

RONIERY CARLOS GONÇALVES GALINDO

**DIAGNÓSTICO BIOMOLECULAR E NÍVEIS SÉRICOS DA β 2-
MICROGLOBULINA EM BOVINOS, NATURALMENTE INFECTADOS
PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA.**

RECIFE

2014



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

RONIERY CARLOS GONÇALVES GALINDO

**DIAGNÓSTICO BIOMOLECULAR E NÍVEIS SÉRICOS DA β 2-
MICROGLOBULINA EM BOVINOS, NATURALMENTE INFECTADOS
PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA.**

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

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo

Co-orientadora: Prof^ª Dra. Eneida Willcox Rêgo

RECIFE

2014

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

**DIAGNÓSTICO BIOMOLECULAR E NÍVEIS SÉRICOS DA β -
MICROGLOBULINA EM BOVINOS, NATURALMENTE INFECTADOS
PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA.**

Tese de Doutorado elaborada por

RONIERY CARLOS GONÇALVES GALINDO

Aprovada em 30/01/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo
Orientador - Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Silvio Romero de Oliveira Abreu
Faculdade de Medicina de Veterinária do CESMAC

Profª Dra. Néria Vânia Marcos dos Santos
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Departamento de Biologia da UFRPE

Prof. Dr. Huber Rizzo
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

DEDICATÓRIA

“Dedico aos meus pais, Maria Zita e Diassis Bastos Gonçalves (*in memoriam*) e ao compadre Tom Menezes (*in memoriam*).”

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos momentos mais difíceis em seus braços me guiou, chegar até aqui, não foi fácil, agora só me resta seguir em frente, buscar meus objetivos. Valeu a pena os dias de angústias, de cansaço, enfado e exaustão.

Ao meu pai, Diassis Bastos Gonçalves (*in memoriam*), pelos conselhos, ensinamentos, amor e perseverança, e sempre dedicado ao desenvolvimento digno de seus filhos, sentimos a sua ausência!

À minha mãe, Maria Zita, pela dedicação incansável, sempre demonstrando alegria e amor aos seus filhos e netos, estará sempre comigo!

À minha eterna namorada e esposa Celina Galindo, pelos anos de dedicação, para manter a união de nossa família. Eu te amo!

Ao meu filho, Carlos René de Albuquerque Galindo, o melhor presente da minha vida, incentivo da minha luta pelos ideais. Eu te amo!

Aos meus irmãos Roberto Carlos, Rogério José, Romualdo Diassis e Robson José. Sinto saudade dos momentos em que estamos juntos. Amo vocês!

Ao professor orientador e amigo, Lúcio Esmeraldo Honório de Melo, pelo carinho e compreensão dedicados a mim e minha família. Jamais o esquecerei!

À professora orientadora e amiga, Eneida Willcox Rêgo, exemplo de dedicação à família e incentivadora, nas minhas adversidades, madrinha de meu filho Carlos René, eu lhe admiro!

Ao professor, amigo, Paulo Roberto Eleutério de Souza, pelos ensinamentos e disponibilidade do Laboratório Genoma, onde realizei a PCR das amostras.

Aos amigos Luiz Carlos Fontes Baptista Filho, Leandro Cavalcanti, Diêgo Henrique Araújo, Artur Cesar de Carvalho Fernandes, Tamyres Izarely, Huber Rizzo e Jéssica Andrade, pelo apoio prestado.

Ao professor José Sebastião dos Santos, Diretor Geral da Faculdade Pio Décimo, exemplo de pessoa humilde, que me confiou um dos seus maiores patrimônios, o primeiro curso de Medicina Veterinária do Estado de Sergipe, meu sincero agradecimento!

A todos os Professores do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo conhecimento transmitido no decorrer da minha formação acadêmica.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo alto nível das disciplinas ministradas para a obtenção deste título.

Enfim, a todos, que participaram de forma direta ou indireta, desta etapa de minha vida, registro sincero agradecimento.

Ao Governo Federal, que por intermédio do CNPq e da CAPES proporcionou o incentivo financeiro ao desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

RESUMO

A Leucose Enzoótica dos bovinos tem importância econômica, por levar ao óbito ou predispor a infecções secundárias, além de prejuízos na produção, condenação de carcaças, restrição na comercialização dos animais ou de seus produtos e queda do desempenho reprodutivo. Tudo isso faz com que na buiatria, os estudos voltados à identificação de bovinos infectados pelo Vírus da Leucose Bovina (VLB) e a elucidação da sua ação patogênica no sistema imune se intensifique, mediante utilização de novas técnicas de diagnóstico. Assim, objetivou-se com esse trabalho comparar as técnicas PCR e IDGA no diagnóstico de bovinos naturalmente infectados pelo VLB e avaliar a utilidade da concentração sérica da β 2-Microglobulina (β 2-M), como recurso diagnóstico da evolução da infecção pelo VLB. Das 301 amostras analisadas pela IDGA e PCR, 234 (77,7%) apresentaram resultados concordantes e o índice kappa definido como aceitável. A PCR apresentou índice de sensibilidade de 89,5%, especificidade 76,0%, valor preditivo positivo 35,1% e valor preditivo negativo 98,0%. A concentração da β 2-M nas 60 amostras analisadas foi mais elevada no grupo de bovinos soropositivos do que nos soronegativos para o VLB, no entanto, a diferença significativa não foi registrada. O resultado da correlação das 60 amostras entre os leucócitos totais e β 2-M no grupo soropositivo foi 0,078 ($p=0,681$) e 0,042 ($p=0,826$) no grupo negativo. Os valores relativos à quantidade de linfócito/mm³ com β 2-M foi 0,200 ($p=0,289$) no grupo soropositivo e 0,172 ($p=0,363$) no grupo soronegativo. Portanto, as correlações foram baixas e não significativas. Mediante os resultados obtidos da correlação entre a β 2-M, os leucócitos totais e linfócitos em bovinos infectados pelo VLB; pode-se inferir nesse estudo que a correlação não se mostrou eficiente para ser utilizada como recurso de diagnóstico precoce da infecção pelo VLB. Concluí-se também, que a PCR utilizando-se os *primers* da longa região terminal do vírus foi eficaz na detecção de bovinos infectados pelo VLB, sugerindo que seja utilizado como teste confirmatório, visto que o valor preditivo negativo foi alto.

Palavras-chave: PCR, teste diagnóstico, marcador biológico.

ABSTRACT

The enzootic bovine leukosis has economic importance, because it is the cause of death or predisposition to secondary infections, production losses, carcass condemnation, marketing restrictions on the animals or their products and reproductive performance failure. These aspects are the reason studies looking for identify cattle infected bovine leukosis virus (BLV) and the elucidation of the pathogenic action of the immune system to intensify, through the use of new diagnostic techniques. Thus, the aim of this work is to compare the AGID and PCR techniques in the diagnosis of cattle naturally infected with BLV and evaluate the usefulness of serum concentration of β 2-microglobulin (β 2-M) as a diagnostic feature of the evolution of BLV infection. The results of the 301 samples analyzed by AGID and PCR, 234 (77.7%) were similar and the kappa was considered as acceptable. PCR showed a sensibility of 89.5%, specificity 76.0%, positive predictive value 35.1% and negative predictive value 98.0%. The concentration of β 2 -M in the 60 analyzed samples was higher in the group of calves than in seronegative individuals seropositive for the BLV, however, significant difference was not recorded. The correlation result from 60 samples of total leukocytes and β 2-M in the seropositive individuals was 0.078 ($p = 0.681$) and 0.042 ($p = 0.826$) in the negative group. The values to the amount of lymphocyte/mm³ with β 2 -M was 0.200 ($p = 0.289$) in seropositive and 0.172 ($p = 0.363$) in the seronegative group. Therefore, the correlations were low and not significant. From the results obtained from the correlation between β 2-M, total leukocytes and lymphocytes in cattle infected with BLV can be inferred in this study that the correlation was not efficient to be used as a resource for early diagnosis of BLV infection. It was also conclude that PCR using primers from the long terminal region of the virus was effective in detecting cattle infected with BLV, suggesting that it is using as a confirmatory test, because the negative predictive value was high.

Palavras-chave: PCR, diagnostic test, biomarker.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 O Vírus da Leucose Bovina.....	17
3.2 Aspectos epidemiológicos e de prevalência da Leucose Enzoótica Bovina....	18
3.3 Aspectos clínicos na Leucose Enzoótica Bovina.....	24
3.4 Aspectos diagnósticos e de controle da Leucose Enzoótica Bovina.....	27
3.5 beta 2-Microglobulina.....	29
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
5. ARTIGO I.....	46
6. ARTIGO II.....	60
7. ARTIGO III.....	79
8. ARTIGO IV.....	86
9. ARTIGO V.....	93
APÊNDICES.....	102

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 Esquema de um retrovírus.....	17
FIGURA 2 Representação esquemática dos mecanismos de transmissão da LEB.....	19
FIGURA 3 Linfonodo subilíaco esquerdo hipertrofiado.....	102
FIGURA 4 Linfonodo pré-escapular direito hipertrofiado.....	102
FIGURA 5 Linfonodo pré-escapular esquerdo hipertrofiado.....	103
FIGURA 6 Linfonodo submandibular direito hipertrofiado.....	103

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1	Valores médios de leucócitos e linfócitos dos animais soropositivos para VLB, considerados portadores de leucocitose por linfocitose..... 26
TABELA 2	Concentração e leitura da absorbância da β 2-microglobulina de cada amostra do grupo de bovinos VLB-positivos..... 104
TABELA 3	Concentração e leitura da absorbância da β 2-microglobulina de cada amostra do grupo de bovinos VLB-positivos..... 105

LISTA DE QUADROS

	Pág.
QUADRO 1 Retrospectiva da ocorrência da infecção pelo VLB no Brasil.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LEB	Leucose Enzoótica dos Bovinos (Enzootic Bovine Leukosis)
VLB	Vírus da Leucose Bovina (Bovine Leukosis Virus)
RNA	Ácido ribonucléico (ribonucleic acid)
DNA	Ácido desoxirribonucléico (deoxyribonucleic acid)
β 2-M	beta 2-microglobulina (β 2-microglobulin)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático em meio sólido (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
IDGA	Imunodifusão em Gel de Ágar (Ágar Gel Immunodiffusion)
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal (World Organisation for Animal Health)
MCA	Antígeno Mucoide associado ao Carcinoma (Mucoid Antigen associated with Carcinoma)
PSA	Antígeno Prostático Específico (Prostate-Specific Antigen)
B-HCG	Gonadotrofina Coriônica Humana (Human Chorionic Gonadotropin)
LDH	Lactato Desidrogenase (Lactate Dehydrogenase)
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus)
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Acquired Immunodeficiency Syndrome)

1. INTRODUÇÃO

O constante aumento da demanda por alimentos, em face ao rápido crescimento da população brasileira, torna cada vez mais importante o papel dos animais de produção como fonte de alimento para o homem (PEIXOTO *et al.*, 2004).

Neste contexto, estudos têm sido propostos com a intenção de melhorar a produtividade, aliada ao aprimoramento da qualidade sanitária do rebanho, visando a elucidação e implantação de medidas estratégicas à profilaxia de possíveis enfermidades que comprometem a produção (DEL FAVA e PITUCO, 2004).

Conforme as normas da Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE, 2008), a preocupação com as doenças infecciosas é constante e a Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) merece destaque em decorrência dos prejuízos econômicos resultantes do descarte de bovinos sororreagentes ou com linfossarcoma e da restrição ao comércio internacional dos animais ou mesmo sêmen e embriões.

A LEB é uma doença infecto-contagiosa, de evolução crônica, etiologia retroviral, com expressiva sintomatologia clínica, e sua patogenia origina alterações na atividade do sistema linfoide, com proliferação orgânica de massas neoplásicas em animais de dois a oito anos de idade, em aproximadamente 2 a 5% dos animais portadores, e marcante linfocitose persistente com predominância de linfócitos atípicos em até 30% dos animais infectados (FERRER, 1979; D'ANGELINO, 1991; MELO, 1999; RADOSTITS *et al.*, 2002).

O diagnóstico da LEB é realizado pelos testes indiretos, tais como a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático em fase sólida (ELISA) para detecção de anticorpos séricos contra as proteínas virais gp51 e p24 (MILLER e VAN DER MAATEN, 1977; SHETTIGARA *et al.*, 1986; MATOS *et al.*, 2005).

No Brasil, desde os anos 70, investigações clínico-epidemiológicas, com a utilização da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) vêm caracterizando a LEB como um problema enzoótico, apresentando taxas de prevalência na região Nordeste variando entre 4,07% em Sergipe (BATISTA *et al.*, 2011) e 53,8% no Estado do Maranhão (SANTOS *et al.*, 2011).

Entretanto, quando se pretende investigar doenças infecciosas de impacto na saúde animal e sua produção, é imprescindível a aplicação de teste diagnóstico com alto valor de sensibilidade e especificidade, e que detecte a infecção na fase inicial (ASTUDILLO &

KANTOR, 1981). Daí a importância da biologia molecular, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) como prova de diagnóstico da LEB (CAMARGOS, 2001).

Atualmente, sabe-se que os retrovírus são capazes de comprometer a resposta imunológica através dos mecanismos de evasão, conduzindo a defesa ineficaz do sistema imune e alterações linfoproliferativas (MELO, 1999). Na Medicina humana, a proteína Beta 2-microglobulina (β 2-M) tem sido descrita como biomarcador da progressão clínica da leucemia e retrovíroses, principalmente quanto a capacidade de prognosticar a evolução da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) para Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - SIDA (PASCALE *et al.*, 1997; ALMEIDA, 2009).

A proteína β 2-M é detectada normalmente sob baixas concentrações no soro humano e também no de animais. Os níveis séricos aumentam em consequência da ativação imunológica e da destruição de células linfoides, como ocorre em algumas doenças virais, principalmente quando se trata de retrovírus ou vírus oncogênico (BERGGARD, 1968; EVRIN, 1972; HOFMANN, *et al.*, 1992).

Assim, a proposta de aplicar a PCR para detectar bovinos infectados pelo VLB, incide na necessidade de reconhecer a verdadeira magnitude dessa insidiosa doença nos rebanhos do Estado de Sergipe. Além disso, o estudo da concentração da β 2-M associado às alterações leucométricas, resultantes do progresso da infectividade do VLB, poderia permitir a instituição de novas ferramentas a fim de prognosticar a evolução dessa infecção nos bovinos, disponibilizando mais um recurso clínico de diagnóstico para o controle da LEB.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar as técnicas PCR e IDGA no diagnóstico de bovinos naturalmente infectados pelo VLB e avaliar a utilidade clínica da concentração sérica da β 2-microglobulina associada às alterações leucométricas, como recurso de diagnóstico da evolução da infecção pelo VLB.

2.2 Específicos

- Determinar a frequência de bovinos soropositivos para o VLB, através da técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA);
- Detectar bovinos positivos para o VLB, através da amplificação do DNA genômico pela PCR;
- Comparar a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) na detecção de animais infectados pelo VLB.
- Formar dois grupos quantitativamente homogêneos com os animais experimentais, a partir do resultado obtido pela técnica da IDGA na detecção do VLB, assim nomeados VLB-positivos (infectados) e VLB-negativos (não infectados), respectivamente para os bovinos infectados e não infectados pelo VLB;
- Determinar as concentrações da β 2-M nos bovinos clinicamente sadios no grupo total e por faixa etária;
- Quantificar a proteína β 2-M através do ensaio imunoenzimático em fase sólida (ELISA) no soro de bovinos VLB-positivos e VLB-negativos;
- Verificar se existe ou não diferença significativa nos resultados da β 2-M entre os grupos VLB-positivos e VLB-negativos;
- Verificar se existe ou não diferença significativa nos resultados da β 2-M entre as faixas etárias nos grupos VLB-positivos e VLB-negativos;
- Correlacionar às variáveis leucocitárias e os níveis de β 2-M, por faixa etária e nos grupos VLB-positivos e VLB-negativos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Vírus da Leucose Bovina (VLB)

A Leucose Enzoótica dos Bovinos é uma doença viral, caracterizada por expressiva sintomatologia clínica. O Vírus da Leucose Bovina é um retrovírus da subfamília *Oncovirinae* e da família *Retroviridae*, que se caracteriza por possuir uma enzima denominada transcriptase reversa, cuja função é converter o ácido ribonucléico (RNA) viral em ácido desoxirribonucléico (DNA), fazendo com que o material genético do vírus, agora composto de DNA, se integre ao material genético da célula hospedeira (FERRER, 1979; D'ANGELINO, 1991; MELO, 1999; REBHUN, 2000; RADOSTITS *et al.*, 2002).

A forma infectante do vírus (Vírion) é esférica, apresenta um diâmetro de 80-130nm, o capsídeo apresenta simetria icosaédrica e é envolvido pelo envelope derivado da membrana celular do hospedeiro, onde se observam projeções de glicoproteínas, conforme ilustrado na figura 1 (FENNER *et al.*; 1993, AZEDO, 2010).

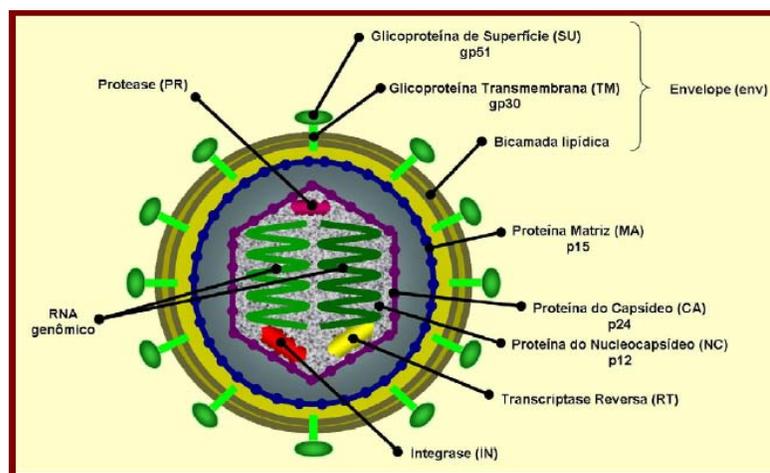


Figura 1: Esquema de um retrovírus.
Fonte: Azedo (2010).

