia em que se encontra a LEB na população dos rebanhos examinados, em conexão com as evidências de sua intercorrência com a tuberculose, requer mais atenção das autoridades sanitárias do estado, com vista à implantação de estratégias mais eficazes de detecção, controle e erradicação das duas doenças;
- A necessidade da eliminação de mais de um terço (323/1000) das vacas examinadas e da interdição da ampla maioria de seus rebanhos de origem (29/33), por terem apresentado positividade para LEB ou TB ou ambas as doenças, e na hipótese da ratificação dos resultados deste estudo em ensaios mais amplos, os prejuízos seriam desastrosos para toda a cadeia produtiva da pecuária leiteira do estado de Pernambuco;
- Considerando o efeito antagônico da LEB e da TB sobre o leucograma dos bovinos, exacerbando e deprimindo os leucócitos e linfócitos, respectivamente, ambas as doenças comprometem o estado imunitário dos rebanhos, tornando-os mais susceptíveis a doenças oportunistas;
- Estrategicamente, com vista ao saneamento dos rebanhos leiteiros, o exame sorológico positivo confere ao bovino reagente infecção pelo VLB e indica seu descarte do rebanho, porém, quando negativo não garante isenção de infecção ao bovino não reagente. Nestes casos, a utilização da leucometria como recurso auxiliar ao diagnóstico da LEB pode ser uma alternativa viável para o controle da doença, pois possibilita a identificação de muitos bovinos não detectáveis sorologicamente. Para isso, os bovinos soronegativos para LEB devem ser previamente tuberculinizados, os reagentes ao TSC descartados e os não reagentes submetidos à leucometria, evitando-se, com isso, resultados falso-negativos para LEB provocados pela interferência da TB no leucograma (Figura 2).