Camargos (2001) reporta que a ligação da proteína do envelope gp51 do VLB ao receptor específico na célula do hospedeiro é considerada a etapa inicial da infecção, como também, atribue ao vírus o grau de infectividade, além do mais, o diagnóstico sorológico da LEB deve ser realizado pela detecção de anticorpos para a glicoproteína gp51 e a proteína do capsídeo viral p24.

Altaner *et al.* (1993) ilustram a importância biológica das glicoproteínas presentes no envelope dos retrovírus ao participarem do ciclo de replicação, elas modulam a adsorção do vírus à célula alvo, determinando o tropismo e a especificidade viral.

3.2 Aspectos epidemiológicos e de prevalência da LEB

A LEB foi registrada pela primeira vez por Bollinger no século XIX, e difundiu-se pela Europa, sobretudo após a segunda Guerra Mundial (BENDIXEN, 1965; FERRER, 1979; BURNY *et al.*, 1988).

De acordo com Radostits *et al.* (2002), bovinos soronegativos criados com animais soropositivos, num sistema de criação intensivo podem transmitir a doença, entretanto, para que isso ocorra, os animais devem estar a uma distância pequena um do outro e muitas vezes ter um contato íntimo. Desse modo, a transmissão através do contato das mucosas com secreções parece desempenhar um papel secundário na difusão da infecção (MORAES *et al.*, 1996).

Conforme ilustrado na Figura 2, a transmissão horizontal é destacada por diversos autores como sendo a principal via de propagação da LEB nos rebanhos, principalmente por transferência iatrogênica, através de fômites, equipamentos utilizados durante os procedimentos cirúrgicos, transfusões sanguíneas e em práticas de pré-imunização ante a Tristeza Parasitária Bovina (TPB), desde que possam transmitir linfócitos infectados com o VLB de um animal doente para um animal sadio (DIGIACOMO, 1992; MORAES *et al.*, 1996; HÜBNER *et al.*, 1997; RADOSTITS *et al.*, 2002; BIRGEL JÚNIOR *et al.*, 2006).

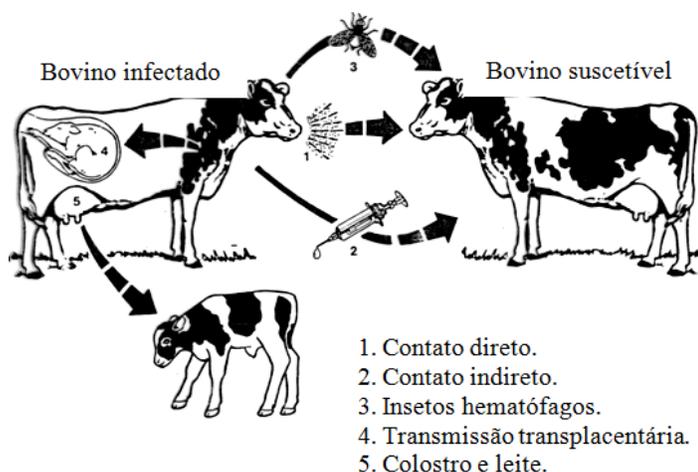


FIGURA 2. Esquema sobre os mecanismos de transmissão da LEB.
Fonte: <http://www.lookfordiagnosis.com>

A Comissão Europeia que representa e defende os interesses da União Europeia (UE) na sua globalidade emitiu um documento afirmando que os países europeus Alemanha, Áustria, Bélgica, Chipre, Dinamarca, Eslováquia, Eslovênia, Espanha, Finlândia, França, Irlanda, Lituânia, Luxemburgo, Países Baixos, Reino Unido, República Tcheca e Suécia apresentaram sorologia negativa e que já obtiveram certificado de controle ou erradicação da LEB e não importam animais sorologicamente positivos (JOHNSON & KANEENE, 1991; GILLET *et al.*, 2007), entretanto, relatórios da OIE (2011) mostram que países como Alemanha, França, República Checa, tidos como livres para a UE, apresentaram casos de LEB entre os anos de 2010 e 2011. Além desses, países como Hungria, Itália, Polônia, Romênia e Rússia se destacaram pela elevada incidência neste mesmo período (OIE, 2011).

A partir de abril de 2013, após avaliação de documentação pela Comissão Europeia (comissão decisão em 12 de abril de 2013), a província de Benevento na Itália e 24 regiões administrativas da Polônia foram consideradas oficialmente zonas livres de LEB.

Digiacomio (1992); Moraes *et al.* (1996) destacam que a transmissão por inseminação artificial ainda não foi confirmada, mas é possível que o sêmen, contendo linfócitos infectados possa servir como fonte do vírus. Para Hopkins *et al.* (1988), a palpação retal com o uso de luvas contaminadas com sangue, em novilhas soronegativas propicia risco na transmissão da infecção.

Evermann (1987) e Radosits *et al.* (2002) relataram que a transmissão vertical acontece de duas maneiras, sendo a primeira através da via placentária, onde o VLB pode infectar linfócitos fetais, caracterizando assim uma infecção intra-uterina de ocorrência em até 20% dos casos de contágio, por estar associado a uma imunossupressão temporária, que verifica-se na vaca durante a prenhez. A segunda foi reportada por Van Der Maaten *et al.* (1981) e Lassauzet *et al.* (1991) mediante a ingestão de colostro ou leite, pelo bezerro, que contenha linfócitos infectados.

Em 1986, Shettigara *et al.* realizaram pesquisa em rebanhos bovinos na Europa com a finalidade de avaliar o programa de controle e erradicação da LEB, a partir da detecção do nível de infecção no rebanho, utilizando-se a técnica IDGA. Como resultado, os autores estabeleceram os parâmetros da taxa de prevalência da infecção na qual foi classificada de acordo com o nível de infecção em baixa (0-10%), média (11-30%) e alta prevalência (>30%).

Poeta *et al.* (2008) realizaram entre os anos de 1995 e 2005, em Portugal, um estudo epidemiológico constatando que houve diminuição na prevalência e incidência da LEB no país. Na Bélgica, entre os anos de 2007 e 2011 não foram registrados oficialmente casos de LEB, e o país praticamente erradicou a Leucose Enzoótica dos Bovinos de seus rebanhos, onde taxas de prevalência como a encontrada por Mammericx *et al.* (1978), de 28,57% (90/315), reduziram-se, atualmente, a índices praticamente nulos (OIE, 2011).

Nesses países anteriormente citados, a redução foi alcançada, principalmente devido à criação e execução de um plano de controle e erradicação da LEB, sendo caracterizado pelo uso de normas profiláticas adequadas, onde os animais infectados ou suspeitos eram isolados ou sacrificados. (OIE, 2011).

Conforme relatos da OIE (2011), a LEB vem sendo registrada também em países asiáticos como Iran, Israel, Japão e Coréia. A prevalência no Iran e Japão está em torno de 29% e 28%, respectivamente. Os pesquisadores Mohammadi *et al.* (2011); Murakami *et al.* (2011) ressaltaram, em estudos realizados no Iran, a importância da elevada densidade populacional e precária situação sanitária dos rebanhos como fatores determinantes para uma maior prevalência em relação aos rebanhos não submetidos a essas situações.

Na América Central, Ducreux *et al.* (1987) descreveram a ocorrência da LEB em 34 rebanhos, sendo 30 de corte e quatro leiteiros, criados em propriedades situadas na Costa Rica, obtendo um percentual de prevalência global de 2,5% (23/938), sendo 1,4% (13/902) e 27,8% (10/36), as taxas encontradas, respectivamente, no rebanho destinado ao corte e leite.

Na América do Sul, através de levantamentos soro-epimiológicos, a ocorrência da LEB foi citada na Venezuela, Argentina, Colômbia e Brasil. Marin *et al.* (1978) na Venezuela, apresentaram um amplo estudo epidemiológico, realizado em várias regiões do país, verificando uma taxa global de 34,3% (5.837/17.029), sendo de 49,1% (3.967/8.081), no gado leiteiro e de 20,9% (1.870/8.948), no gado de corte.

Em 1981 Brunel *et al.* encontraram uma prevalência de 50,20% nos rebanhos Argentinos, sendo bem maior que o obtido na Colômbia posteriormente por Peña *et al.* (1985) que foi de 14,47%.

No Brasil a origem da LEB se deu pela introdução de animais infectados, procedentes de áreas enzoóticas (países da Europa, Estados Unidos e Canadá), nos rebanhos do Estado de Minas Gerais, sendo disseminada, progressivamente, para outras regiões (RANGEL & MACHADO, 1943; SANTOS, 1959).

Rangel & Machado (1943) reportaram no Brasil, o primeiro registro da LEB na forma de linfossarcoma em quatro bovinos, cujas massas tumorais estavam localizadas no baço, coração e gânglios.

Merkt *et al.* (1959) anos depois, publicaram a ocorrência clínica da LEB em um bovino pertencente a um rebanho no Rio Grande do Sul, sendo o diagnóstico confirmado pelos achados patológicos e o emprego da hematologia.

As primeiras evidências sorológicas da infecção pelo VLB, nos rebanhos brasileiros, através da IDGA foram iniciadas por Alencar Filho *et al.*, no ano de 1979, em rebanhos leiteiros criados em São Paulo, com taxa de prevalência de 60,0% (24/40).

Modena *et al.* (1983) estudaram em Minas Gerais a ocorrência da infecção pelo VLB em um lote de 40 vacas prenhes, com idade variando entre 18 e 35 meses, procedente de um rebanho de 100 animais recém-importados dos Estados Unidos da América e Canadá. Eram animais importados com o objetivo de promover o melhoramento genético do rebanho nacional, sendo 12,5% (5/40) reagentes ao antígeno glicoprotéico do VLB, no momento da chegada ao Brasil e, cinco meses após, mesmo mantidos em condições de isolamento, o índice de animais sororreagentes aumentou para 80,0% (28/35). Esse crescimento foi atribuído ao longo período de incubação do VLB e consequente soroconversão, de forma lenta, dos animais infectados no país de origem, antes da exportação.

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

Passados alguns anos, Birgel *et al.* (1988), ao realizarem inquérito sorológico para avaliar a prevalência da infecção pelo VLB em bovinos leiteiros criados no Estado de São Paulo determinaram taxas de prevalência de 52,6% (243/462) em amostras colhidas na bacia leiteira de Campinas - São Paulo e 44,9% (774/1.722) provenientes de 16 municípios do mencionado Estado.

Dois anos mais tarde, Birgel Júnior *et al.* (1990) obtiveram 45,3% (393/868) como taxa de prevalência global para a infecção pelo VLB em rebanhos bovinos da raça Jersey, criados em diversos municípios paulistas, sendo em animais entre 24 a 48 meses de idade de 46,0% (81/176), nos com idade entre 48 e 72 meses de 65,0% (89/137) e nos maiores de 72 meses, 86,4% (108/125).

D'Angelino (1991) em estudo delineado em quatro momentos, entre os anos de 1980 a 1989, avaliou o desempenho produtivo e reprodutivo de bovinos infectados e não infectados pelo VLB, em um rebanho produtor de leite tipo B, em Campinas, São Paulo. Nesse estudo a prevalência global foi de 53,5% (523/978) de bovinos reagentes, destacando que vacas com anticorpos anti-VLB apresentaram uma média diária de produção leiteira significativamente menor (11%) quando comparadas com as não reagentes.

Na região norte do Estado do Tocantins, Fernandes *et al.* (2009) examinaram 881 amostras séricas para determinar a soroprevalência da LEB em 38 rebanhos leiteiros, e encontraram uma prevalência de 37% (326/881). A elevada prevalência observada, foi considerada pelos autores consequência da reformulação pela qual os rebanhos leiteiros da região passaram para atender as exigências do mercado, e com isso houve uma expressiva e negligente incorporação de animais de áreas endêmicas como Goiás, São Paulo e Minas Gerais, sem critérios sanitários, o que favoreceu à disseminação do VLB.

Em 2010, Barros *et al.* realizaram estudo de soroprevalência da LEB em bovinos leiteiros das raças Holandesa Preta e Branca, Jersey, Pardo-Suíço e mestiços, criados na região metropolitana de Curitiba, onde em 268 amostras testadas pela prova de Imunodifusão em gel de Agar (IDGA), foram determinados 151/268 (56,34%) animais positivos, sendo que os animais mais velhos demonstraram um aumento estatisticamente significativo de soropositividade, e 117/268 (43,66%) negativos. Nesse contexto, os pesquisadores relacionaram a elevada prevalência da LEB à falta de programa de controle para a doença e à falta de informações de técnicos e produtores quanto aos prejuízos ocasionados pela infecção do VLB em rebanhos leiteiros.

No Nordeste brasileiro, vários autores têm demonstrando incessantemente através de dados clínico-epidemiológicos, a importância da continuidade dos estudos sobre essa doença (TÁVORA, 1990; ABREU, 1993; MELO, 1991; MELO, 1999; MATOS *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2010, FERNANDES *et al.*, 2011; GALINDO *et al.*, 2013).

No Estado de Pernambuco, estudo retrospectivo a cerca da situação da LEB entre os anos de 1991 e 2011, demonstrou uma prevalência de 24% (343/1.421) sendo considerada a maior na região Nordeste, e que demonstra o estado de enzootia em que a doença se encontra, com sérios riscos da perpetuação do VLB em seus rebanhos leiteiros (FERNANDES *et al.*, 2011). Nesse estudo também foi observado, que a dinâmica da infecção apresentou-se estável entre 1991 (MELO, 1991) e 2003 (TENÓRIO, 2003), com taxas de 15% e 16%,

respectivamente. Em seguida recrudescer com taxas de prevalência de 33,4% (MENDES *et al.*, 2008) e 30,9% (MELO *et al.*, 2010).

Investigações epidemiológicas vêm caracterizando a capacidade de disseminação da LEB em diversas regiões do Brasil, através de diferentes metodologias de diagnóstico como observadas no Quadro 1.

Autores	Ano	UF	Amostras testadas	Teste diagnóstico	Prevalência
Junior <i>et al.</i>	2013	AL	341	IDGA	27,8%
Dias <i>et al.</i>	2012	MG	82	PCR em tempo real	69,5%
Santos <i>et al.</i>	2011	MA	920	IDGA	53,8%
Viana <i>et al.</i>	2011	BA	81	IDGA	33,3%
Batista <i>et al.</i>	2011	SE	270	IDGA	4,0%
Barros Filho <i>et al.</i>	2010	PR	268	IDGA	56,3%
Fernandes <i>et al.</i>	2009	TO	881	IDGA	37,0%
Matos <i>et al.</i>	2005	BA	796	IDGA	41,0%
Gregory <i>et al.</i>	2004	SP	40	PCR	90,0%
Camargos <i>et al.</i>	2003	MG	65	PCR	61,5%
Mendes	2002	PE	266	IDGA	14,7%
Birgel <i>et al.</i>	1999	AL	479	IDGA	9,6%
Molnár <i>et al.</i>	1999	PA	721	IDGA	49,8%
Melo	1999	SP	799	IDGA	46,4%
Braga <i>et al.</i>	1998	RS	3.430	IDGA	15,2%
Moraes <i>et al.</i>	1996	RS	39.799	IDGA	9,2%
Melo	1991	PE	443	IDGA	15,1%
Abreu <i>et al.</i>	1990	AC	1.060	IDGA	9,7%
Abreu <i>et al.</i>	1990	RO	1.060	IDGA	23,0%
Simões	1988	PB	780	IDGA	8,3%
Romero e Rowe	1981	RJ	1.290	IDGA	54,3%
Alencar filho <i>et al.</i>	1979	SP	1.013	IDGA	36,6%

QUADRO1. Retrospectiva da ocorrência da infecção pelo VLB no Brasil.

Batista *et al.* (2011) no Estado de Sergipe realizaram análise sorológica de 270 bovinos criados no Sertão, e constataram através do IDGA prevalência de 4,0% de animais reagentes ao VLB.

Na década de 80 foi desenvolvida uma nova ferramenta de diagnóstico, a partir de estudos em biologia molecular, sendo denominada reação em cadeia da polimerase (PCR), e desde então por ser um método sensível tem sido utilizada para a detecção de fragmentos genômicos de muitos genes de microrganismos em amostras clínicas, principalmente em bovinos infectados pelo VLB, até então diagnosticados geralmente através da IDGA (JAKOBS *et al.*, 1992; KLINTEVALL *et al.*, 1993).

González *et al.* (1999) detectaram DNA proviral aplicando metodologia modificada da PCR (nested PCR) em novilhos experimentalmente infectados com pequenas doses de sangue total (5ml) obtidas de um bovino BLV soropositivo. Segundo os autores, esta técnica, cujo procedimento leva três horas, demonstrou ser muito sensível, uma vez que foi capaz de detectar a presença do DNA proviral duas semanas após a inoculação.

Camargos *et al.* (2003) pesquisaram em amostras de 65 animais a presença de anticorpos anti-VLB, pela imunodifusão em gel de agar (IDGA) e pela PCR, para detecção direta do VLB. Os resultados demonstraram concordância de 73,80% entre os dois testes, onde quatro animais positivos na IDGA foram PCR negativos, enquanto 13 animais negativos na IDGA foram positivos na PCR. A sensibilidade diagnóstica obtida foi de 87% e a especificidade diagnóstica 62%. Os autores concluíram que a PCR desenvolvida pode ser uma ferramenta complementar no diagnóstico de infecções causadas pelo VLB, mas deve ter sua sensibilidade diagnóstica melhorada.

Gregory *et al.* (2004) analisaram comparativamente ao IDGA e ELISA, a sensibilidade e especificidade de uma PCR em 40 amostras de sangue de bovinos criados no Estado de São Paulo para a detecção de infecção natural pelo VLB. O protocolo de *nested* PCR padronizado, fundamentou-se na identificação de fragmentos de 340 pb e 444 pb do DNA de VLB, produzidos pela utilização de dois diferentes conjuntos de *primers* do gene env proviral. Os resultados obtidos nas investigações em 40 amostras de sangue bovino mostraram que 37 animais foram positivos para o VLB com ELISA, 36 com *nested* PCR e somente 25 com IDGA. Segundo os autores, a técnica *nested* PCR comparado com os testes sorológicos, mostra-se mais adequada para a detecção de bovinos infectados, com títulos de anticorpo anti-VLB baixos, transientes ou ausentes. Além disso, concluíram que esse ensaio pode ser usado para confirmar os resultados sorológicos duvidosos ou a infecção em animais assintomáticos.