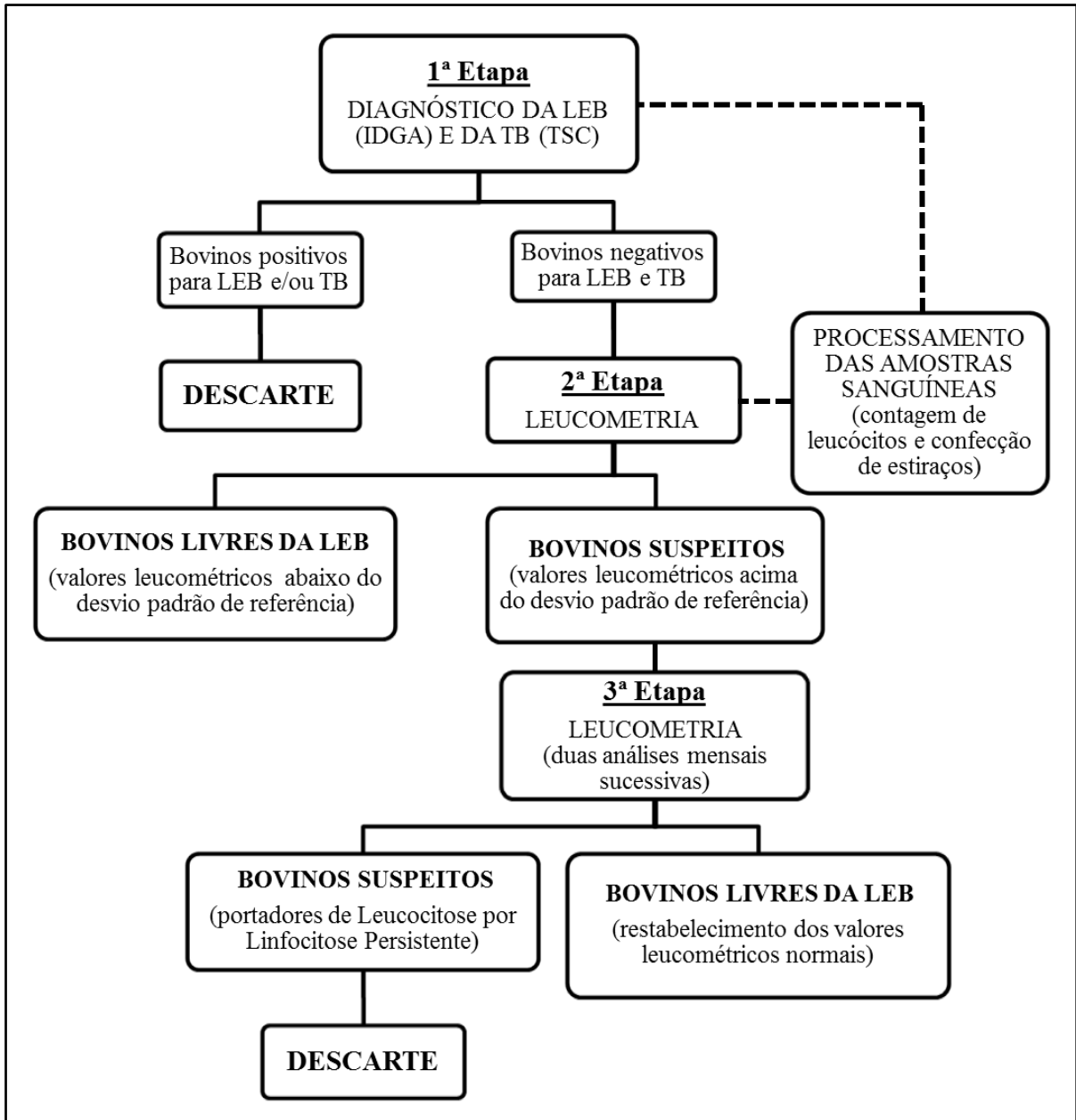


Figura 2. Inclusão do teste da tuberculina em esquema estratégico aplicável a programas sanitários usando a leucometria para identificação de focos da LEB, com vistas ao saneamento dos rebanhos leiteiros no estado de Pernambuco. Recife, 2012.

6 Conclusão

Os valores leucométricos de bovinos sofrem influência da TB, devendo todo programa sanitário de combate à LEB em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco, e que inclua a leucometria como ferramenta epidemiológica estratégica, preconizar a prévia tuberculinização dos rebanhos envolvidos, sendo descartados os bovinos que apresentarem positividade ao teste imunoalérgico.

7 Referências

- ABRAHÃO, R. M. C. M. **Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais.** São Paulo, 1998. 273p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.
- ALTANER, C.; ZAJAC, V.; BAN, J. A. A simple and inexpensive method for detection of BLV infected cattle based on modified ELISA principle. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Berlin, v.29, n.8, p.583-590, 1982.
- ANGELO, M. J. O.; BIRGEL, E. H.; HAGIWARA, M. K. BENESI, F. J.; D'ANGELINO, J. L.; DAHMARI, H. W. P. F.; CARVALHO, R. P. S. Isolamento do vírus da leucose bovina de animais com linfocitose persistente. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 13, São Paulo, 1985. Anais.... São Paulo, USP, Instituto de Ciências Biomédicas, 1985. p.289.
- AZEDO, M. R. **Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa dos leucócitos.** São Paulo, 2007. 151p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- AZEDO, M. R.; BLAGITZ, M. G.; SOUZA, F. N.; BENESI, F. J.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Avaliação funcional de monócitos de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.5, p.1131-1140, 2011.
- AZEDO, M. R.; MASSOCO, C. O.; BLAGITZ, M. G.; SANCHES, B. G. S.; SOUZA, F. N.; BATISTA, C. F.; SAKAI, M.; SÁ-ROCHA, L. C.; KFOURY JUNIOR, J. R.; STRICAGNOLO, C. R.; BENESI, F. J.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Influência da leucose enzoótica bovina na função fagocítica de leucócitos circulantes em animais manifestando linfocitose persistente. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 5, p. 390-397, 2008.
- BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos.** 1 ed. São Paulo, Roca, 1988. 457p.
- BENDIXEN, H. J. Undersogelser over kvaegets leukose. **Nordish Veterinary Medicine**, v.11, p.733-758, 1959.

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

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

BIRGEL JUNIOR, E. H.; DIAS, W. M. C.; SOUZA, R. M.; POGLIANI, F. C.; BIRGEL, D. B.; BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em animais da raça Simental, criados no estado de São Paulo. **ARS Veterinaria**, v.22, n.2, p.122-129, 2006.

BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J; D'ANGELINO, J. L.; HAGIWARA, M. K.; PRADO, M. S. S. 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 São Paulo*, 1, 1982, Campinas. **Anais...** Campinas, 1982. p.73

BLANCO, F. C.; BIANCO, M. V.; MEIKLE, V.; GARBACCIO, S.; VAGNONI, L.; CATALDI, A. A.; BIGI, F. Respuesta inmune en terneros experimentalmente infectados com diferentes dosis de *Mycobacterium bovis*. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v.37, n.2, p.189-192, 2011.

BRASIL. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT**. MAPA/SDA/DSA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento- MAPA. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**, 2001. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. DFP/SSA. **Relatório de ocorrência da tuberculose bovina, Pernambuco**, 1976, 1992, 1994.

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

BROWN, A. E.; HOLZER, T. J.; ANDERSEN, B. R. Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Infectious Disease**, v.156, p.985–989, 1987.

BUENO, 1958 apud MERKT *et al.*, 1959. p.11.

BUHERING, G. C.; PHILPOTT, S. M.; CHOI, K. Y. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. **AIDS Research Human Retroviruses**, v.19, p.1105-1113, 2003.

BURNY, A.; BRUCK, C.; CLEUTER, Y.; COUEZ, D.; DESCHAMPS, J.; GHYSDAEL, J. Bovine leukemia virus, a versatile agent with various pathogenic effects in various animal species. **Cancer Research**, v.45, p.4578s-4582s, 1985.

BURNY, A.; CLEUTER, Y.; KETTMANN, R.; MAMMERICKX, M.; MARBAIX, G.; PORTETELLE, D. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. **Veterinary Microbiology**, v.17, p.197-218, 1988.

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

BURRIDGE, M. J. The zoonotic potencial of bovine leukemia vírus. **Veterinary Research Community**, v.5, p.117-126, 1981.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. 1 ed. São Paulo: Roca, p. 117-128, 2004.

BUXTON, B. A.; HINKLE, N. C.; SCHULTZ, R. D. Role of insects in transmission by mosquitoes. **American Journal, of Veterinary Research**, v.43, p.1458-9, 1982.

CASTRO, A. F. P.; NEMOTO, H. Occurrence of atypical mycobacteria in the lymphonodes of apparently healthy slaughtered cattle in São Paulo, Brasil. **Revista de Microbiologia**, v.3, n.2, p.75-78, 1972.

CASTRO, N. H. C.; WALTER, J.; SANTOS, R. D. C. S. D.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F.; BIRGEL, E. H.; BEÇAK, W. Cytogenetics study of cattle affected by persistent lymphocytosis. **Journal of Veterinary Medicine**, v.35, p.380-384, 1988.

CAVALCANTE, M. I.; BARRETO, S. C. P.; COSTA FILHO, G. A. Sobre a ocorrência da leucose bovina no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, p. 225-227, 1969.

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. **Manual de normas y procedimientos tecnicos para la bacteriologia de la tuberculosis**. Parte I: La muestra. El exame microscopico. Buenos Aires: CEPANZO, 1988. 30p.il. (Notas tecnicas, 26/ rev 1).

CHEVRIER L. Aspect hématologique de la leucose bovine. Application au dépistage hématologique. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.151, p.145-152, 1975.

COLES, E. H. **Patología Clínica Veterinaria**. 3. Ed. São Paulo: Manole, 1984. 914 p.

COMMISSION DECISION OF 15 DECEMBER 2009. Amending Annex D to Council Directive 64/432/EEC as regards diagnostic tests for enzootic bovine leukosis. **Official Journal of the European Union**, p.336-340, 2009.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA C. N. M.. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos - Tuberculose**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1992. p.317-337.

COSIVE, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; *et al.* Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging infectious Diseases**, v.4, n.1, 1998.

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

DE ANDA, J. H.; MONAGHAN, M.; COLLINS, J. D.; BRENNAN, P. J.; SALMAN, M. D. Evaluation of MPB70, bovine PPD and lipoarabinomannan as antigens in ELISA for the serodiagnosis of bovine tuberculosis. **Preventive Veterinary Medicine**, v.27, p.211-215, 1996.

DE BARROS FILHO, I. R.; GUIMARÃES, A. K.; SPONCHIADO, D.; KRÜGER, E. R.; WAMMES, E. V.; OLLHOFF, R. D.; DORNBUSCH, P. T.; BIONDO, A. W. Soroprevalência de anticorpos para o vírus da leucose enzoótica em bovinos criados na região

metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.511-515, 2010.

DE PAULA JUNIOR, A. R.; SILVA, T. I. B.; FERNANDES, A. C. C.; BAPTISTA FILHO, L. C. F.; SOUZA, A. C. M.; MAIA, F. C. L.; RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R.; MELO, L. E. H. Identificação Biomolecular do *Mycobacterium Bovis* em Bovino Leiteiro Criado na Mesorregião Metropolitana do Recife, Pernambuco. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.4, Supl. 3, p.835-838, 2011.