3.3 Aspectos clínicos na Leucose Enzoótica Bovina

Ferrer (1979), Rebhun (2000), Leuzzi Júnior *et al.* (2001) e Barros (2007) relataram que os bovinos infectados pelo VLB podem se apresentar assintomáticos e sem alteração de produção quando comparados com os animais soronegativos, sendo que 5% a 10% dos bovinos soropositivos para o VLB desenvolvem linfossarcoma, alterações estas apresentadas nas Figuras 3, 4, 5 e 6 dos apêndices.

Além disso, provoca uma série de manifestações clínicas, dentre elas, hipertrofia dos linfonodos, exoftalmia, arritmia cardíaca e emagrecimento do animal. De ordem produtiva, há redução da produção leiteira, condenação de carcaças, maiores custos com a reposição de animais, óbitos decorrentes da própria doença e, sobretudo, inviabilização da exportação de animais (JOHNSON & KANEENE, 1991; LEUZZI JUNIOR *et al.*, 2001; RADOSTITS *et al.*, 2002).

A infecção determinada pelo VLB implica numa diminuição da atividade das imunoglobulinas, principalmente a IgM, contribuindo assim para que a resposta imune do hospedeiro seja insatisfatória (RADOSTITS *et al.*, 2002). A Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE, 2008), considerando o caráter irreversível da infecção pelo VLB, faz referência à LEB como doença de notificação obrigatória.

Ressalta-se ainda, a descrição de Mendes (2009), na qual a ação imunossupressora que o VLB estabelece no animal infectado, predispõe ao surgimento de outras enfermidades, tal como a tuberculose bovina, sendo um fato relevante a ser considerado nos programas de controle e erradicação de doenças infecciosas.

Knuth e Volkmann (1916), Dobberstein (1934) reportam a resposta linfoproliferativa do organismo à infecção, denominada linfocitose persistente, como alteração hematológica associada à LEB, sendo conhecida desde o início do século. Tal conhecimento permitiu, a partir da década de 50, o estabelecimento das chaves leucométricas (GOTZE *et al.*, 1954). A linfocitose persistente pode apresentar magnitude de até três vezes aos valores absolutos de linfócitos, considerando-se como base os padrões de referência para a raça e o grupo etário dos bovinos (INTERNATIONAL COMMITTEE ON BOVINES LEUKOSIS, 1968).

Muscoplat *et al.*, (1974) admitiram que os linfócitos infectados pelo VLB são funcionalmente deficientes, quer do ponto de vista imunológico ou metabólico, ressaltando, inclusive, uma hiperatividade de síntese dos linfócitos de vacas acometidas pela Leucose Enzoótica. Castro *et al.*, (1988) afirmaram que bovinos soropositivos, com linfocitose persistente, demonstram aneuploidia com aberrações cromossômicas dessas células.

Em 1990, Birgel Júnior demonstrou que há influência da infecção pelo VLB sobre o leucograma de bovinos da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo, caracterizada por um quadro de leucocitose por linfocitose. Os valores da leucometria global (leucócitos/mm³ de sangue) em fêmeas adultas clinicamente sadias variaram de 10.564/mm³ (± 1.647) a 11.643/mm³ (± 3597) e a linfometria de 6.857/mm³ (± 1.326) a 8.120/mm³ (± 2.953). O autor

também destacou, considerando o resultado da IDGA que a leucometria global foi significativamente superior nos sororreagentes $15.285/\text{mm}^3$ (± 7148), contra os não reagentes (com valor médio de $11.704/\text{mm}^3 \pm 3.298$). No que diz respeito à linfometria, os reagentes com $12.359/\text{mm}^3$ (± 6.520), apresentaram os valores de seus linfócitos significativamente maiores do que os não reagentes ao VLB, que apresentaram $8.361/\text{mm}^3$ (± 2.901).

Em 1996, Melo *et al.* estudaram a influência dos fatores sexual e etário e estabeleceram os valores referenciais do leucograma de uma população de 133 bovinos leiteiros, clinicamente sadios, criados no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco. Entretanto, nos animais sororreagentes para o VLB, os valores leucométricos das fêmeas e dos machos foram, respectivamente, $9.927/\text{mm}^3$ (± 316) e $10.142/\text{mm}^3$ (± 570), sendo os valores linfocitários/ mm^3 de sangue nas fêmeas e nos machos, respectivamente, $6.106/\text{mm}^3$ ($\pm 67-201$) e $6.728/\text{mm}^3$ ($\pm 157-370$).

A Tabela 1 representa os valores médios de leucócitos e linfócitos em bovinos sororreagentes para VLB em pesquisas realizadas no Brasil.

TABELA 1. Valores médios de leucócitos e linfócitos dos bovinos soropositivos para VLB, considerados portadores de leucocitose por linfocitose.

Pesquisador	Leucócitos/ mm^3	Linfócitos/ mm^3
Fernandes (2012)	18.600 ($\pm 6,5$)	14.000 ($\pm 6,7$)
Mendes (2002)	14.783 ($\pm 7,2$)	10.628 ($\pm 6,4$)
Garcia (1989)	19.505 ($\pm 8,9$)	14.233 ($\pm 6,1$)

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

Grimold *et al.* (1983) afirmaram que o aumento de linfócitos, associados à soro-conversão, poderia representar uma resposta linfoproliferativa benigna do organismo à infecção, havendo relação destes resultados com avaliações histopatológicas, que demonstraram, através da microscopia eletrônica, nos linfossarcomas, similaridade entre células neoplásicas e células linfóides imaturas. Os autores ainda citam que essa resposta ou reação orgânica do animal infectado e, conseqüentemente, a manifestação clínica, dependerá da condição imunológica individual e da localização da tumoração, da velocidade de crescimento e do grau de disseminação do processo neoplásico, não havendo modificação da resistência orgânica com o aumento da idade.

Os casos clínicos caracterizados por linfossarcomas têm ocorrência significativamente menor do que a relacionada com a taxa de prevalência dos animais que apresentam anticorpos anti-VLB, descreveram-se inclusive, rebanhos infectados que nunca apresentaram casos de linfossarcoma, podendo-se, entretanto, afirmar-se que até 10% dos bovinos infectados desenvolvem neoplasias no decurso de suas vidas (FERRER, 1979; ALENCAR FILHO *et al.*, 1979; SAMAGH e KELLAR, 1982).

Barros (2007) ilustra que o aparecimento dos linfossarcomas nos bovinos adultos ocorre geralmente num intervalo de quatro a cinco anos e sua disseminação se dá para vários órgãos, sendo mais comumente encontrados no fígado, baço, medula óssea, linfonodos, trato reprodutivo e trato respiratório. Para Burny *et al.* (1988) e Schwartz e Levy (1994) o desenvolvimento de tumores não é necessariamente precedido por uma fase de linfocitose persistente, mas este é o caso em dois terços dos animais.

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

Assim, a resposta humoral e citotóxica tem início logo após a infecção com a perspectiva de intensificar-se e persistir durante toda a vida do animal, o que indica que o sistema imune encontrar-se-á permanentemente estimulado pelo VLB, tornando o animal vulnerável; impossibilitando-o de responder a desafios imunológicos posteriores (BURNY *et al.* 1988; USUI *et al.*, 2006; MENDES, *et al.*, 2008; ERSKINE *et al.*, 2011).

3.4 Aspectos diagnósticos e de controle da LEB

O diagnóstico da LEB é realizado através do exame físico, dados epidemiológicos, citologia aspirativa, alterações linfoproliferativas, ELISA, IDGA e PCR (RADOSTITS *et al.*, 2002, CAMARGOS *et al.*, 2003).

Durante muito tempo, os padrões hematológicos (leucocitose por linfocitose) foram considerados como um importante aspecto clínico da Leucose Enzoótica dos Bovinos, inclusive foi utilizado por diversos autores como primeira condição clínica para diagnosticar a

doença quando na ausência dos testes sorológicos (DOBBERSTEIN, 1934, GÖTZE *et al.*, 1954; MAMMERICKX *et al.*, 1976; BIRGEL *et al.*, 1982).

A IDGA e o ELISA são considerados os testes de referência para a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008). A IDGA apresenta especificidade estimada em 99,8% e sensibilidade em 98,5%, sendo considerada uma técnica segura e precisa para detectar a infecção pelo VLB, no entanto, não é capaz de identificar anticorpos neutralizantes na fase inicial da doença (RADOSTITS *et al.*, 2002). A sensibilidade superior do ELISA em relação à IDGA para amostras séricas agrupadas permite a detecção de anticorpos nos rebanhos com prevalência menor que 1%.

Entretanto, a Reação em cadeia da polimerase (PCR) vem cada vez mais, sendo considerada uma ferramenta útil na detecção de animais devido à característica de identificar animais positivos na fase inicial da infecção, portanto, a PCR, atualmente, representa uma nova ferramenta de diagnóstico da LEB (CAMARGOS, 2001).

A PCR é uma técnica desenvolvida pelo geneticista Kary Mullis em 1983, que permite a amplificação de ácidos nucleicos, utilizando-se uma reação enzimática catalizada por uma polimerase (taq-polimerase, enzima termoestável extraída da bactéria *Thermus aquaticus*), cuja atividade depende de íons Magnésio. Envolve ciclos múltiplos de um processo que pode ser realizado com um tubo de plástico de microcentrífuga contendo uma reação com uma mistura de tampões, nucleotídeos, *primers*, a Taq-polimerase e uma amostra de DNA molde. A seguir descrê-se a etapas da PCR (WHITE, 1993).

Diante dos aspectos etiopatogênicos da LEB, não existe tratamento, porém várias pesquisas estão em desenvolvimento buscando formas de se combater essa doença (RADOSTITS *et al.*, 2002). Para isso, é necessário diminuir os riscos de difusão da enfermidade, com uma série de medidas que devem ser adotadas (REBHUN, 2000). O comércio de bovinos deve ser controlado de modo que só transitem animais de uma região para outra, aqueles que estiverem livres da doença certificados por órgãos competentes (FERNANDES *et al.*, 2011).

As técnicas de manejo, quando empregadas de forma inadequada podem constituir um meio para a propagação da doença, assim sendo, os fômites, tais como, agulhas e instrumentos cirúrgicos não podem ser utilizados em animais soropositivos e depois serem empregados em bovinos soronegativos. Se os mesmos aparelhos forem ser usados em outro

bovino, é necessário realizar a lavagem e desinfecção desses materiais para se evitar a transmissão da doença para animais aparentemente sadios (DIGIACOMO, 1992).

Diversos autores citam como medidas de controle e profilaxia, testar o rebanho a cada três a seis meses até que todos os animais positivos sejam identificados, ordenhar os animais soronegativos antes dos soropositivos, utilizar desinfetantes eficazes na aparelhagem da ordenhadeira mecânica após a ordenha dos animais reagentes, nunca utilizar instrumentais veterinários utilizados no rebanho positivo em animais do rebanho negativo sem prévia desinfecção, instituir um banco de colostro na propriedade, promover pela bezerrada recém nascida, a ingestão de colostro de vacas soropositivas desde que este colostro seja submetido previamente a aquecimento a 56°C, durante 30 minutos, manter vigilância epidemiológica do rebanho através de exames sorológicos anuais, combater os insetos hematófagos que possam transmitir o VLB, bem como, em caso de Programas de Erradicação da LEB, recomenda-se a eliminação sumária de todos os animais com sorologia positiva, além da aplicação das medidas supracitadas, que visam a manutenção de rebanhos livres (MELO, 1991; DIGIACOMO, 1992; REBHUM, 2000; RADOSTITS *et al*, 2002; AGOTTANI *et al.* s/d).

3.5 Beta 2-microglobulina (β 2-M)

A Beta 2-microglobulina (β 2-M) é uma glicoproteína de peso molecular correspondente a 11800 dáltons, com homologia de sequência com as imunoglobulinas, sendo referida como marcador tumoral presente em vários tipos celulares, principalmente os linfócitos, integrada ao complexo maior de histocompatibilidade classe I (MHC-I), atuando como um indicador de linfossarcoma no ser humano (BERNIER, 1980; PIANTINO *et al.*, 1986; BERG *et al.*, 2008; ALMEIDA, 2009).

Os marcadores tumorais ou marcadores biológicos são macromoléculas, presentes no tumor, no sangue ou outros líquidos orgânicos, cujo aparecimento e/ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento das células neoplásicas (CAPELOZI, 2001). Li *et al.* (2012) descrevem que em circunstâncias normais, mais de 99,9 % da β 2-M é reabsorvida nos túbulos proximais dos rins, sem metabolização.

Na medicina humana, os principais marcadores tumorais reconhecidos são o PSA (antígeno prostático específico), MCA (antígeno mucoide associado ao carcinoma), B-HCG (gonadotrofina coriônica humana), lactato desidrogenase (LDH) e β 2-M. Esses marcadores podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes, auxiliando no diagnóstico, na avaliação da

resposta terapêutica, detecção de recidivas e estabelecimento do prognóstico (CAPELOZI, 2001).

Azenha *et al.* (2011) avaliaram amostras de sangue de 35 cães portadores de diferentes tipos de neoplasias, pela determinação sérica do marcador biológico lactato desidrogenase (LDH). Os resultados demonstraram elevação na concentração sérica dessa enzima em pacientes portadores de neoplasias malignas e benignas, quando comparados aos níveis dessa enzima em cães saudáveis, porém, não houve diferença significativa entre os grupos de neoplasias benignas e neoplasias malignas.

A β 2-M sérica foi usada pela primeira vez em 1983, como teste prognóstico do câncer da medula óssea em humanos (DURIE *et al.*, 1990; BATAILLE *et al.*, 1992). Conforme Wierda *et al.* (2009) a β 2-M apresenta significado prognóstico nas doenças linfoproliferativas crônicas, sendo que o aumento desta proteína reflete uma doença mais agressiva e com maior carga tumoral.

Rodríguez *et al.* (1988) utilizando-se da técnica de Radioimunoensaio - RIA em fase sólida determinaram a concentração sérica da β 2-M em pacientes humanos saudáveis ($1,34 \pm 0,34\mu\text{g/ml}$), todavia, a concentração sérica em pacientes com leucemia linfática aguda foi $3,37\mu\text{g/ml}$. Os autores ainda concluíram que os níveis séricos de β 2-M são úteis em pessoas com neoplasia hematológica, na avaliação da evolução da doença e da massa tumoral.

Morfeldt-Manson *et al.* (1988) e Lifson *et al.* (1992) afirmaram que em pessoas infectadas com HIV, os níveis séricos elevados de β 2-M correlacionam-se com a progressão para a SIDA, enquanto que nas malignidades hematológicas, conforme Bataille *et al.* (1984), a β 2-M é considerada de pouca utilidade no prognóstico. Em contrapartida, Avilés *et al.* (1993) reportam que em pacientes humanos com a presença de linfoma difuso tratados com quimioterapia, a presença de altos níveis séricos de β 2-M tem sido considerada como um fator de mau prognóstico.

Xie *et al.* (2003) sugeriram após estudos em pacientes humanos que níveis elevados de β 2-M podem ser prejudiciais para o sistema imunitário, principalmente pela redução na capacidade de apresentação de antígenos e comprometimento da resposta dos linfócitos T. O mesmo estudo também reporta que altos níveis de β 2-M pode promover a sobrevivência e crescimento de tumores através de citocinas tais como IL -6 e IL -10 produzido pelas células.

Galindo *et al.* (2013) estabeleceram os valores de referência da β 2-M em 50 animais de uma população de bovinos clinicamente saudáveis, criados em propriedades estabelecidas no

Estado de Sergipe, obtendo a concentração média da β_2 -M de $1,32 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$ com intervalo de confiança de [1,17 a 1,47]. Na faixa etária até 48 meses de idade foi de $1,28 \pm 0,57 \mu\text{g/ml}$ [1,03 a 1,54] e acima de 49 meses $1,35 \pm 0,49 \mu\text{g/ml}$ [1,16 a 1,54].

Kunugiyama *et al.* (1996) utilizando a técnica de Radioimunoensaio (RIA) obtiveram em 26 vacas sadias a concentração sérica da β_2 -M de $2,87 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$ com intervalo de confiança de [1,88 a 3,63]. Em estudo com 31 cães sadios, Nakajima *et al.* (2001) determinaram a concentração de β_2 -M no plasma e obtiveram a média de $1,82 \pm 0,57 \mu\text{g/ml}$. Em humanos sadios é reportada por Sugimura *et al.* (1987) uma concentração sérica, mensurada por RIA de $1,12 \pm 0,27 \mu\text{g/ml}$.

Na literatura consultada há referências sobre pesquisas envolvendo a correlação da concentração da β_2 -M e sua capacidade de interferir no estado imunitário de pessoas acometidas por enfermidades retrovirais, linfoproliferativas ou viroses oncogênicas, entretanto, não são citadas informações em bovinos infectados pelo VLB.

Portanto, para a aplicação de medidas de profilaxia no rebanho, as pesquisas em bovinos com a determinação da concentração da β_2 -M devem ser consideradas igualmente relevantes aos estudos que foram realizados em humanos, principalmente nas infecções por retrovírus e viroses oncogênicas (ALRAYES & ALBASET, 2003).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. M. G. Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina em animais criados na Bacia leiteira de Fortaleza, Estado do Ceará. 1993. 75 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 1993.

ABREU, V. L. V.; MODENA, C. M.; SILVA, J. A.; MOREIRA, E. C. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina nos Estados de Rondônia e Acre. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 42, n. 3, p. 203-210, 1990.

AGOTTANI, J. V. B.; OLIVEIRA, K. B.; FAYZANO, L.; WARTH, J. F. G. Leucose Enzoótica bovina: Diagnóstico, prevenção e controle. Veterinária Preventiva. 2013. Disponível em: <www.veterinariapreventiva.com.br/leucose.htm>. Acesso em: 10 jul. 2013.

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

ALMEIDA, R. A. M. B. β -2 microglobulina e citocinas séricas como indicadores de falha terapêutica aos anti-retrovirais. 2009. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

ALRAYES, M. H.; ALBASET, H. H. A. Significance of tumor necrosis factor- α and B2 microglobulin in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Egypt J Hospit Med.*, v. 12, p. 28-37, 2003.

ALTANER, C.; MERZA, M.; ALTANEROVA, V.; MOREIN, B. Envelope glicoprotein gp51 of bovine leukemia virus is differently glycosylated in cells of various species organ origin. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 36, p. 163-177, 1993.