DENIS, M. Involvement of cytokines in determining resistance and acquired immunity in murine tuberculosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v.50, p.495–501, 1991.

DEPELCHIN, A.; LETESSON, J. J.; LOSTRIE-TRUSSART, N.; MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; BURNY, A. Bovine leukemia virus (BLV)-infected B-cells express a marker similar to the CD5 T cell marker. **Immunology Letters**, v.20, n.1, p. 69-76, 1989.

DEQUIEDT, F.; CANTOR, G. H.; HAMILTON, V. T.; PRITCHARD, S. M.; DAVIS, W. C.; KERKHOFS, P.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis in cattle does not correlate with increased ex vivo survival of B lymphocytes. **Journal of Virology**, v.73, p.1127-1137, 1999.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. **Rosenberger – Exame clínico dos bovinos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419p.

DOMINGO, M., LIÉBANA, E., CARRERA, J., VILAFRANCA, M., CASAL, J., ARANAZ, A., ALTIMIRA, J., VIDAL, D., MARCO, A., PANELL, J.M., MATEOS, A., DOMINGUEZ, L. Eficácia comparativa de la intradermorreacción y la prueba de liberación de gama-interferón para el diagnóstico de La tuberculosis bovina en una prueba de campo. **Medicina Veterinaria**, v.12, n.5, p.307-317, 1995.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAO Statistic Series**, v.47, n.117, 1993.

FERNANDES, A. C. C., TENÓRIO, T. G. S.; SILVA, T. I. B.; MENDES, E. I.; BAPTISTA FILHO, L. C. F.; MELO, L. E. H. Leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos: estudo retrospectivo e prospectivo da ocorrência em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.4, Supl. 3, 2011.

FERNANDES, M. A. Avaliação das características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de cabras, das raças Saanen e Alpina, criadas no Estado de São Paulo. 2002. 152f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

FERRER, J. F. Bovine leukosis: natural transmission and principles of control. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.175, p.1281–1286, 1979.

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

FIGUEIREDO, S. M.; ROCHA, V. C. M.; HIGINO, S. S. S.; BATISTA, C. S. A.; ALVES, C. J.; CLEMENTINO, I. J.; AZEVEDO, S. S. Tuberculose bovina no Estado da Paraíba: estudo retrospectivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.9, p.712-716, 2010.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; LOPES, S. T. A.; MOREIRA, T. C. Eficácia da chave linfocitária de Bendixen em relação à imunodifusão em gel de ágar (IDGA) no diagnóstico da Infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB). **Centro de Ciências Rurais**, v.20, n.3-4, p.309-314, 1990.

FRANCIS, J.; SEILER, R. J.; WILKIE, W. I.; O'BOYLE, D.; LUMSDEN, M. J.; FROST, A. J. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. **Veterinary Record**, v.103, p.420–435, 1978.

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

GARINE-WICHATITSKY, M.; CARON, A.; GOMO, C.; FOGGIN, C.; DUTLOW, K.; PFUKENYI, D.; LANE, E.; LE BEL, S.; HOFMEYR, M.; HLOKWE, T.; MICHEL, A. Bovine Tuberculosis in Buffaloes, Southern Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.5, p.884-885, 2010.

GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUS, M.; BURTEAU, C.; NIGRO, A.; VANDERMEERS, F.; BALON, H.; BOUZAR, A.; DEFOICHE, J.; BURNY, A.; REICHERT, M.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Mechanism of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus prospects for a novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, v.4, n.18, 2007.

GLATMAN-FREEDMAN, A.; CASADEVALL, A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.514–532, 1998.

GOFF, B. S. L. Effect of dexamethasone treatment of tuberculous cattle on results of the gamma-interferon test for *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.53, p.39-47, 1996.

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

GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.137-151, 1994.

GRIVICICH, I. ; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.

GUTIÉRREZ, G.; ALVAREZ, I.; FONDEVILA, N.; POLITZKI, R.; LOMÓNACO, M.; RODRÍGUEZ, S.; DUS SANTOS, M.J.; TRONO, K. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. **Veterinary Microbiology**, v.137, Iss.3-4, n.12, p.224-234, 2009.

HEENEY, J.; VALLI, P.; JACOBS, R.; VALLI, V. Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. **Laboratory Investigation**, v.66, p. 608–617, 1992.

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

IÓVINE, E.; SELVA, A. A. El laboratorio en la clinica. Buenos Aires: Panamericana, 1975.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Lea & Febiger. Philadelphia, 1993. 417p.

JAVED, M. T.; AHMAD, L.; IRFAN, M.; ALI, I.; KHAN, A.; WASIQ, M.; FAROOQI, F. A.; LATIF, M. S.; CAGIOLA, M. Haematological and Serum Protein Values in Tuberculin Reactor and Non-Reactor Water Buffaloes, Cattle, Sheep and Goats. **Pakistan Veterinary Journal**, v.30, n.2, p.100-104, 2010.

JEON, B.; KIM, S.; JE, S.; KWAK, J.; CHO, J.; WOO, J.; SEO, S.; SHIM, H.; PARK, B.; LEE, S.; CHO, S. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using milk samples as a potential screening test of bovine tuberculosis of dairy cows in Korea. **Research in Veterinary Science**, v.88, p.390–393, 2010.

JONES, M. L.; ALLISON, R. W.. Ruminant Complete Blood Cell Count. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.23, p.377–402, 2007.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6a ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415p.

KANTOR, I. N.; AMBROGGI, M.; POGGI, S.; MORCILLO, N.; TELLES, M. A. D. S.; RIBEIRO, M. O.; TORRES, M. C. G.; POLO, C. L.; RIBÓN, W.; GARCÍA, V.; KUFFO, D.; ASENCIOS, L.; CAMPOS, L. M. V.; RIVAS, C.; WAARD, J. H. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. **Tuberculosis**, v.88, p.358–365, 2008.

KLEEBOERG, H. H. The tuberculin test in cattle. **Journal of South African Veterinary Medical Association**, v.31, p.213–225, 1960.

KNUTH, P. VOLKMANN, O. Untersuchungen über die Lymphknotentuberculose des Rindes. **Zeitschrift für Infektionskrankheiten Parasitäre Krankheiten und Hygiene**, v.17, p.393-4679, 1916.

LANGENEGGER, J.; HERRMANN, G. P. Comparação do diagnóstico alérgico da tuberculose bovina entre a tuberculinização comparada e o teste de Stormont. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.14, n.2/3, p.49-55, 1994.

LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C. H. Micobactérias atípicas isoladas de amígdalas e linfonodos de bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.11, p.37-42, 1976.

LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C. H.; MOTA, P. M. P. C.; LEITE, R. C. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.1, n.4, p.45-149, 1981.

LAVAGNOLI, M. R.; DE AMORIM, B. M.; MACHADO, G. P.; DE CASTRO DEMONER, L.; ZANINI, M. S.; DE PAULA ANTUNES, J. M. A. Tuberculosis in bovines from Espírito Santo state. **Veterinaria e Zootecnia**, v.17, n.1, p.71-78, 2010.

LEGG, J.; MAUNDER, J. C. J. Further tests with synthetic medium tuberculins. **Australian Veterinary Journal**, v.16, n.68, p.68-83, 1940a.

LEGG, J.; MAUNDER, J. C. J. Synthetic medium tuberculins the single intradermal caudal fold test. **Australian Veterinary Journal**, v.16, n.50, p.50-67, 1940b.

LEGG, J.; MAUNDER, J. C. J. Synthetic medium tuberculins: the behavior of the very advanced case of tuberculosis. **Australian Veterinary Journal**, v.17, n.6, p.229-232, 1941.

LEITE, R. C.; LOBATO, E. I. P.; CAMARGOS, M. F. Leucose Enzoótica Bovina. **Revista CFMV**, n.24, p. 20-25, 2001.

LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; ALDWELL, F. E.; MCNAIR, J.; NEILL, S. D.; SMYTH, A. J.; POLLOCK, J. M. Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen-stimulated T cells. **Immunology**, v.99, p.23-29, 2000.

LILLIE, R. D.; CONNLS, H. J. **Biological Stain**. 9 ed. Baltimore: Willians and Wilkins, 1977.

LILLIE, R. D.; CONNLS, H. J. **Enciclopédia of chemical technology**. Vol XV, 3 ed. New York: Wiley-Inter Science, 1981.

LIMA, A. O. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

LOBUE, P. A.; ENARSON, D. A.; THOEN, C. O. Tuberculosis in humans and animals: an overview. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.14, p.1075-1078, 2010.

LORENZ, R. J.; STRAUB, O. C. **The epidemiology of enzoótic bovine leukosis**. In: BURNY, A.; MAMMERICKX, M. eds. *Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus*. Boston, Martinus Nijhoff, 1987. p.51-68.