ASTUDILLO, V. M.; KANTOR, I. N. El problema de La validez de una prueba diagnostica para uso masivo como procedimiento estadístico de classificacion. *Bol. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, v. 43-44, p. 37-43, 1981.

AVILÉS A.; NARVÁEZ, B. R.; DÍAZ-MAQUEO, J. C.; GUZMÁN, R.; TALAVERA, A.; GARCÍA, E. L. Value of serum beta 2 microglobulin as an indicator of early relapse in diffuse large cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, v. 9, n. 4-5, p. 377-80, 1993.

AZEDO, M. R. Influência do vírus da leucose bovina na resposta imunitária de animais naturalmente infectados. 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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 JÚNIOR, 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. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 390-397, 2008.

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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 63, n. 5, p. 1131-1140, 2011.

AZENHA, E. S.; SOBREIRA, M. F. R.; CASALE, R. V. P.; DIAS, D. R.; VIEIRA, M. C. Atividade de Lactato Desidrogenase como fator prognóstico de neoplasias em cães. In: 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2011, Florianópolis. Anais do 38º Congresso Brasileiro da Medicina Veterinária, 2011.

BARROS FILHO, I. R.; GUIMARÃES, A. k.; SPONCHIADO, D.; KRÜGER, E. R.; WAMMES, E. V.; OLLHOFF, R.; DORNBUSCH, P. T.; BIONDO, A. W. Soroprevalência da Leucose Enzoótica em bovinos leiteiros criados na região metropolitana de Curitiba - Paraná. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 77, n. 3, p. 511-515, 2010.

BARROS, C. S. L. Leucose Bovina In. RIET-CORREA, F.; CHILD, A. L.; MENDEZ, M.; LEMOS, R. A. A. Doenças dos ruminantes e eqüinos. 3ª ed., v. 1, Cap. 21, p. 280-293, 2007.

BATAILLE, R.; BOCCADORO, M.; KLEIN, B.; DURIE, B.; PILERI, A. C-reactive protein and β 2-microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. *Blood*, v. 80, p. 733-7, 1992.

BATAILLE, R.; GRENIER, J.; SANY, J. Beta-2-microglobulin in myeloma: optimal use for staging, prognosis, and treatment a prospective study of 160 patients. *Blood*, v. 63, p. 468-476, 1984.

BATISTA, J. M.; BATISTA, D. M.; COSTA, J. N.; BARROS, S. L. B.; SOUZA, T. S.; ALMEIDA, M. G. A. B.; ANUNCIACÃO, A. V. M. Prevalência sorológica da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos bovinos da mesorregião do sertão sergipano. *Vet. e Zootec.* São Paulo, v. 18, n. 4, Supl. 3, p. 716-719, 2011.

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

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Bioquímica*. 6ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 968, 2008.

BERGGARD, I.; BEAM, A. G. Isolation and properties of a low molecular weight β -2 globulin occurring in human biological fluids. *J Biol Chem.*, v. 243, p. 4095-4103, 1968.

BERNIER, G.M. Beta 2-Microglobulin: structure, function and significance. *Vox Sang.*, v. 38, p. 323-7, 1980.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H. Prevalência da Leucose Enzoótica dos bovinos adultos, em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. In: Congresso Mundial de Buiatria, 16, Salvador, 1990. Anais. Salvador, Associação Mundial de Buiatria, p. 789-93, 1990.

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

BIRGEL JUNIOR, E. H.; DIAS, W. M. C.; SOUZA, R. M.; POGLIANI, F. C.; BIRGEL, D. B.; BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo Vírus da Leucose Bovina em animais da raça Simental, criados no Estado de São Paulo. *ARS Veterinária*, v. 22, n. 2, p. 122-129, 2006.

BIRGEL, E. H.; AYRES, M. C. C.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Prevalência da Leucose Enzoótica dos Bovinos, em animais criados na bacia leiteira do Estado de Alagoas, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 66, n. Suppl., p. 137-137, 1999.

BIRGEL, E. H.; D'AGELINO, J. L.; GARCIA, M.; ZOGNO, M. A. Ocorrência da infecção causada pelo vírus da Leucose Bovina em gado leiteiro criado no Estado de São Paulo. Avaliação pela detecção de anti-corpos séricos por imunodifusão com antígeno viral. In: Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 43., 1988b, Campinas, SP. Resumos. Campinas: SPMV, p. 31, 1988.

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

BRAGA, F. M.; VAN DER LAAN, C. W.; SCHUCH, L. F.; HALFEN, D. C. Infecção pelo Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV). *Ciência Rural*, v. 28 n. 1, p. 163-172, 1998.

BRUNEL, E.M.; MENDONÇA, N. Y. B.; COLMAN, O. L. R.; BULMAN, G. M. Leucosis enzoótica bovina. Taxa de prevalencia en la Provincia de Formosa (Republica Argentina), mediante la prueba de inmunadiusión en gel de agar con antígeno glicaproteico. *Revista de Medicina Veterinária*, v.62, p.486-90, 1981.

BURNY A.; CLEUTER, Y.; KETTMANN, R., MAMMERICKX, M.; MARBAIX, G.; PORTETELLE, D.; VAN DEN BROEKE, A.; WILLEMS, L.; THOMAS, R. Bovine leukaemia: Facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet Microbiol.* v. 17, p. 197-218, 1988.

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

CAMARGOS, M. F. Padronização de uma PCR para o diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina e sequenciamento parcial do gene *env*. 2001. 38 p. Dissertação - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. 2001.

CAMARGOS, M. F.; STANCEK, D.; LESSA, L. M.; REIS, J. K. P.; ROCHA, M. A.; LEITE, R. C. Development of a polymerase chain reaction and its comparison with agar gel immunodiffusion test in the detection of bovine leukemia virus infection. *Braz J Vet Res Anim Sci.*, v. 40, p. 341-348, 2003.

CAPELOZI, V. L. Entendendo papel dos marcadores biológicos no câncer do pulmão. *J. Pneumol.* v. 27 n. 6, p. 321-328, 2001.

CASTRO, N. H. C.; WALTER, J.; SANTOS, R. C. S.; 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. 380-4, 1988.

COMISSÃO EUROPÉIA. Disponível on line. 2013 <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:103:0005:0009:pt:pdf> Acesso em: 03 de Nov. 2013.

D'ANGELINO, J. L. Leucose enzoótica dos bovinos - estudo retrospectivo da performance produtiva e reprodutiva de animais infectados e não infectados. São Paulo. 1991. 85 p. Tese (livre docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. São Paulo. 1991.

DEACON, N. J.; LAH, M. The potential use of polymerase chain reaction in veterinary research and diagnosis. *Aust Vet J.*, v. 66, n. 12, p. 442-44, 1989.

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

DIAS, N. L.; FONSECA JUNIOR, A. A.; RODRIGUES, D.; CAMARGOS, M. F. PCR em tempo real para diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina. *Ciência Rural*, v. 42, n. 8, p. 1434-1439, 2012.

DIGIACOMO, R.F. The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection. *Veterinary Medicine*, v. 87, p. 248-256, 1992.

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

DOMENECH, A.; GOYACHE, J.; LLAMES, L.; JESÚS PAYÁ, M.; SUÁREZ, G.; GÓMEZ-LUCÍA, E. In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. *J. Gen. Virol.*, v. 81, p. 109-118, 2000.

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

DURIE, B. G. M.; STOCK-NOVACK, D.; SALMON, S. E.; FINLEY, P.; BECKORD, J.; CROWLEY, J.; COLTMAN, C. A. Prognostic value of pre-treatment serum β 2-microglobulin in myeloma: a Southwest Oncology Group study. *Blood*. v. 75, p. 823-30, 1990.

ERSKINE, R. J.; BARTLETT, P. C.; SABO, K. M.; SORDILLO, L. M. Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. *Veterinary Medicine International*. p. 1-5, 2011.

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

EVRAIN, P. E. The serum levels and urinary excretion of β 2-microglobulin in apparently healthy subjects. *Scand J. Clin. Lab. Invest.* v. 29, p. 69-74, 1972.

FENNER, J. F.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. *Veterinary Virology*. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1993. Cap. 33: Retroviridae. p. 561-595.

FERNANDES, A. C. C.; TENÓRIO, T. G. S.; SILVA, T. I. B.; MENDES, E. I.; BAPTISTA FILHO, L. C. F.; MELO, E. H. Leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos: estudo retrospectivo e prospectivo da ocorrência em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco. *Vet. e Zootec. São Paulo*. v. 18, n. 4, Supl. 3, p. 728-732, 2011.

FERNANDES, C. H. C.; MELO, L. E. H.; TENÓRIO, T. G. S.; MENDES, E. I.; FERNANDES, A. C. C.; RAMALHO, T. R. R.; MOURA SOBRINHO, P. A.; MOTA, R. A. Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da Leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região norte do estado do Tocantins, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 327-334, 2009.

FERRER J.F. Bovine leukosis: natural transmission and principles of control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 175, n. 12, p. 1281-1286, 1979.

GALINDO, R. C. G.; RÊGO, E. W.; BAPTISTA FILHO, L. C. F.; FERNANDES, A. C. C.; ANDRADE, J. M.; SILVA, L. C.; SILVA, T. I. B.; FRAGA JUNIOR, A. M.; MELO, L. E. H. Valores de referência e influência do fator etário na concentração da Beta 2-microglobulina em uma população de bovinos leiteiros criados no Estado de Sergipe. In: X Congresso Brasileiro de Buiatria. Belém - PA, 09 a 12 de setembro, 2013.

GARCIA, M. Avaliação do leucograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa branca e preta, naturalmente infectadas pelo Vírus da Leucose Bovina. 1989. 67 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1989.

GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUS, M. BURTEAU, C.; NIGRO, A.; VANDERMEERS, F.; BALON, H.; BOUZAR, A. B.; DEFOICHE, J.; BURNY, A.; REICHERT, M.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, v. 4, n. 18. p. 1-32, 2007.

GONZÁLEZ, E. T.; NORIMINE, J.; VALERA, A.; TRAVERÍA, G.; OLIVA, G.; ETCHEVERRIGARAY, M. E. A rapid and sensitive diagnosis of bovine leukaemia virus infection using the nested shuttle polymerase chain reaction. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 19, n. 2, p. 63-67, 1999.

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

GREGORY, L.; CARNEIRO, P. S.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BEIER, D.; KAMATSU, R.; HARAKAVA, R.; LARA, M. C. C. S. H.; PITUCO, E. M.; OLIVEIRA, J. C. F.; FERREIRA, V. C. A.; IKUNO, A. A. Nested polymerase chain reaction validated for sensitive detection of Bovine Leukemia Virus in blood samples from Brazilian cattle herds: comparison with conventional ELISA and Agar Gel Immunodiffusion methods. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, n. 3, p. 303-308, 2004.

GRIMOLDI, M. G.; POLI, G.; SARTORELLI, P.; CALDORA, C.; OLDANI, L.; LOCATELLI, A. Karatyping analysis of lymphocytes from cattle at different stages of bovine leukemia virus infection. *British Veterinary Journal*, v. 139, p. 240-6, 1983.

GURTLER, G.; SOUZA, F.; BLAGITZ, M.; BATISTA, C.; SILANO, C.; SOUZA, K.; MORI, C.; DELLA LIBERA, A. Influência do estresse oxidativo na apoptose leucocitária de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da Leucose Enzoótica bovina. *Ciência Animal Brasileira*, Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. Supl. 1, p. 474-479, 2009.

HEENEY, J. L.; VALLI, P. J.; JACOBS, R. M.; VALLI, V. E. Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. *Laboratory Investigation*, v. 66, n. 5, p. 608-17, 1992.

HOFMANN, B.; BASS, H.; NISHANIAN, P.; FAISAL, M.; FIGLIN, R. A.; SARNA, G. P.; FAHEY, J.L. Different lymphoid cell populations produce varied levels of neopterin, beta 2-microglobulin and soluble IL-2 receptor when stimulated with IL-2, interferon-gamma or tumour necrosis factor-alpha. *Clin Exp Immunol.* v. 88, n. 3, p. 548-554, 1992.

HOPKINS, S. J.; EVERMANN, J. F.; DIGIACOMO, R. F.; PARISH, S. M.; FERRER J. F.; SMITH, S.; BANGERT, R. L. Experimental transmission of bovine leukosis virus by simulated rectal palpation. *Vet. Rec.*, v. 122, p. 389-390, 1988.

HÜBNER, S. O.; WEIBLEN, R.; MORAES, M. P.; SILVA, A. M.; CARDOSO, M. J. L.; PEREIRA, N. M.; ZANINI, M. Infecção intra-uterina pelo Vírus da Leucose Bovina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 21, n. 4, p. 8-11, 1997.

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

JACOBS, R. M.; SONG, Z.; POOM, H.; HEENEY, J. L.; TAYLOR, J. A.; JEFFERSON, B.; VERNAU, W.; VALLI, V. E. O. Proviral detection and serology in Bovine Leukemia Virus-exposed normal cattle and cattle with lymphoma. *Can J Vet Res.* v. 56, n. 4, p. 339-348, 1992.

JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine leukemia virus. Part I. Descriptive epidemiology, clinical manifestations, and diagnostic tests. *Compend Contin Educ Pract Vet.* p. 315-24, 1991.

JUNIOR, J. W. P.; SOUZA, M. E.; PORTO, W. J. N.; LIRA, N. S. C.; MOTA, R. A. Epidemiologia da infecção pelo Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (LEB). *Ci. Anim. Bras.*, Goiânia, v.14, n.2, p. 258-264, 2013.

KLINTEVALL, K.; BERG, A.; SVEDLUNG, G.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; BELÁK, S. Differentiation between enzootic and sporadic bovine leukosis by use of serological and virological methods. *Vet. Rec.*, v. 133, n. 11, p. 272, 1993.

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

KUNUGIYAMA, I.; ITO, N.; TAKAGAKI, Y.; HAYASHI, S.; SONE, K.; GOTOH, H.; SAITOH, T.; FURUKAWA, Y.; YAMAGUCHI, T. Measurement of beta 2-microglobulin in bovine serum and urine by radioimmunoassay. *The Journal of veterinary medical science/The Japanese Society of Veterinary Science*, v. 58 n. 7, p. 617-22, 1996.

LASSAUZET, M. G.; THURMOND, M. C.; JOHNSON, W. O.; STEVENS, F.; PICANSO, J. P. Factors associated with transmission of Bovine Leukemia Virus by contact in cows on a California dairy. *Am. J. Epidemiol.* v. 133 n. 9, p. 164-176, 1991.

LEUZZI JUNIOR, L. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 22, n. 2, p. 211-221, 2001.

LI, K.; DU, H.; LIAN, X.; YUAN, M.; LIU, Q.; YANG, S.; CHEN, S.; YANG, R.; YE, W. Serum β 2-Microglobulin Levels in Patients with Various Solid Cancer. *J Mol Biomark Diagn*, 2012. Disponível em: <http://www.omicsonline.org/2155-9929/2155-9929-S2-007.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2013.

LIFSON, A. R.; SEGAL, M. A.; HESSOL, N. A.; BUCHBINDER, S. P.; O'MALLEY, P. M.; BARNHART, L.; KATZ, M. H.; HOLMBERG, S. D. Serum β 2-microglobulin and prediction of progression to AIDS in HIV infection. *The Lancet*. v. 339, p. 1436-1440, 1992.

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

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

MARÍN, C.; DE LÓPEZ, N.; LOZANO, O.; PALENCIA, L.; ESPAÑA, W.; CASTAÑOS, H.; LEÓN, A. Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. *Ann. Rech. Vet.*, v. 9, p. 743-746, 1978.

MARTINEZ, E.R.M.; PAIVA, L.R.S. Eletroforese de ácidos nucléicos: uma prática para o ensino de genética. *Genética na Escola*, p. 43-48, 2013. Disponível em: <www.sbg.org.br>. Acesso em: 10 jul. 2013.

MATOS, P. F.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Enzootic bovine leukosis: prevalence of seric antibodies on dairy cows breed at Bahia and comparasion between results of ELISA and the agar gel immunodiffusion tests. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.*, v. 42, n. 3, p. 171-179, 2005.

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. 1999. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1999.

MELO, L. E. H. Leucose enzoótica dos bovinos. Prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no agreste meridional do Estado de Pernambuco. 1991. 102 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. São Paulo, São Paulo. 1991.

MELO, L. E. H.; BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; ARAÚJO, W. P.; RÊGO, E. W. Influência do fator sexual no leucograma de bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. In: XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, Campo Grande - MS, 1996.

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), Belo Horizonte - MG, 2010.

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

MENDES, E. I. Estudo imunológico da Leucose Enzoótica dos Bovinos. Avaliação de sua intercorrência com a tuberculose e a brucelose em busca de estratégias melhoradoras da produtividade dos rebanhos leiteiros de Pernambuco. 2009. 100 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2009.

MENDES, E. I.; FERNANDES, A. C. C.; MENEZES, L. S.; SILVA, T. I. B.; BARROS, A. D.; OLIVEIRA, C. M. M.; ALBUQUERQUE, M. S.; SILVA, G. 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, RS: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2008.

MERKT, H.; GIUDICE, J. C. O.; MÜLLER, J. A. Leucose bovina: Concepção moderna e primeira verificação da doença no RS. *Revista da Escola Agronomia Veterinária do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, v. 2, p. 7-19, 1959.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur. J. Cancer*, v. 13, p. 1369-1375, 1977.

MODENA, C. M.; ABREU, V. L. V.; SILVA, J. A.; MOREIRA, E. C.; AZEVEDO, N. A.; REHFELD, O. A. M. Ocorrência de Infecção pelo vírus de Leucose enzoótica bovina em animais importados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 35, p. 565-7, 1983.

MOHAMMADI, V.; ATYABI, N.; NIKBAKHT BRUJENI, G. H.; LOTFOLLAHZADEH, S.; MOSTAF, E. Seroprevalence of bovine leukemia virus in some dairy farms in Iran. *Global Veterinaria*, v. 7, n. 3, p. 305-309, 2011.

MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L.; DIAS, H. T.; SILVA, A. O. A.; VALE, W. G. Ocorrência da Leucose Enzoótica dos Bovinos no Estado do Pará, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 21, n. 4, p. 171-175, 1999.