MAMMERICKX, M. **The immunodiffusion tests for the detection of bovine leukemia virus-infected animals**. In: BURNY, A; MAMMERICKX, M. eds. *Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus*. Boston, Martinus Nijhoff, 1987. p.195-200.

MAMMERICKX, M.; CORMANN, A.; BURNY, A.; DEKEGEL, D.; PORTETELLE, D. Erradication of enzootic bovine leukosis based on the detection of the disease by the GP immunodifusion test. **Annales de Recherches Veterinaires**, v.9, p.885-94, 1978.

MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; KETTMANN, R.; GHYSDAEL, J.; BURNY, A.; DEKEGEL, D. Diagnostic tests of bovine leukemia. Comparison between and hematological test and the serological diagnosis. **European Journal of Cancer**, v.12, p.433-9, 1976.

MARUYAMA, K.; FUKUSHIMA, T.; MOCHIZUKI, S. Cross-reactive antibodies to BLV and HTLV in bovine and human hosts with retrovirus infection. Amsterdam. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.22, p.265-73, 1989.

MATOS, P. F.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre os resultados do teste de Elisa e da imunodifusão em gel de ágar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, n.3, p. 171-179, 2005.

MATSUMURA, K.; INOUE, E.; OSAWA, Y.; OKAZAKI, K. Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan. **Virus Research**, v.155, Issue 1, p.343-348, 2011.

MAUNDER, J.C.J. The control of tuberculosis in Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v.24, p.313-319, 1948.

MEDEIROS, L. S.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E. E. S.; LILENBAUM, W. New diagnostic of bovine tuberculosis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n.3, 2010.

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 dos bovinos em rebanhos produtores de leite C do Estado de São Paulo**. USP, 1999, São Paulo – Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo.

MELO, L. E. H. **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.; ALMEIDA, A. V.; SILVA, J. Á. A.; TENÓRIO, T. G. S.; MELO, M. T. An alert for the zoonotic character of the Bovine Tuberculosis. In: **I Encontro Nacional de Tuberculose, Ministério da Saúde, Rede Brasileira de Pesquisa em tuberculose, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.** Brasília, Anais.... 2004.

MELO, L. E. H.; FERNANDES, A. C. C.; SILVA, T. I. B.; TENÓRIO, T. G. S.; MENDES, E. I.; BAPTISTA FILHO, L. C. F. Estudo retrospectivo e prospectivo da intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos em rebanhos leiteiros do Estado de Pernambuco. In: **Seminário Nacional Sobre Brucelose e Tuberculose Animal (SNBTA).** 2010. Belo Horizonte; 2010.

MENDES, E. I. **Aspectos sorológicos e hematológicos como recursos auxiliares ao diagnóstico da leucose enzoótica dos bovinos em rebanhos leiteiros de Pernambuco.** Recife; Dissertação (Mestrado): Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2002.

MENDES, E. I.; FERNANDES, A. C. C.; SÁ, L. M. E.; SILVA, T. I. B.; BARROS, A. D.; OLIVEIRA, C. M. M.; ALBUQUERQUE, M. S.; SILVA, F. F.; MELO, L. E. H. Prevalência da leucose enzoótica e da tuberculose dos bovinos em rebanhos leiteiros do Estado de Pernambuco. In: **35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET);** 2008; Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária; 2008.

MENDES, E. I.; MELO, L. E. H.; TENÓRIO, T. G. S.; SÁ, L. M.; SOUTO, R. J. C.; FERNANDES, A. C. C.; SANDES, H. M. M.; SILVA, T. I. B. Intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose em bovinos leiteiros do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.1-8, 2011.

MERKT, H.; GIUDICE, J. C. O.; MULLER, J. A. Leucose bovina: concepção moderna e primeira verificação da doença no Rio Grande do Sul. **Revista da Escola de Agronomia e Veterinária do Rio Grande do Sul**, v.2, n.3, p.7-19, 1959.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de Laboratório Veterinária Interpretação e Diagnóstico.** 1. ed., São Paulo: Roca., p. 27-29, 1995.

MICHEL, A. L.; MULLER, B.; VAN HELDEN, P. D.. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? **Veterinary Microbiology**, v.140, p.371-381, 2010.

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

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

MONAGHAN, M. L.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, J. D.; KADZA, J. F.; QUINN, P. J. O teste tuberculínico. **Veterinary Microbiology**, v.62, p.111-124, 1997.