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

MORFELDT-MANSON, J.; JULANDER, I.; VON STEDINGK, L. V.; WASSERMAN, J.; NILSSON, B. Elevated serum β 2-microglobulin a prognostic marker for development of AIDS among patients with persistent generalized lymphadenopathy. *Infection*, v. 16, p. 109-110, 1988.

MURAKAMI, K.; KOBAYASHI, S.; KONISHI, M.; KAMEYAMA, K.; YAMAMOTO, T.; TSUTSUI, T. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Veterinary Microbiology*. v. 148, n. 1, p. 84-8, 2011.

MUSCOPLAT, C. C. ALHAJI, I.; JOHNSON, D. W.; POMEROY, K. A.; OLSON, J. M.; LARSON, V. L.; STEVENS, J. B.; SORENSEN, D. Characteristics of lymphocyte responses

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

NAKAJIMA, Y.; HOSHI, F.; HIGUCHI, S.; KAWAMURA, S. Determination of canine beta2-microglobulin in plasma and urine by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Med Sci*. v. 63, p. 343-5, 2001.

PASCALE, J. M.; ISAACS, M. D.; CONTRERAS, P.; GOMEZ, B.; LOZANO, L.; AUSTIN, E.; DE MARTIN, M. C.; GREGORY, R. L.; MCLAUGHLIN, G. L.; AMADOR, A. Immunological markers of disease progression in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 4, p. 474-477, 1997.

PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. Nutrição de bovinos: conceitos básicos e aplicados. 5ªed. Piracicaba: FEALQ, p. 119, 2004.

PENA, N. E. B.; MARINO, O. C. J.; PEREZ, H. J. R.; LUNA, V. M. S.; Prevalencia serologica de leucosis bovina en ganaderias lecheras del centro de Caldas durante 1983. *Revista ICA*, v. 20, p. 106-115, 1985.

PIANTINO, P.; ANDRIULLI, A.; GINDRO, T.; PECCHIO, F.; MASOERO, G.; CAVALLINI, G.; NACCARATO, R.; DOBRILLA, G. CA 19-9 assay in differential diagnosis of pancreatic carcinoma from inflamatory pancreatic diseases. *Am J Gastroenterology*, v. 81, n. 6, p. 436-9, 1986.

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

PYEON, D.; O'REILLY, K. L.; SPLITTER, G. A. Increased interleukin-10 mRNA expression in tumorbearing or persistently lymphocytotic animals infectedwith bovine leukemia virus. *Journal of Virology*, v. 70, n. 8, p. 5706-5710, 1999.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica Veterinária: um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos, eqüinos. São Paulo: Guanabara Koogan, 1770 p., 2002.

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.

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

RODRÍGUEZ, M. L. A.; LIRA, P.; FORADORI, A.; GREBE, G. Beta 2 microglobulina en algunas neoplasias hematológicas. *Rev. Méd. Chile.* v. 116 n.6, p. 538-42, 1988.

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

SAMAGH, B. S.; KELLAR, J. A. Seroepidemiological survey of bovine leukemia virus infection in Canadian cattle. In: *International Symposium on Bovine Leukosis*, Bologna. The Hague, Martinus Nijhoff, v. 4, p. 397-412, 1982.

SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M.; NASCIMENTO, S. A.; COUTINHO, L. C. A.; TEIXEIRA, W. C.; ARRUDA, R. C. N.; BEZERRA, N. P. C.; BEZERRA, D.C.; CASTRO, R. S. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados à Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos da bacia leiteira do Estado do Maranhão. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 78, n. 3, p. 351-358, 2011.

SANTOS, J. A.; PINHEIRO, P. V.; SILVA, L. J. Linfossarcoma com lesões da língua e das câmaras cardíacas em bovino. *Anais da Escola Fluminense de Medicina Veterinária*, v. 2, p. 7-35, 1959.

SCHWARTZ, I.; LEVY, D. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet. Res.*, v. 25, n. 6, p. 521-536, 1994.

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

SILVA, F. H. Introdução a Biologia Molecular. Centro de Biologia Molecular Estrutural. I Escola Brasileira de Inteligência Artificial e Bioinformática InBio São Carlos, 25p. 2001. [Apostila].

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

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

SUGIMURA H.; IINO, Y.; SAKATA, H.; KIHARA, K.; SATOH, K.; DEMURA, H.; KAWAGUCHI, H.; ODAGIRI, R. Fundamental and clinical studies on the measurement of beta 2 microglobulin using the Dainabot beta 2-micro RIA kit. *Kaku Igaku*. v. 24 n. 6, p. 875-83, 1987.

TÁVORA, J. P. F. Prevalência da infecção pelo Vírus da Leucose bovina em rebanhos leiteiros criados na região do pólo Itabuna, Estado da Bahia. 1990. 106 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 1990.

TENÓRIO, T. G. S. Aspectos sanitários da Leucose Enzoótica, da Leptospirose e da Brucelose dos Bovinos em rebanhos leiteiros de Pernambuco. 2003. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2003.

USUI, T.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Expression of tumor necrosis factor-alpha in IgM+ B-cells from bovine leukemia virus infected lymphocytotic sheep. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 112, p. 296-301, 2006.

VAN DER MAATEN, M. J.; MILLER, J. M.; SCHMERR, M. J. In utero transmission of bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.*, v. 46, n. 6, p. 1052-1054, 1981.

VIANA, J. V. C.; ANUNCIACÃO, A. V. M.; ALMEIDA, M. G. A. R.; SOUZA, T. S.; ARAÚJO, B. R.; LIMA, C. C. V.; BATISTA, J. M.; COSTA J. N. Leucose Enzoótica Bovina em duas propriedades leiteiras do Estado da Bahia. In Congresso Brasileiro de Buiatria. Vet. e Zootec. São Paulo. v. 18, n. 4, Supl. 3, p. 712-715, 2011.

WHITE, B. A.; Protocols: Current methods and application. *Methods in Molecular Biology*. v. 15, 1993.

WIEDBRAUK, D. L.; FARKAS, D. H. Molecular methods for virus detection. San Diego: *Academic Press*, 1995.

WIERDA, W.G.; O'BRIEN, S. ; WANG, X.; FADERL, S.; FERRAJOLI, A.; DO, KA.; GARCIA-MANERO, G.; CORTES, J.; THOMAS, D.; KOLLER, C.; BURGER, J.; LERNER, S.; KANTARJIAN, H.; KEATING, M. Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol*. v. 27 n. 10, p. 1637-43, 2009.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. OIE. InformationDatabase (WAHID Interface), Version 1.4. Available online: http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_detail. Acesso em: 25 Set. 2011.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. OIE. International animal health code. Paris: OIE, Manual Terrestre. 2008. Disponível em: www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf. Acesso em: 20 jan. 2013.

XIE, J.; YI, Q. Beta2-microglobulin as a potential initiator of inflammatory responses. *Trends Immunol.* v. 24, p. 228-9, 2003.

5. ARTIGO CIENTÍFICO I

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa tese será apresentada no artigo intitulado “ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS MÉTODOS IDGA E PCR NO DIAGNÓSTICO DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS CRIADOS NO ESTADO DE SERGIPE” (manuscrito), que se encontra doravante anexado.

“Estudo comparativo entre os métodos IDGA e PCR no diagnóstico da Leucose Enzoótica em bovinos leiteiros criados no Estado de Sergipe”.

Manuscrito a ser submetido à revista Arquivo Brasileiro
de Medicina Veterinária e Zootecnia.

ISSN 0102-0935 *versão impressa* - ISSN 1678-4162 *versão online*

Estudo comparativo entre os métodos IDGA e PCR no diagnóstico da Leucose Enzoótica em bovinos leiteiros criados no Estado de Sergipe.

Comparative study between AGID and PCR of the diagnosis in Enzootic Leukosis dairy cattle created in the Sergipe of State.

R.C.G. Galindo^{I*}; P.R.E. Souza^{II}; E.W. Rêgo^{II}; H. Rizzo^{II}; L.C.F. Baptista Filho^{III}; A.C.C. Fernandes^{III}; A.M. Fraga Júnior^{IV}; L.E.H. Melo^{II}

^IProfessor Doutor - Faculdade Pio Décimo / Medicina Veterinária - Campus III (FPD). Av. Presidente Tancredo Neves, 5655, Jabotiana, Aracaju/SE, CEP: 49095-000 - Brasil. *Autor para correspondência: roniergalindo@gmail.com

^{II}Professor Dr. - UFRPE / Departamento de Medicina Veterinária.

^{III}Dutorando - UFRPE / Departamento de Medicina Veterinária.

^{IV}Professor MSc. - Faculdade Pio Décimo / Medicina Veterinária - Campus III

RESUMO

Na buiatria, os estudos têm se intensificado para a identificação da verdadeira magnitude da propagação do Vírus da Leucose Bovina (VLB), nos rebanhos nacionais. Assim, objetivou-se com esse trabalho comparar uma reação em cadeia da polimerase (PCR) baseada na região de repetições terminais longas (LTR) com a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), na identificação de bovinos portadores do VLB. Das 301 amostras analisadas pela IDGA e PCR, 234 (77,7%) apresentaram resultados concordantes, e o índice kappa definido como aceitável. A PCR apresentou índice de sensibilidade de 89,5%, especificidade 76,0%, valor preditivo positivo 35,1% e valor preditivo negativo 98,0%. Os resultados permitem concluir que a PCR foi eficaz na detecção de bovinos infectados pelo VLB, em propriedades do Estado de Sergipe. Dessa forma, quando da elaboração de programa de controle da LEB sugere-se que a PCR seja utilizada como teste confirmatório, visto que o valor preditivo negativo foi elevado. Palavras-chave: leucemia, biologia molecular, doença infecciosa, testes diagnósticos.

ABSTRACT

In Buiatria, studies have intensified to identify the true magnitude of the spread of Bovine Leukosis Virus (BLV) in the national herd. Thus, the aim of this work was to compare a the polimerase chain reaction (PCR) based in the region of long terminal repeat (LTR) with agarose gel immunodiffusion (AGID), the identification of cattle carrying the VLB. Of 301 the samples tested by AGID and PCR, 234 (77,7%) showed concordant results, with kappa

index defined as acceptable. The PCR showed sensitivity index of 89.5%, specificity 76.0%, positive predictive value 35.1% and negative predictive value 98.0%. The results showed that the PCR was effective in detecting cattle infected with BLV, properties established in the State of Sergipe. Thus, when devising control program LEB suggests to use PCR as a test confirmatory, because the negative predictive value was high.

Keywords: leukemia, molecular biology, infectious disease, diagnostics tests.

INTRODUÇÃO

Conforme as normas da Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE, 2011), a preocupação com as doenças infecciosas é constante e a Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) merece destaque em decorrência dos prejuízos econômicos resultantes do descarte de bovinos sororreagentes ou com linfossarcoma, além da restrição ao comércio internacional dos animais ou mesmo sêmen e embriões.

A LEB é uma doença infectocontagiosa, de evolução crônica, etiologia retroviral e expressiva sintomatologia clínica. Sua patogenia envolve alterações na atividade do sistema linfoide, caracterizada por marcante linfocitose persistente e proliferação orgânica de massas neoplásicas (D'Angelino, 1991).

Neste contexto, estudos têm sido propostos com a intenção de melhorar a produtividade, aliada ao aprimoramento da qualidade sanitária do rebanho, visando a elucidação e implementação de medidas estratégicas à profilaxia de possíveis enfermidades que comprometem a produção (Del Fava e Pituco, 2004), a exemplo da LEB.

Atualmente, o diagnóstico laboratorial da doença é realizado pelos testes indiretos, tais como a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) considerada por muitos anos a prova de eleição por sua alta especificidade, sensibilidade e por ser de baixo custo e o ensaio imunoenzimático (ELISA), para detecção de anticorpos séricos contra as proteínas virais gp51 e p24 (Miller e Van Der Maaten, 1977; Shettigara *et al.*, 1986; Reichel *et al.*, 1998; Matos *et al.*, 2005).

Entretanto, quando se pretende investigar doenças infecciosas de impacto na saúde animal é imprescindível aplicação de testes que detectem precocemente a infecção nos animais (Astudillo e Kantor, 1981). Por isso, a importância da biologia molecular, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ao identificar animais infectados, principalmente na fase inicial (Camargos, 2001).

No Nordeste brasileiro, estudos retrospectivos de prevalência acerca da situação da LEB na região, foram realizados por vários pesquisadores utilizando apenas a técnica da

IDGA (Tab. 1), onde, através dos dados clínico-epidemiológicos ficou demonstrada a importância da continuidade de pesquisas sobre essa insidiosa doença.

Tabela 1. Retrospectiva da ocorrência do VLB no nordeste brasileiro.

Autores	Ano	UF	Amostras testadas	Teste diagnóstico	Prevalência
Junior <i>et al.</i>	2013	AL	341	IDGA	27,8%
Fernandes <i>et al.</i>	2011	PE	1421	IDGA	24,00%
Santos <i>et al.</i>	2011	MA	920	IDGA	53,80%
Batista <i>et al.</i>	2011	SE	270	IDGA	4,07%
Viana <i>et al.</i>	2011	BA	81	IDGA	33,30%
Mendes <i>et al.</i>	2011	PE	662	IDGA	32,20%
Matos <i>et al.</i>	2005	BA	796	IDGA	41,00%
Birgel <i>et al.</i>	1999	AL	479	IDGA	9,60%
Melo	1991	PE	443	IDGA	15,10%
Simões	1988	PB	780	IDGA	8,30%

Todavia, no Estado de Sergipe, o único estudo registrado para detecção de bovinos portadores do Vírus da Leucose Bovina (VLB) foi realizado através da técnica da IDGA (Batista *et al.*, 2011). Portanto, a ausência de referência na literatura empregando-se a PCR no diagnóstico da LEB faz com que os resultados obtidos nesta pesquisa possam servir de divisor na aplicação de novas ferramentas de diagnóstico da presença de bovinos infectados pelo VLB, direcionando a novas perspectivas quanto à implementação do controle dessa doença.

Assim, objetivou-se com esse trabalho, comparar os resultados obtidos entre a PCR baseada na região de repetições terminais longas (LTR) e a IDGA, na detecção de bovinos naturalmente infectados pelo VLB, criados em propriedades sediadas nas três Mesorregiões que caracterizam morfoclimaticamente o Estado de Sergipe: Agreste, Leste e Sertão.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento foram utilizados bovinos provenientes de 11 propriedades, com aptidão leiteira e apresentando similaridade do sistema de produção e das condições edafo-climáticas, onde permaneciam os animais. As propriedades eram localizadas nos municípios de Aracaju, Itaporanga d'Ajuda, São Cristovão, Muribeca, Campo do Brito, Aquidabã, Pinhão, Nossa Senhora da Glória e Ribeirópolis pertencentes ao Estado de Sergipe.

A amostragem foi por conveniência, constituído por 20% do rebanho de cada propriedade (Sampaio, 2010), totalizando 301 bovinos, fêmeas, mestiças da raça Girolando (*Bos taurus indicus*), com faixa etária entre dois e 12 anos, criadas em regime semi-extensivo.

Amostras de sangue foram obtidas por meio de venopunção jugular, identificadas e acondicionadas em tubos estéreis com o anticoagulante Ácido Citrato Dextrose (ACD) e mantidas em refrigeração (entre 2 e 8°C), para posterior extração do DNA genômico e realização da PCR. Outra alíquota do sangue foi colocada em tubos estéreis, sem

anticoagulante, centrifugado, para obtenção do soro, que foi acondicionado em tubos *ependorfs*, refrigerado a -20°C, até a realização da IDGA (Birgel e Benesi, 1982).

As amostras foram submetidas às análises da IDGA, no Laboratório Clínico de Animais de Produção (LACAP), da UFRPE. Empregou-se a técnica Radial Dupla de Ouchterlony, que se presta para detecção de anticorpos séricos específicos anti-VLB, através de um substrato de difusão gelatinoso, utilizando o antígeno glicoprotéico (gp51), extraído do envelope do VLB (TECPAR[®]). A leitura das placas foi realizada 72 horas após a montagem do sistema, com a incidência de luz artificial em sua porção inferior da placa de *Petri*, 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 (Miller e Van Der Maaten, 1977).

O DNA genômico foi extraído no Laboratório Genoma / UFRPE, utilizando-se o kit de extração Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega[®]), seguindo-se protocolo fornecido pelo fabricante.

Posteriormente, as amostras de DNA foram submetidas a uma mistura da PCR, utilizando *primers* BLV-LTR256 (5'-GAG CTC TCT TGC TCC CGA GAC-3') e BLV-LTR453 (5'-GAA ACA AAC GCG GGT GCA AGC CAG-3') específicos para a região LTR dos *Retrovírus*, 0,5U "GoTaq[®] Hot Start Polymerase" (Promega[®]) e 200ng de DNA (Konnai *et al.*, 2006).

As condições de ciclagem da PCR convencional foram: 94°C por cinco minutos, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento à 65°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos, seguidos de uma extensão adicional à 72°C por dois minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, coradas com *Blue Green*. O tamanho dos fragmentos obtidos da PCR foi de aproximadamente 200pb. De forma a garantir a confiabilidade dos resultados foram utilizadas amostras controle (positiva e negativa), previamente testadas através da IDGA, técnica consolidada e reconhecida pela OIE como padrão no diagnóstico da LEB.

Para a análise dos dados foram utilizadas frequências absolutas e percentuais, bem como os parâmetros probabilísticos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), valor da acurácia e índice Kappa (k) como ferramentas de verificação da concordância entre os testes diagnósticos (Zar, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 301 amostras analisadas 38 (12,62%) foram soropositivas (Tabela 2), e dos 11 rebanhos bovinos examinados, sete (63,63%) contribuíram ao menos com um animal positivo, demonstrando a disseminação da doença na população estudada. A Figura 1 representa a leitura efetuada das amostras. Conforme Shettigara *et al.* (1986), a frequência de animais soropositivos para o VLB de 12,62% é considerada intensidade média. Nesse contexto, nota-se a necessidade de intervenção com medidas sanitárias de controle, para prevenir a disseminação do vírus, e evitar perdas produtivas na bovinocultura.

Tabela 2. Resultado do teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA).

Bovinos	Frequência
Soropositivos	38 (12,62%)
Soronegativos	263 (87,38%)
Total	301 (100,0%)

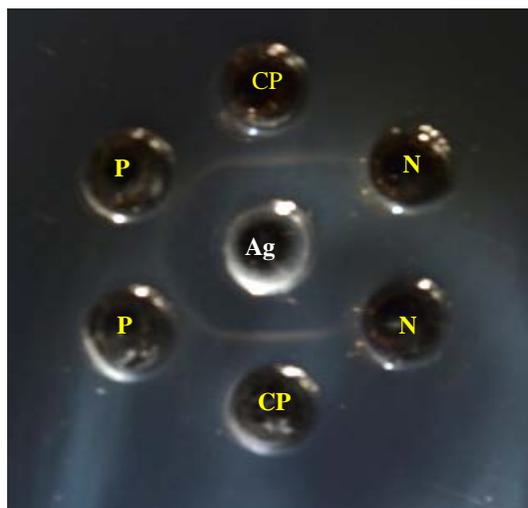


Figura 1. Resultado da leitura da reação de precipitação da IDGA. Ag: antígeno; CP: soro controle positivo; P: amostra positiva e N: amostra negativa.

Estudos têm demonstrado variações nas taxas de prevalência desta infecção entre diferentes regiões demográficas, justificada pelas diferentes formas de manejo, tipo racial e tecnologias empregadas de amostragem (Birgel *et al.* 1999; Mendes *et al.* 2011). Contudo um estudo efetuado na Mesorregião do Sertão Sergipano encontrou uma taxa menor de prevalência (4,07%) em relação a taxa do presente estudo. Tal diferença pode ser em decorrência da interferência das condições edafo-climáticas que definem as características de

produção de bovinos no Sertão e a ausência de prática de tecnificação do manejo (Melo, 1991; Barros *et al.*, 2007).

Apesar dos valores encontrados serem abaixo dos levantamentos sorológicos realizados na Bahia por Viana *et al.* (2011), com 33,3% de bovinos sororreagentes, e Mendes *et al.* (2011) com 32,3% de bovinos soropositivos em Pernambuco, a cronologia dos levantamentos epidemiológicos já realizados no Estado de Sergipe reporta à disseminação da LEB nos rebanhos. Esses dados também sinalizam para uma situação de alerta quanto às implicações na produtividade dos rebanhos leiteiros.

Considerando o resultado das 301 amostras analisadas pela PCR, 32,22% (97/301) foram positivas. Este resultado demonstra que a PCR detectou uma frequência maior de bovinos infectados pelo VLB no Estado de Sergipe, em comparação à taxa de prevalência anteriormente obtida (4,07% ou 11/270), utilizando a técnica da IDGA (Batista *et al.*, 2011). Todavia, os resultados obtidos são inferiores a estudos realizados em Minas Gerais ao se detectar o DNA proviral em 61,53% (40/65) de bovinos infectados pelo VLB através da PCR convencional (Camargos *et al.*, 2003), Dias *et al.* (2012), que encontraram 69,51% (57/82) de bovinos positivos com o emprego da PCR em tempo real. Essa diferença pode ser explicada pelo fato da PCR apresentar menor sensibilidade e maior suscetibilidade a contaminações em comparação a PCR em tempo real (Kubista *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2012). Na Figura 2, pode ser percebido o resultado da eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

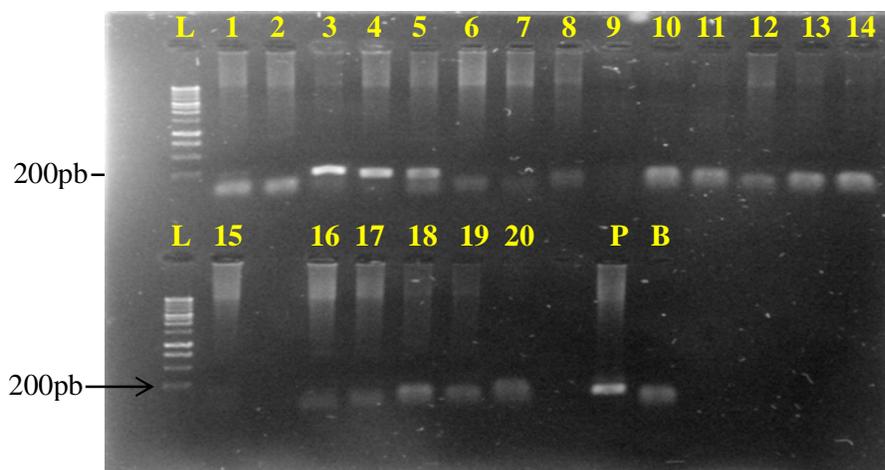


Figura 2. Amplificação das amostras VLB em gel agarose a 1,5%, corado com marcador *Blue Green*. Canaleta L: marcador do tamanho molecular; canaletas 3, 4, 5, 8, 10, 11, 18 e 20: amostras positivas; canaletas 1, 2, 6, 7, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 19: amostras negativas; canaleta P: controle positivo; canaleta B: controle negativo.

Os *primers* empregados, segundo a metodologia de Konnai *et al.* (2006), para detectar o DNA proviral em amostras de sangue, através da amplificação da região LTR do gene VLB parecem ter demonstrado eficiência para se identificar bovinos infectados nesse estudo. Esses resultados alcançados através da biologia molecular servem como divisor na aplicação de novas ferramentas de diagnóstico de bovinos portadores do VLB no Estado de Sergipe.

Na Tabela 3, verifica-se o resultado dos testes diagnósticos, onde 81,8% (9/11) dos rebanhos analisados apresentaram animais positivos para ambos os testes, porém em dois rebanhos foram identificados animais positivos apenas pela técnica da PCR, ao tempo em que não foi detectada positividade em dois outros rebanhos por ambos os métodos. A diferença encontrada nos rebanhos onde apenas a PCR detectou amostras positivas pode estar associada a detecção de anticorpos anti-VLB através da IDGA que é verificada a partir do 28º da infecção (KLINTEVALL *et al.*, 1994).

Tabela 3. Distribuição das frequências de bovinos reagentes à IDGA e PCR para a LEB, em rebanhos de bovinos leiteiros criados no Estado de Sergipe.

Rebanho	Município	Leucose Enzoótica Bovina		Total de bovinos
		IDGA	PCR	
		Positivos (%)	Positivos (%)	
1	Aracaju	2 (25,0)	4 (50,0)	08
2	Itaporanga	0 (0,0)	2 (22,2)	09
3	Muribeca	8 (23,5)	10 (29,4)	34
4	São Cristovão	0 (0,0)	0 (0,0)	23
5	Nossa Senhora da Glória	0 (0,0)	0 (0,0)	26
6	Nossa Senhora da Glória	2 (13,3)	5 (33,3)	15
7	Campo do Brito	16 (40,0)	17 (42,5)	40
8	Pinhão	0 (0,0)	6 (23,1)	26
9	Nossa Senhora da Glória	2 (22,2)	4 (44,4)	09
10	Aquidabã	5 (6,6)	37 (48,7)	76
11	Ribeirópolis	3 (8,6)	12 (34,3)	35
Total		38 (12,6)	97 (32,2)	301

Desse modo, ao se analisar o resultado da frequência da PCR e IDGA, houve maior identidade de animais positivos pela PCR (Tab. 4). Essa diferença pode ser elucidada pela presença de fatores que influenciem a sensibilidade do teste IDGA, tais como, o período necessário a soro-conversão ou por imunossupressão no periparto (DE BÔER *et al.*, 1987; EAVES *et al.*, 1994; KLINTEVALL *et al.*, 1994).

Tabela 4. Avaliação da PCR em relação à IDGA no diagnóstico da LEB.

Faixa etária (meses)	PCR	IDGA (padrão ouro)		Total
		Positivo N	Negativo n	
Grupo total Kappa = 0,39	Positivo	34	63	97
	Negativo	4	200	204
	Total	38	263	301

A sensibilidade foi 89,5%, enquanto a especificidade foi de 76,0%, estando os resultados próximos aos encontrados por Camargos *et al.* (2003), onde a sensibilidade diagnóstica obtida foi de 87% e a especificidade 62% pela PCR. Ainda, em relação à sensibilidade, observou-se um resultado considerado baixo, mas este fator pode estar relacionado à menor quantidade de carga viral nos linfócitos infectados (Eaves *et al.*, 1994; Reichel *et al.*, 1998).

O valor preditivo positivo (VPP) foi baixo, igual a 35,1%; e o valor preditivo negativo (VPN) 98,0%. A acurácia foi 77,7%, estando de acordo com os valores de concordância entre a PCR e IDGA relatados por Dittrich (2004), que foi 62,0% e Camargos *et al.* (2003) 73,8%. O VPN alto observado demonstra uma alta capacidade da PCR na classificação de amostras negativas para a infecção pelo VLB, estando de acordo com os estudos de Dias *et al.* (2012).

Contudo, o VPP baixo, pode precipitadamente demonstrar que a PCR identificou uma quantidade maior de animais falso positivos. Entretanto, tal resultado pode estar relacionado com a menor frequência de bovinos sororreagentes ao VLB detectada pela IDGA na presente pesquisa. Assim, esse estudo corrobora com Naif *et al.* (1992); Klintevall *et al.* (1994); Camargos *et al.* (2003); Dias *et al.* (2012), ao discutirem que a frequência de animais infectados pelo VLB detectados utilizando-se à IDGA, pode não caracterizar a real situação, em decorrência da influência de aspectos como período de infecção, ou em bovinos com baixos títulos de anticorpos.

Dessa maneira, a presente pesquisa também se identifica com as discussões dos autores Kubista *et al.* (2006) e Dias *et al.* (2012), de que a PCR tornou-se mais acessível economicamente devido ao aprimoramento da técnica, variedade de reagentes e aparelhos no mercado. Entretanto, essa tecnologia ainda está distante de ser aplicada na rotina das investigações epidemiológicas, principalmente pela carência de laboratórios especializados e profissionais qualificados.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a metodologia aplicada para PCR foi eficaz na detecção de bovinos infectados pelo VLB no Estado de Sergipe, apresentando uma maior taxa na identificação de animais positivos e melhor capacidade de classificação dos negativos em comparação aos resultados da IDGA. Assim, na elaboração de programas de controle de LEB sugere-se que a PCR seja utilizada como teste confirmatório, visto que o valor preditivo negativo foi elevado.

AGRADECIMENTOS

À Fundação CAPES pelo incentivo ao desenvolvimento desse estudo, aos professores da UFRPE, Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza, Dra. Eneida Willcox Rêgo e em especial ao Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo, a quem declaramos nossa profunda admiração, ao Biólogo Diêgo Henrique, e amigos Pós-Graduandos Artur Cezar, Luiz Carlos Fontes Baptista Filho e Tamyres Izarrelly.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: apresentação de citações em documentos. Rio de Janeiro, 2002.

ASTUDILLO, V.M.; KANTOR, I.N. El problema de la validez de una prueba diagnostica para uso masivo como procedimiento estadístico de clasificación. *Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa*, v. 43-44: p. 37-43, 1981.

BARROS, C.S.L. Leucose Bovina In. RIET-CORREA, F. (Ed). Doenças de Ruminantes e Equinos. Brasil: São Paulo, p. 280-293, 2007.

BATISTA, J.M.; BATISTA, D.M.; COSTA, J.N. *et al.* Prevalência sorológica da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos bovinos da mesorregião do sertão sergipano. In Congresso Brasileiro de Buiatria. 18., 2011. São Paulo, *Anais...* São Paulo. p.716-719 (Resumo).

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

BIRGEL, E.H., AYRES, M.C.C., BIRGEL JÚNIOR, E.H. Prevalência de anticorpos séricos antivírus da leucose enzoótica dos bovinos, em animais criados na bacia leiteira do Estado de Alagoas, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 3., 1999. São Paulo, *Anais...* , São Paulo, p. 129 (Resumo).

CAMARGOS, M.F. Padronização de uma PCR para o diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina e sequenciamento parcial do gene env. Belo Horizonte: 2001. 38p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

CAMARGOS, M.F.; STANCEK, D.; LESSA, L.M. *et al.* Development of a polymerase chain reaction and its comparison with agar gel immunodiffusion test in the detection of bovine leukemia virus infection. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v. 40, p. 341-348, 2003.

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

DE BÔER, G.F.; BOERRIGTER, H.M.; GROEN, J.; OSTERHAUS, A.D. Identification of bovine leukemia virus (BLV) infected cattle by complex-trapping-blocking (CTB) ELISA employing monoclonal antibodies directed against BLV-p24. *Zbl Vet Med B*. v.34, p. 717-28, 1987.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E.M. Infecção pelo Vírus da Leucemia Bovina (BLV) no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 66, n. 1/2, p. 1-8, 2004.

DIAS, N.L.; FONSECA JUNIOR, A.A.; RODRIGUES, D.; CAMARGOS, M.F. PCR em tempo real para diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina. *Ciênc. Rural*. v. 42, n. 8, p. 1434-1439, 2012.

DITTRICH, T.R.C. Produção de reagentes para o diagnóstico da infecção pelo Vírus da Leucose bovina. 2004. 179p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Paraná.

EAVES, F.W.; MOLLOY, J.B.; DIMMOCK, C.K; EAVES, L.E. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukemia virus proviral DNA in cattle. *Vet Microbiol.*, v. 39, p. 313-321, 1994.

FERNANDES, A.C.C.; TENÓRIO, T.G.S.; SILVA, T.I.B. *et al.* Leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos: estudo retrospectivo e prospectivo da ocorrência em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco. In Congresso Brasileiro de Buiatria. 18., 2011 São Paulo, *Anais...* São Paulo. p. 728-732 (Resumo)

JUNIOR, J.W.P.; SOUZA, M.E.; PORTO, W.J.N. *et al.* Epidemiologia da infecção pelo Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (LEB). *Ci. Anim. Bras.*, Goiânia, v.14, n.2, p. 258-264, 2013.

KLINTEVALL, K.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; NÄSLUND, K.; BELÁK, S. Bovine Leukaemia Virus: rapid detection of proviral DNA by Nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet Microbiol.*, v. 42, n. 2-3, p. 191-204, 1994.

KONNAI, S.; USUI, T.; IKEDA, M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. *Microbes Infect*, v. 8, p. 2163-2171, 2006.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.*, v. 27, p. 95-125, 2006.

MATOS, P.F.; BIRGEL JÚNIOR, E.H.; BIRGEL, E.H. Enzootic bovine leukosis: prevalence of seric antibodies on dary cows breed at Bahia and comparasion between results of ELISA and the agar gel immunodiffusion tests. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.*, v. 42, n. 3, p. 171-179, 2005.

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. 102 p. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MENDES, E.I.; MELO, L.E.H.; TENÓRIO, T.G.S. *et al.* Intercorrência entre Leucose Enzoótica e Tuberculose em bovinos leiteiros do Estado de Pernambuco. *Arq Inst Biol.* (São Paulo). v. 78, p. 1-8, 2011.

MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur J Cancer*, v. 13, p. 1369-1375, 1977.

NAIF, H.M.; DANIEL, R.C.; COUGLE, W.G.; LAVIN, M.F. Early detection of Bovine Leukemia Virus by using an enzyme linked assay for polymerase chain reaction - amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n. 3, p. 675-679, 1992.

REICHEL, M.P.; THAM, K.M.; BARNES, S.; KITTELBERGER, R. Evaluation of alternative methods for the detection of Bovine Leukaemia Virus in cattle. *N Z Vet J.*, v. 46, n. 4, p. 140-46, 1998.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Belo Horizonte: FEPMVZ, 264 p., 2010.

SANTOS, H.P.; PEREIRA, H.M.; NASCIMENTO, S.A. *et al.* Frequência de anticorpos e fatores de risco associados à Leucose Enzoótica bovina em rebanhos da bacia leiteira do Estado do Maranhão. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 78, n. 3, p. 351-358, 2011.

SHETTIGARA, P.T; SAMAGHI, B. S.; LOBINOWICH, E. M. Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel immunodiffusion test. *Can J Vet Res.*, v. 50, n. 2, p. 221-226, 1986.

SIMÕES, V.D. Leucose enzoótica dos bovinos. Prevalência de anticorpos séricos antivírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado da Paraíba. São Paulo, 1988. 118p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

VIANA, J.V.C.; ANUNCIAÇÃO, A.V.M.; ALMEIDA, M.G.A.R. *et al.* Leucose Enzoótica Bovina em duas propriedades leiteiras do Estado da Bahia. In Congresso Brasileiro de Buiatria. 18., 2011 São Paulo, *Anais...* São Paulo. p. 712-715 (Resumo)

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. OIE. 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Disponível em: <<http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals>>. Acessado em: 10 abr. 2013.

ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. New Jersey: Prentice Hall, 434 p, 1996.

6. ARTIGO CIENTÍFICO II

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa tese será apresentada no artigo intitulado “APLICABILIDADE DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA β 2-MICROGLOBULINA COMO RECURSO DIAGNÓSTICO DA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA” (manuscrito), que se encontra doravante anexado.

“APLICABILIDADE DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA β 2-MICROGLOBULINA
COMO RECURSO DIAGNÓSTICO DA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
LEUCOSE BOVINA”

Manuscrito a ser submetido à revista Arquivo Brasileiro
de Medicina Veterinária e Zootecnia.

ISSN 0102-0935 *versão impressa* - ISSN 1678-4162 *versão online*

Aplicabilidade da concentração sérica da β 2-Microglobulina como recurso diagnóstico da evolução da infecção pelo Vírus da Leucose Bovina.

R.C.G. Galindo^{I*}; P.R.E. Souza^{II}; E.W. Rêgo^{II}; H. Rizzo^{II}; L.C.F. Baptista Filho^{III}; A.C.C. Fernandes^{III}; A.M. Fraga Júnior^{IV}; L.E.H. Melo^{II}

^IProfessor Doutor - Faculdade Pio Décimo / Medicina Veterinária - Campus III (FPD). Av. Presidente Tancredo Neves, 5655, Jabotiana, Aracaju/SE, CEP: 49095-000 - Brasil. *Autor para correspondência: roniergalindo@gmail.com

^{II}Professor Dr. - UFRPE / Departamento de Medicina Veterinária.

^{III}Dutorando - UFRPE / Departamento de Medicina Veterinária.