MORRIS, D. D. Alterações no leucograma. In: SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2006, p.420-426.

MORRIS, D. D.; LARGE, S. M. Alterações no leucograma. In: SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Veterinária de Grandes Animais**. São Paulo: Manole, p.437-446, 1990.

MOTA, P. M. P. C.; LEITE, G. O.; CIRIACO, N.; PESSOA, H. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cão. In: **52ª Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária**, 10 Congresso Paulista de Buiatria e 4a EXPOVET. Resumo. São Paulo-SP, 1997.

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

MUSCOPLAT, C. C.; ALHAJI, I.; JOHNSON, D. W.; POMEROY, K. A.; OLSON, J.M.; LARSON, V. L.; STEVENS, J. B.; SORENSEN, D. K. Characteristics of lymphocyte responses to phytomitogens: comparison of responses of lymphocytes from normal and lymphocytotic cows. **American Journal of Veterinary Research**, v.35, p.1053-1055, 1974.

NIKBAKHT, G. H.; RABBANI, M.; EMAM, M.; REZATOFIHI, E. Serological and genomic detection of bovine leukemia virus in human and cattle samples. **International Journal of Veterinary Research**, v.4, p.253-258, 2010.

NUOTIO, L.; RUSANEN, H.; SIHVONEN, L.; NEUVONEN, E. Eradication of enzootic bovine leucosis from Finland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.59, p.43-49, 2003.

OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. **Código Zoosanitário Internacional**. 2008. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 11 jan. 2008, on line.

OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. Paris: OIE; 2004. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>>. Acesso em 18 dez. 2011, on line.

OLIVEIRA, I. A. S.; MELO, H. P. C.; CÂMARA, A.; DIAS, R. V. C.; SOTO-BLANCO, B. Prevalência de tuberculose no rebanho bovino de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.6, 2007.

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, p. 3-11, 1987.

O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v.76, Supp. 1, p.1-46, 1995.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. **Plan de acción para la erradicación de la tuberculosis bovina en las Americas**. 41p (OPS/OMS-HPV/TUB/113/92), 1992.

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

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). **La inspeccion post mortem de bovinos reactivos a la prueba de tuberculina**. 1962. 31p. (Publicaciones científicas, n. 68).

ORLIK, O.; SPLITTER, G. A. Progression to persistent lymphocytosis and tumor development in bovine leukemia virus (BLV)-infected cattle correlates with impaired

proliferation of CD4⁺ T cells in response to gag- and env-encoded BLV proteins. **Journal of Virology**, v.70, p.7584–7593, 1996.

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, v.163, n.2, p.115-127, 2002.

POLLOCK, J. M.; RODGERS, J. D.; WELSH, M.D.; MCNAIR, J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. **Veterinary Microbiology**, v.112, p.141–150, 2006.

POLLOCK, J. M.; WELSH, M.D.; MCNAIR, J. Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.108, p.37–43, 2005.

PORTUGAL, M. A. S. C.; GIORGI, W.; SIQUEIRA, P. A. Prevalência de tuberculose em rebanho bubalino (*Bubalus bubalis* Var. *Bubalis-Linneus*, 1758) no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 38, n.4, p.231-238, 1971.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária – Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro., 2002. 1737 p.

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

RESSANG, A. A.; ELLENS, D. J.; MASTENBROEK, N.; JANICE, J. Q.; MILLER, M.; VAN DER MAATEN, M. J. Studies on bovine leukaemia. II - Haematological, serological, virological and electron microscopical diagnosis. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, v.23, p.566-79, 1976.

RIET-CORREA, F.; GARCIA, M. Tuberculose. In: RIET CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. (Org.). **Doenças dos ruminantes e equinos**. 2.ed. São Paulo, 2001, v.1, p.351-362.

ROSEMBERGER, G. **Enfermedades de los bovinos**. Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur, 1983. v.2. p.139-51.

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

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

ROXO, E. Tuberculose bovina: Revisão. (Bovine Tuberculosis: review). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.63, n.2, p.91-97, 1996.

SALFINGER, M.; PFYFFER, G. E. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.13, n.11, p.961–979, 1994.

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

SANTOS, H. P. **Leucose enzoótica bovina: estudo epidemiológico na bacia leiteira do Estado do Maranhão e aperfeiçoamento do diagnóstico**. Recife; Tese (Doutorado): Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2010.