^{IV}Professor MSc. - Faculdade Pio Décimo / Medicina Veterinária - Campus III

RESUMO

A Beta 2-microglobulina (β 2-M) é um dos principais marcadores utilizados na medicina humana para identificação do grau da infecção por retrovírus e estadiamento de tumores. No entanto, na Medicina Veterinária há pouco relato da sua aplicabilidade. Assim, tendo em vista, a ação patogênica do Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (VLB) e sua repercussão econômica e sanitária, este trabalho objetivou avaliar a utilidade da concentração sérica da β 2-microglobulina associada às alterações leucométricas como recurso de diagnóstico da evolução da infecção pelo VLB. Para a realização desse estudo 301 amostras séricas de vacas mestiças, com faixa etária acima de 24 meses, criadas em propriedades situadas no Estado de Sergipe foram testadas para detectar anticorpos anti-VLB (Vírus da Leucose Bovina) através da imunodifusão em gel de ágar, onde a partir dos resultados foram formados dois grupos aleatórios de 30 animais cada, denominados VLB-positivos e VLB-negativos a fim de quantificar a concentração da β 2-microglobulina através da técnica ELISA. A concentração da β 2-M nas 60 amostras analisadas foi mais elevada no grupo de bovinos soropositivos para o VLB, no entanto, a diferença significativa não foi registrada. O resultado da correlação das 60 amostras entre a leucometria total e β 2-M no grupo soropositivo foi - 0,078 ($p=0,681$) e - 0,042 ($p=0,826$) no grupo negativo. Os valores relativos à quantidade de linfócito/mm³ com β 2-M foi - 0,200 ($p=0,289$) no grupo soropositivo e 0,172 ($p=0,363$) no grupo soronegativo, isto é, as correlações foram baixas e não significativas. Assim, este trabalho demonstrou que a concentração da β 2-M na população estudada, não sofreu influência da infecção pelo VLB, bem como não houve correlação entre essa proteína e os parâmetros leucométricos vinculados à ação patogênica do vírus.

PALAVRAS-CHAVE: doença infecto-contagiosa, marcador biológico, imunidade.

ABSTRACT

β 2-microglobulin (β 2 -M) is one of the main markers used in human medicine for identification the degree of retrovirus infection and staging of tumors. However, in veterinary medicine there are few reports of its applicability. Thus, in view of the pathogenic action of Enzootic Bovine Leukosis Virus (BLV) and its economic and health impact, this study aimed to evaluate the usefulness of serum concentration of β 2-microglobulin associated with leucocytes parameters as diagnostic feature of the evolution of the infection by VLB. To conduct this study 301 serum samples from crossbred cows, aged over 24 months, raised on properties located in the State of Sergipe were tested to detect the BLV by agar gel immunodiffusion, and from the results two groups of 30 animals each at random, and these group were named BLV-positive and BLV-negative in order to quantify the concentration of β 2-microglobulin using ELISA. The concentration of β 2-M in 60 samples was higher in seropositive for BLV cattle, however, a significant difference was not significant. The result of the correlation between the 60 samples of total leukocyte and β 2 -M in the seropositive group was - 0.078 ($p = 0.681$) and it was - 0.042 ($p = 0.826$) in the negative group. The value for the number of lymphocytes/mm³ in with β 2 -M was - 0.200 ($P = 0.289$) in the seropositive group and 0.172 ($p = 0.363$) in the seronegative group, and the correlations were low and not significant. Thus, this study demonstrated that the concentration of β 2 -M in the study population used was not affected by infection with BLV, and there was no correlation between this protein changes and leukocyte parameters linked to the pathogenic action of the virus.

KEYWORDS: infectious disease, biomarker, immunity.

INTRODUÇÃO

O Estado de Sergipe apresenta uma população de bovinos estimada em 1,17 milhões de cabeças (IBGE, 2010), e para garantir a manutenção do crescimento, a preocupação com as doenças infecciosas deve ser constante (OIE, 2008). Nesse contexto, os exames laboratoriais são importantes no diagnóstico ou na avaliação da condição orgânica dos bovinos, tendo em vista a possibilidade da doença não estar sendo percebida clinicamente, conferindo alto risco de disseminação no rebanho, e como fator determinante para as perdas de produtividade (D'Angelino, 1991; Melo, 1991; Braga *et al.*, 2001, Fernandes, 2012).

Sabe-se que a Beta2-microglobulina (β 2-M) é uma glicoproteína de peso molecular correspondente a 11800 dáltons, caracterizada como marcador biológico presente em vários

tipos celulares, principalmente os linfócitos, atuando como um indicador do grau de infecção das retrovirose e estadiamento do linfossarcoma no ser humano (Piantino, 1986).

A β 2-M normalmente é detectada em baixa concentração, no soro humano e de cães, entretanto, em algumas doenças virais, principalmente quando se trata de retrovírus, ou vírus oncogênico verifica-se aumento dessa proteína como resposta a doença (Evrin & Wibell, 1972; Capelozzi, 2001).

Assim, diante dos aspectos etiopatogênicos da Leucose Enzoótica Bovina (LEB), as informações supracitadas podem ser consideradas, uma vez que o Vírus da Leucose Bovina (VLB) determina alteração na resposta imunitária, caracterizada por linfocitose persistente em cerca de 30% de bovinos infectados ou desenvolvimento de linfossarcomas em aproximadamente 2% a 5% (Ferrer, 1979; Alencar Filho *et al.*, 1979; Samagh & Kellar, 1982).

Contudo, a disposição anatômica da presença dos linfossarcomas, muitas vezes restritos aos linfonodos internos nos bovinos infectados pelo VLB, dificulta o diagnóstico precoce das lesões, permitindo assim, que o animal permaneça no rebanho como infectante uma vez que na cadeia epidemiológica da LEB, infecção e doença representam o mesmo risco (Birgel *et al.*, 1982). Este aspecto torna os animais portadores do Vírus da Leucose Bovina (VLB), além de fonte natural de agentes de alta infecciosidade e precursores da gênese da Leucose Enzoótica Bovina em uma população de bovinos.

Na literatura consultada há referências sobre pesquisas envolvendo a correlação da concentração da β 2-M e sua capacidade de interferir no estado imunitário de pessoas acometidas por enfermidades retrovirais, linfoproliferativas ou viroses oncogênicas, entretanto, não são citadas informações em bovinos infectados pelo VLB. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilidade da concentração sérica da β 2-M associada às alterações leucométricas, como recurso diagnóstico da evolução da infecção pelo VLB em bovinos criados em propriedades situadas no Estado de Sergipe.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado a partir da coleta de 301 amostras sanguíneas de vacas da raça Girolanda (*Bos taurus indicus*), com faixa etária entre dois e 12 anos, criadas em propriedades, situadas nos municípios do Estado de Sergipe.

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção da jugular, colhidas em duplicata com tubos a vácuo com anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD) e sem anticoagulante.

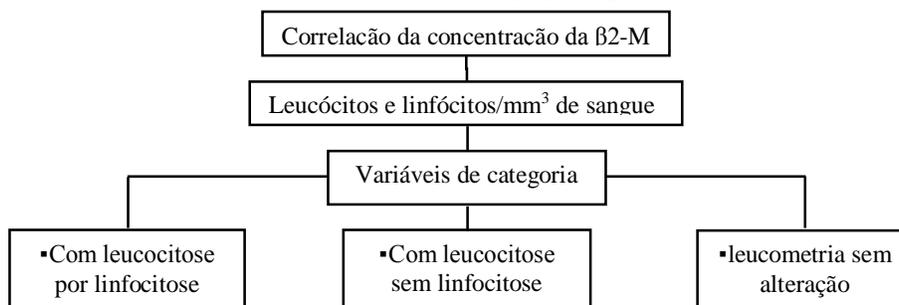
O sangue colhido em tubos sem anticoagulante foi centrifugado para obtenção do soro e as alíquotas acondicionadas em tubos *ependorfs* mantidos em refrigeração a -20°C . A outra alíquota foi acondicionada sob refrigeração entre 2°C a 8°C , para realização do leucograma.

No Laboratório Clínico de Animais de Produção da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LACAP/UFRPE), as 301 amostras de sangue foram submetidas às análises da IDGA, pela técnica Radial Dupla de *Ouchterlony* (Miller & Van Der Maaten, 1977). 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 VLB (TECPAR®). A leitura das placas foi realizada 72 horas após a montagem do sistema, com a incidência de luz artificial na porção inferior da placa de Petri, 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. Posteriormente, com o objetivo de analisar a influência do VLB na concentração da $\beta 2\text{-M}$ e verificação da existência de correlação desta proteína com os valores dos leucócitos e linfócitos, a população estudada foi estratificada aleatoriamente em dois grupos com total de 30 amostras cada, assim caracterizados GI (VLB-positivos) e GII (VLB-negativos).

Também no LACAP/UFRPE, as 60 amostras séricas dos grupos VLB-positivos e VLB-negativos foram submetidas à quantificação da $\beta 2\text{-M}$, utilizando-se o kit *ELISA Bovine $\beta 2\text{-Microglobulin Competitive}$* (Novateinbio Inc, Cambridge - USA), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Objetivando caracterizar os bovinos com leucocitose por linfocitose, para estabelecer a correlação entre as alterações leucométricas e a concentração sérica da $\beta 2\text{-M}$, foram obtidos o leucograma de 105 bovinos desse estudo, não reagentes ao VLB. Para a determinação do leucograma dos 105 bovinos, utilizou-se aparelho automático padronizado para leitura de amostras sanguíneas de bovinos (*HumaCount 30TS, Wiesbaden, Germany*). Em seguida, variáveis de categoria foram definidas (Fig. 1).

Figura 1. Representação esquemática para análise da correlação entre a $\beta 2\text{-M}$, de leucócitos/ mm^3 e linfócitos/ mm^3 nos grupos experimentais.



Assim, a partir dos resultados obtidos foram realizadas, conforme descritas, as análises estatísticas: média, desvio padrão e o coeficiente de correlação, bem como a utilização das técnicas de estatística inferencial: teste t-Student, com variâncias iguais ou teste de Mann-Whitney, teste Exato de Fisher desde que a condição para utilização do teste Qui-quadrado não foram verificadas, teste t-Student para a hipótese de correlação nula e intervalo de confiança para média de variáveis numéricas. As verificações das hipóteses de igualdade de variâncias e de normalidade dos dados foram através dos testes respectivos: F de Levene e Shapiro-Wilk. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5,0% e os intervalos foram obtidos com 95,0% de confiança (Zar, 1996; Sampaio, 2010). O programa estatístico utilizado para digitação dos dados e a obtenção dos cálculos estatísticos foi o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), na versão 17.

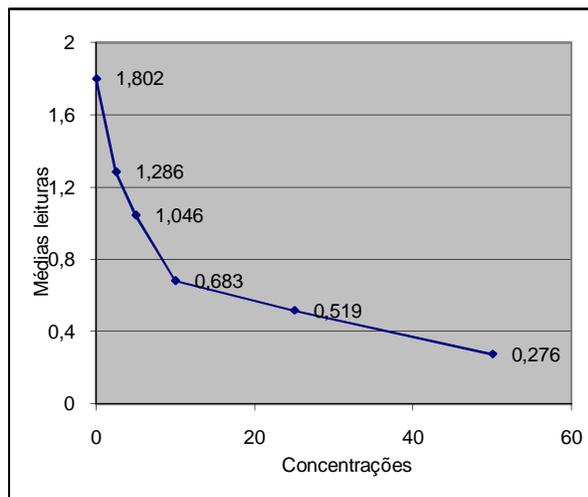
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a obtenção dos valores da concentração sérica da β 2-M no grupo total, realizou-se, inicialmente, a leitura da absorbância dos padrões conforme resultado (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração e leitura da absorbância dos valores padrões da β 2-M.

Padrão	Concentração	Leitura da absorbância
S1	0micrograma/ml	1802,0
S2	2,5micrograma/ml	1286,0
S3	5,0micrograma/ml	1045,5
S4	10,0micrograma/ml	0,6825
S5	25,0micrograma/ml	0,5185
S6	50,0micrograma/ml	0,2760

Posteriormente, levando-se em consideração os valores obtidos dos padrões foi elaborado o Gráfico 1 que permitisse a determinação da concentração da β 2-M através das equações de reta (Tabela 2), entre os pontos consecutivos da leitura da absorbância e os valores da concentração de β 2-M no grupo de bovinos VLB-positivos e VLB-negativos conforme ilustrado na Tabela 3.

Gráfico 1. Médias das leituras da absorbância dos padrões β 2-M.Tabela 2. Equações entre pontos consecutivos dos valores entre a leitura da absorbância e os valores da concentração da β 2-M dos grupos de animais VLB-positivos e VLB-negativos.

Equação da reta	Pontos das abscissas	Pontos das ordenadas
$B2MG = 1,802 - 0,2064 \cdot \text{Concentração}$	0 µg/ml e 2,5 µg/ml	1,286 e 1,802
$B2MG = 1,286 - 0,0960 \cdot \text{Concentração}$	2,5 µg/ml e 5,0 µg/ml	1,046 e 1,286

Na Tabela 3 observam-se a média e o desvio padrão da variável: idade e concentração da β 2-M nos grupos. Destaca-se que a média da concentração da β 2-M foi mais elevada no grupo de animais VLB-positivos do que VLB-negativos, entretanto a diferença significativa não foi registrada. Isso pode ser em decorrência da baixa carga viral plasmática presente nos bovinos infectados pelo VLB resultando na diminuição da concentração sérica da β 2-M, que por analogia é verificada em pacientes humanos infectados por retrovírus quando tratados com anti-retrovirais (Colebunders *et al.*, 2006).

Tabela 3. Média e desvio padrão das variáveis: idade em meses, e β 2-M segundo o grupo.

Variável	Grupo		Valor de p
	VLB-positivos Média \pm DP	VLB-negativos Média \pm DP	
• Idade (em meses)	76,80 \pm 45,08	70,40 \pm 35,89	$p^{(1)} = 0,789$
• β 2-M (µg/ml)	1,42 \pm 0,47	1,40 \pm 0,55	$p^{(1)} = 0,873$

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(1): Através do teste Mann-Whitney.

Os resultados obtidos nos animais infectados pelo VLB foram superiores aos determinados por Galindo *et al.*, (2013) que foi $1,32 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$ em pesquisa realizada numa população de bovinos clinicamente sadios criados no Estado de Sergipe. Além disso, a concentração sérica da $\beta_2\text{-M}$ desse estudo está dentro do limite de normalidade dos valores de referência encontrados em pesquisas realizadas em humanos que foram de 0,94 a $2,84 \mu\text{g/ml}$ através do imunoenensaio enzimático de micropartículas - MEIA (Dietemann *et al.*, 2001), considerado em outros ensaios mais sensível do que o ELISA (Matoković *et al.*, 2011).

Na Tabela 4 se apresentam os dados estatísticos referentes à concentração da $\beta_2\text{-M}$ entre as faixas etárias por grupo VLB-positivos e VLB-negativos. Não foram verificadas diferenças significativas entre as faixas etárias para nenhum dos grupos ($p > 0,05$). Considerando que 2% a 5% dos animais de um rebanho infectados pelo VLB, com idade acima de quatro anos apresentam linfossarcoma (Burny *et al.*, 1988; Ferrer *et al.*, 1979; Johnson e Kaneene, 1991; Braga & Laan, 2001), este resultado pode refletir ausência desta forma clínica da LEB nos bovinos infectados e com a idade avançada.

Tabela 4. Média e desvio padrão da variável $\beta_2\text{-M}$ segundo a faixa etária em meses.

Grupo	Variável	Faixa etária (em meses)		Valor de p
		Até 48 (n = 22) Média \pm DP	49 ou mais (n = 38) Média \pm DP	
• VLB-positivos	• Número de animais	11	19	$p^{(1)} = 0,582$
	• $\beta_2\text{-M}$	$1,48 \pm 0,50$	$1,38 \pm 0,46$	
• VLB-negativos	• Número de animais	11	19	$p^{(1)} = 0,333$
	• $\beta_2\text{-M}$	$1,27 \pm 0,65$	$1,47 \pm 0,49$	

(1): Através do teste t-Student com variâncias iguais.

Na Tab. 5 estão descritos os valores obtidos do leucograma dos 105 bovinos não reagentes ao VLB. Desta forma, para esse estudo, bovinos com valores acima de 11.230 leucócitos/ mm^3 e 8.440 linfócitos/ mm^3 foram considerados portadores de leucocitose por linfocitose.

Tabela 5. Resultados dos padrões de normalidade para o total de leucócitos/ mm^3 e linfócitos/ mm^3 dos 105 bovinos não reagentes ao VLB.

Variável	Média \pm Desvio padrão	IC de 95%
Leucócitos/ mm^3	10.830 ± 1.960	10.430 a 11.230
Linfócitos/ mm^3	8.000 ± 2.170	7.560 a 8.440

A partir dos limites superiores dos intervalos para o total de leucócitos/mm³ e linfócitos/mm³, os 60 animais dos grupos VLB-positivos e VLB-negativos foram classificados nas categorias de acordo com os resultados obtidos.

Na Tabela 6 estão os resultados da ocorrência de leucocitose e/ou linfocitose entre os grupos desse estudo. Destaca-se que: entre os 30 animais VLB-positivos foi registrada a presença de um pouco mais da metade (53,3% correspondente a 16 animais) com contagem de leucócitos/mm³ e linfócitos/mm³ normais e nos demais 14 animais positivos, sete (23,3%) apresentaram leucocitose por linfocitose. Esse resultado corrobora com a citação dos autores de que aproximadamente 30% dos animais de um rebanho infectados pelo VLB apresentam essa manifestação clínica (FERRER, 1979; D'ANGELINO, 1991; MELO, 1999; RADOSTITS *et al.*, 2002). Entretanto, no grupo de animais VLB-negativos todos foram negativos, onde a diferença esta que se revela significativa entre os grupos.

Tabela 6. Avaliação da ocorrência de leucocitose e linfocitose segundo o grupo.

Variáveis de categoria	Grupo				Grupo		Valor de p
	VLB-positivos (n=30)		VLB-negativos (n=30)		Total (n = 60)		
	N	%	N	%	n	%	
TOTAL	30	100,0	30	100,0	60	100,0	
• Com leucocitose por linfocitose	7	23,3	-	-	7	11,7	p ⁽¹⁾ < 0,001
• Com leucocitose sem linfocitose	7	23,3	-	-	7	11,7	
• Contagem de leucócitos e linfócitos normais	16	53,3	30	100,0	46	76,7	

(1): Através do teste Exato de Fisher.