SANTOS, J. A.; PINHEIRO, P. V.; SILVA, L. J. Linfossarcoma com lesões da língua e das câmaras cardíacas em bovino. Anais... **Escola Fluminense de Medicina Veterinária**, v.2, p.27-35, 1959.

SHETTAR, M.; NALINI, T. S.; KUMAR, K. R. A.; RAVIKUMAR, P.; AZEEMULLA, H. R. Hematological and biochemical studies in tuberculin test positive reactors. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.2, n.4, p.16-22, 2011.

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, P. H.; HASHIMOTO, Y. **Interpretação Laboratorial do Eritrograma**. São Paulo: Lovise, 1999. 197 p.

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. 2001. 176p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVA, R ; ALMEIDA JÚNIOR, G. S. ; CURY, J. R. L. M. ; AMARAL, J. B ; PERENHA, R. A ; LOCATELLI, L ; MATIAS, V ; SACCO, S. R . Leucograma de estresse. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, p. 1-4, 2008.

SOUZA, A. V.; SOUSA, C. F. A.; SOUZA, R. M.; RIBEIRO, R. M. P.; AFONSO L. O. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Revista Higiene Alimentar**, v.59, 2002.

SOUZA, F.N; LATORRE, A. O.; CANICEIRO, B. D.; SAKAI, M.; KIELING, K.; BLAGITZ, M. G.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Proliferação de linfócitos e apoptose de células CD5+ de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.5, p.1124-1130, 2011.

SPINOLA, T. R. **Correlação entre a atipia linfocitária e o perfil imunológico de animais infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina** 2010. 84p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

SWENSON, M. J. Propriedades fisiológicas e constituintes químicos e celulares do sangue. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p.19-43.

TALARICO, S.; KASHEF; ZHANG, X.; MUKASA, L. N.; ZHANG, L.; MARRS, C. F.; CAVE, M. D.; BATES, J. H.; YANG, Z. Identification of factors for tuberculosis transmission via an integrated multidisciplinary approach. **Tuberculosis**, v.91, p244-249, 2011.

TENÓRIO, T. G. S. **Aspectos sanitários da leucose enzoótica, da leptospirose e da brucelose dos bovinos em rebanhos leiteiros de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado). Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2003.

THOEN, C. O.; LOBUE, P.A.; KANTOR, I. N. Why has zoonotic tuberculosis not received much attention? **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.14, n.9, p.1073–1074, 2010.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582p.

TRONO, K. G.; PÉREZ-FILGUEIRA D. M.; DUFFY, S.; BORCA, M. V.; CARRILLO, C. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. **Veterinary Microbiology**, v.83, p.235-248, 2001.

TRUEBLOOD, E. S.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; DAVIS, W. C.; STONE, D. M.; MCELWAIN, T. F. B-lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. **Journal of Virology**, v.72, n.4, p.3169-3177, 1998.

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.

WARDS, B.J.; COLLINS, D.M.; LISLE, G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissue by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v.43, n.2-3, p.227-240, 1995.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J.. **Schalm's Veterinary Hematology**. Wiley Blackwell, Ames, 2010. 1232p.

WHIPPLE, D.L.; BOLIN, C. A.; DAVIS, A. J.; JARNAGIN, J. L.; JOHNSON, D. C.; NABORS, R. S.; PAYEUR, J.B.; SAARI, D. A.; WILSON, A. J.; WOLF, M. M. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, p.415–419, 1995.

WIESNER, E. **Enfermedades del ganado bovino**. Zaragoza, Acribia, 1973. p. 123-9.

WILESMITH, J. W. **Algumas observações sobre a epidemiologia da infecção por vírus da leucose bovina num grande rebanho leiteiro**. Trad. de Paulo Ponce de Leon Filho e Lúcio

José Gomes Pereira. Recife, Serviço de Defesa Sanitária Animal, 1980. 16p. (Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva, 1).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) with the participation of FAO. Geneve, 1993. 27p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis. Fact Sheet No 104. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/>>. Acesso em: 12 dez. 2011.

WYATT, C. R.; WINGETT, D.; WHITE, J. S.; BUCK, C. D.; KNOWLES, D.; REEVES, R. Persistent infection of rabbits with bovine leukemia virus associated with development of immune dysfunction. **Journal of Virology**, v.63, p.4498-4506, 1989.

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

YONEDA, T.; ELLNER, J. J. CD4(+) T cell and natural killer cell-dependent killing of *mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v.158, p.395–403, 1998.