Os valores das correlações de Pearson entre número de leucócitos/mm³ e β 2-M no grupo VLB-positivos foi 0,078 (p = 0,681) e 0,042 (p = 0,826) no grupo VLB-negativos. Os valores relativos aos linfócitos/mm³ comparados a β 2-M foi 0,200 (p = 0,289) no grupo VLB-positivos e 0,172 (p = 0,363) no grupo VLB-negativos, ou seja, as correlações foram baixas (entre 0,200 a 0,172) e não significativas. Esta similaridade dos dados entre os grupos pode ser em consequência da estratégia do próprio retrovírus de interferir no processo de apoptose dos leucócitos (GURTLER *et al.*, 2009; ERSKINE *et al.*, 2011), visto que, no resultado do leucograma de 14 bovinos VLB-positivos, as alterações leucométricas foram evidenciadas, podendo estar determinando a diminuição da liberação da β 2-M para a circulação.

CONCLUSÕES

Assim, este trabalho demonstrou que a concentração da β 2-M na população estudada não sofreu influência da infecção pelo VLB, bem como não houve correlação entre essa proteína e as alterações leucométricas vinculadas a ação patogênica do vírus. Portanto, nesse estudo, a β 2-M não se mostrou útil como recurso diagnóstico da evolução da infecção pelo VLB. Entretanto, ressalta-se a necessidade da realização de estudos em bovinos apresentando quadro de clínico de linfossarcoma, considerando que a literatura médica indica a β 2-M como importante marcador do estadiamento de pacientes humanos portadores desses tumores.

REFERÊNCIAS

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: apresentação de citações em documentos. Rio de Janeiro, 2002.

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

BRAGA, F.M.; VAN DER LAAN, C.W. Leucose enzoótica bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.; MÉNDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A.A. (Ed.). Doenças de ruminantes e eqüinos. São Paulo: Ed. Varela, p. 126-134, 2001.

BURNY, A.; CLEUTER, Y.; KETTMANN, R. *et al.* Bovine Leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Veterinary Microbiology*, v. 17, n. 3, p. 197-218, 1988.

CAPELOZI, V.L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer do pulmão. *J. Pneumol.* v. 27, p. 321-8, 2001.

COLEBUNDERS, R.; MOSES, K.R.; LAURENCE, J. *et al.* A new model to monitor the virological efficacy of antiretroviral treatment in resource-poor countries. *Lancet. Infect. Dis.*, v. 6, p. 53-59, 2006.

D'ANGELINO, J.L. Leucose Enzoótica dos bovinos - estudo retrospectivo da performance produtiva e reprodutiva de animais infectados e não infectados. 1991. 85p. Tese (livre docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ., São Paulo, 1991.

DIETEMANN, J.; BERTHOUX, P.; GAY-MONTCHAMP, J.P. *et al.* Comparison of ELISA method versus MEIA method for daily practice in the therapeutic monitoring of tacrolimus. *Nephrol Dial Transplant.*, v. 16, p. 2246-2249, 2001.

EVIRIN, P.E.; WIBELL, L. The serum levels and urinary excretion of β 2-microglobulin in apparently healthy subjects. *Scand J. Clin.*, v. 29, p. 69-74, 1972.

FERNANDES, A.C.C. Avaliação da leucometria na identificação da Leucose Enzoótica dos bovinos em rebanhos do Estado de Pernambuco. 2012. 63p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

FERRER, J.F. Bovine Leukosis: natural transmission and principles of control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 175, n. 12, p. 1281-1286, 1979.

GALINDO, R.C.G.; RÊGO, E.W.; BAPTISTA FILHO, L.C.F. *et al.* Valores de referência e influência do fator etário na concentração da Beta 2-microglobulina em uma população de bovinos leiteiros criados no Estado de Sergipe. In: XCONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 2013, Pará. *Anais...* Belém: [sn] 2013. (Resumo)

GARCIA, M. Avaliação do leucograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa branca e preta, naturalmente infectadas pelo Vírus da Leucose Bovina. 1989. 67 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1989.

IBGE. Produção de Pecuária Municipal. 2010. www.observatorio.se.gov.br/estatisticas-de-sergipe.html. Acessado em: 09 de set. 2013.

MATOKOVIĆ, D.; HASP, M.; PETRIĆ, P.; SKORVAGA, S.; RAJIĆ, M.T. Value of β 2-microglobulin in the serum of healthy subjects older than 40 years. *Ther Apher Dial*, v. 15, p. 315-318, 2011.

MELO, L.E.H. Leucose enzoótica dos bovinos. prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no agreste meridional do Estado de Pernambuco. 1991. 102p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ., São Paulo, 1991.

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

PIANTINO, P.; ADRIULLI, A.; GINDRO, T. *et al.* CA 19-9 assay in differential diagnosis of pancreatic carcinoma from inflammatory pancreatic diseases. *Am. J. Gastroenterol*, v. 81, p. 436-9, 1986.

SAMAGH. B.S.; KELLAR, J.A. Seroepidemiological survey of bovine leukemia virus infection in Canadian cattle. *Current Topics in Veterinary Medicine in Animal Science*, v. 15p, p. 397-412, 1982.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Belo Horizonte: FEPMVZ, 264 p., 2010.

ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. New Jersey: Prentice Hall, 434 p., 1996.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins. Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

2. Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados. A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

3. Orientação para tramitação de artigos

Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br. Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema. Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo. A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado. Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio. Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo. É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido. O ABMVZ comunicará via

eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

4. Tipos de artigos aceitos para publicação:

- Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 30.

- Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

- Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”. O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 12.

5. Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o Webster’s Third New International Dictionary. Para ortografia em português adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras.

- Formatação do texto

O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas. Não usar rodapé.

Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

- Seções de um artigo

Título.

Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação.

Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota: 1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação. 2. o texto do artigo em pdf não deve conter o nome dos autores e filiação.

- Resumo e Abstract.

Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

- Introdução.

Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

- Material e Métodos.

Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

- Resultados.

Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

Figura. Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

▪As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.

- Discussão.

Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes). -

- Conclusões.

As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada. Agradecimentos. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

- Referências.

As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

6. Como referenciar

- Citações no texto

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

▪autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)

▪dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

▪mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)

mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação.

Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o

sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal.

Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

- Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.): ANUÁRIO
▪ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

▪FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10, 1979.

▪HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. Not. Med. Vet., n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

▪DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

▪LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo.

▪Anais... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

▪MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

▪NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

▪SOUZA, C.F.A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.): QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

▪JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota: Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação. O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em

diligência ou “Aguardando diligência do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação: Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$70,00, por página impressa em preto e R\$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências: No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word. No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.

7. ARTIGO CIENTÍFICO III

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa tese será apresentada no artigo intitulado “**LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS CRIADOS NO ESTADO DE SERGIPE, BRASIL**” (manuscrito), que se encontra doravante anexado.

**“LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS
LEITEIROS CRIADOS NO ESTADO DE SERGIPE, BRASIL”**

Manuscrito submetido à revista
Veterinária e Zootecnia (suplemento).
ISSN 0102 -5716 *versão impressa*

LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS CRIADOS NO ESTADO DE SERGIPE, BRASIL

Serological survey of dairy cattle in enzootic leukosis raised in the state of Sergipe, Brazil

1. Roniery Carlos Gonçalves Galindo / Autor
2. Eneida Willcox Rêgo / Autor
3. Mauro Tavares de Melo / Autor
4. Luiz Carlos Fontes Baptista Filho / Autor
5. José Cláudio Torres Guimarães / Autor
6. Antonio Matos Fraga Junior / Autor
7. Artur Cezar de Carvalho Fernandes / Autor
8. Tamyres Izarely Barbosa Silva / Autor
9. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo / Autor

Instituição/Institution: 1,2,4,7,8,9. UFRPE, Recife - PE - Brasil; 3,5. UFS, São Cristovão - SE - Brasil; 6. FPD, Aracaju - SE - Brasil

ABSTRACT

According to the World Organisation for Animal Health (OIE) the spread of enzootic bovine leukosis (EBL) in dairy herds importance assumes due to the economic losses resulting from the disposal of cattle seropositive or lymphosarcoma and restriction on international trade of animals or semen and embryos. Thus, the objective of this work was to determine the frequency of seropositive cattle to bovine Leukosis Virus (BLV), using the technique of agarose gel immunodiffusion. The examinations were performed on 301 serum samples from crossbreed cattle raised in 11 established properties in the Mesoregion three that comprise the state of Sergipe, and of these, seven (63.63%) contributed with at least one positive animal. Of the 301 samples analyzed 38 (12.62%) were positive and 263 (87.38%) seronegative. The results suggest that regions studied showed a frequency of infected animals classified as VLB average, and measures should be adopted to realize the control of this insidious disease that affects domestic cattle.

Keywords: leukemia, infectious disease, diagnostic test.

INTRODUÇÃO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma doença infecto-contagiosa, de evolução crônica, etiologia retroviral e expressiva sintomatologia clínica. Sua importância está registrada nas normas da Organização Mundial de Sanidade Animal, em decorrência dos prejuízos econômicos resultantes do descarte de bovinos sororreagentes ou com linfossarcoma e da restrição ao comércio internacional dos animais ou mesmo sêmen e embriões (1).

O diagnóstico laboratorial da LEB é realizado pelos testes indiretos, tais como a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos séricos contra as proteínas virais gp51 e p24 (2).

A origem da LEB no Brasil surgiu pela introdução de animais infectados, procedentes de áreas enzoóticas (países da Europa, Estados Unidos e Canadá), nos rebanhos do Estado de Minas Gerais, sendo difundida progressivamente para outras regiões (3).

Cada vez mais, estudos de frequência clínico-epidemiológicos, revelam a intensidade da propagação dessa insidiosa doença nos rebanhos bovinos brasileiros, conferindo significativa importância à continuidade das pesquisas nesse contexto.

Assim, objetivou-se com esse estudo estabelecer a frequência de bovinos criados em propriedades sediadas nas três Mesorregiões que caracterizam morfoclimaticamente o Estado de Sergipe: Agreste, Leste e Sertão, naturalmente infectados pelo Vírus da LEB, utilizando-se o teste sorológico IDGA.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse experimento utilizou bovinos provenientes de 11 propriedades, com finalidade de produção leiteira e similaridade do sistema de produção e das condições edafo-climáticas onde permaneciam os animais. As propriedades eram localizadas nos municípios de Aracaju, Itaporanga d'Ajuda, São Cristovão, Muribeca, Campo do Brito, Aquidabã, Pinhão, Nossa Senhora da Glória e Ribeirópolis pertencentes ao Estado de Sergipe.

A amostragem foi do tipo aleatório simples (4), constituído por 20% do rebanho de cada propriedade, totalizando 301 vacas, mestiças da raça Girolando (*Bos taurus indicus*), com faixa etária entre dois e doze anos, criadas em regime semi-extensivo.

As informações sobre a caracterização do sistema de produção e a procedência dos animais, foram obtidas a partir da aplicação de um questionário com os produtores anteriormente à coleta das amostras.

Amostras de soro foram obtidas a partir da coleta do sangue por venopunção jugular, em tubos a vácuo, sem anticoagulante. Em seguida, o sangue foi centrifugado para obtenção do soro, o qual foi acondicionado em *ependorfs* mantidos sob refrigeração a -20°C até a realização do teste (5).

No Laboratório Clínico de Animais de Produção da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LACAP/UFRPE), as amostras foram submetidas às análises da IDGA, pela técnica Radial Dupla de Ouchterlony. Essencialmente, a técnica se presta para detecção de

anticorpos séricos específicos anti-VLB, através de um substrato de difusão gelatinoso, utilizando o antígeno glicoprotéico (gp 51), extraído do envelope do VLB (TECPAR[®]). A leitura das placas foi realizada 72 horas após a montagem do sistema, com a incidência de luz artificial (lanterna) em sua porção inferior da placa de Petri, 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 (6).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 301 animais utilizados no estudo foi constatado que 38 (12,62%) foram soropositivos, sendo considerado de acordo com estudiosos no assunto de intensidade média (7). Foram examinados bovinos de 11 rebanhos e, destes, sete (63,63%) contribuíram ao menos com um animal positivo, demonstrando a disseminação da doença na população estudada.

Numa pesquisa de prevalência realizada em bovinos criados na Mesorregião do sertão Sergipano (8), a falta de conhecimento dos produtores sobre a LEB foi citado como fator predisponente à disseminação da doença, sendo esse fato também constatado na presente pesquisa, assim como por outros pesquisadores (9, 10).

Verificou-se que no estudo efetuado na Mesorregião do Sertão Sergipano, a taxa de prevalência de 4,07% (11/270) foi inferior aos 12,62% encontrados neste levantamento sorológico, e que de acordo com outros autores (11,12) tal diferença pode ser justificada devido à interferência das condições edafo-climáticas que definem as características de produção de bovinos no Sertão e alguma prática de tecnificação do manejo.

Em outros estados da região Nordeste se destacam os trabalhos de prevalência realizados em doze municípios do Estado da Paraíba (13) com 8,3% (65/780) de bovinos sororreagentes e em Pernambuco (10), onde se estabeleceu a taxa de prevalência de 24,1% (343/1421), evidenciando assim, o estado de enzootia em que a doença se encontra na região, com sérios riscos de maior perpetuação do VLB entre rebanhos leiteiros nordestinos.

Apesar dos valores encontrados utilizando a IDGA estar abaixo dos levantamentos sorológicos realizados na Bahia e Pernambuco, a cronologia dos levantamentos epidemiológicos já realizados no Estado de Sergipe, reporta à disseminação desta insidiosa doença nos rebanhos, e que estes dados sinalizam para uma situação de alerta quanto às implicações na produtividade dos rebanhos leiteiros.

CONCLUSÕES

Nas condições que foram realizadas este trabalho pode-se concluir que o VLB encontra-se disseminado na população alvo do estudo com uma frequência de intensidade média e devem ser adotadas, para se realizar o controle dessa doença que acomete os rebanhos bovinos nacionais.

REFERÊNCIAS

1. World Organisation for Animal Health. OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. [internet]. 2008. [acesso em 2012 mar. 11]. Disponível em: <http://www.oie.int>
2. Evermann JF. A look at how bovine leukemia virus infection is diagnosed. Symposium on bovine leukemia virus infection. Vet Med. 1992; 3:272-8.
3. Rangel NM, Machado AV. Contribuição à oncologia comparada em Minas Gerais. Arquivos da Escola Superior de Veterinária do Estado de Minas Gerais, 1943;1:83-96.
4. Sampaio IBM. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 3rd ed. Belo Horizonte: FEPMVZ; 2007.
5. Birgel EH. Leucose enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnósticos. In: Birgel EH, Benesi FJ. Patologia clínica veterinária. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária; 1982.
6. Miller JM, Van Der Maaten MJ. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. Eur J Cancer. 1977; 13:1369-75.
7. Shettigara PT. Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel immunodiffusion test. Can J Vet Res. 1986; 50:221-6.
8. Batista JM, Batista DM, Costa JN, Barros LB, Souza TS, Almeida MGAR *et al.* Prevalência sorológica da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos bovinos da mesorregião do Sertão Sergipano. Vet Zootec. 2011; 18:4:3:716-9.
9. Matos PF, Birgel Júnior EH, Birgel EH. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre os resultados do teste de Elisa e da imunodifusão em gel de ágar. Braz J Vet Anim Sci. 2005; 42:3:171-9.
10. Fernandes ACC, Tenório TGS, Silva TIB, Mendes EI, Baptista Filho LCF, Melo LEH. Leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos: estudo retrospectivo e prospectivo da ocorrência em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco. Vet Zootec. 2011; 18:4:3:728-32.

11. Melo LEH. Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo; 1991.
12. Barros CSL. Leucose Bovina In: Riet-Correa F, Child AL, Mendez M, Lemos RAA. Doenças dos ruminantes e equinos. 3rd ed. Santa Maria: Palloti; 280-293; 2007.
13. Simões SVD. Leucose enzoótica dos bovinos. Prevalência de anticorpos séricos antivírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado da Paraíba. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo; 1998.
14. National Library of Medicine (US). International Committee of Medical Editors (ICMJE). Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: Sample references [Internet]. [acesso em 2013 jun 14]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
15. Rodrigues JG. Manual de elaboração de referências bibliográficas: normas de Vancouver [Internet]. [acesso em 2013 jun 14]. Disponível em: <http://www.bibmanguinhos.cict.fiocruz.br/pvancouver.htm>

8. ARTIGO CIENTÍFICO IV

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa tese será apresentada no artigo intitulado “**RESULTADOS DA APLICABILIDADE DA PCR NO DIAGNÓSTICO DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO DE SERGIPE**” (manuscrito), que se encontra doravante anexado.

**“RESULTADOS DA APLICABILIDADE DA PCR NO DIAGNÓSTICO DA
LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO DE SERGIPE”**

Manuscrito submetido à revista
Veterinária e Zootecnia (suplemento).
ISSN 0102 -5716 *versão impressa*

RESULTADOS DA APLICABILIDADE DA PCR NO DIAGNÓSTICO DA LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO DE SERGIPE

Results of PCR use for diagnosis of enzootic leukosis in dairy cattle of the State of Sergipe

1. Roniery Carlos Gonçalves Galindo / Autor
2. Paulo Roberto Eleutério de Souza / Autor
3. Eneida Willcox Rêgo / Autor
4. José Cláudio Torres Guimarães / Autor
5. Luiz Carlos Fontes Baptista Filho / Autor
6. Antonio Matos Fraga Junior / Autor
7. Diêgo Henrique Teotônio de Araújo / Autor
8. Artur Cezar de Carvalho Fernandes / Autor
9. Leandro Cavalcanti Souza de Melo / Autor
10. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo / Autor

Instituição/Institution: 1,2,3,5,7,8,9,10. UFRPE, Recife - PE - Brasil; 4. UFS, São Cristóvão - SE - Brasil; 6. FPD, Aracaju - SE - Brasil

ABSTRACT

The enzootic bovine leukosis (EBL) is a disease caused by an exogenous B lymphotropic retrovirus that affects the lymphoid system, causing serious consequences in the life of the animal and its production. The aim of this study was to identify the frequency of carriers of bovine leukosis virus (BLV) in the state of Sergipe, by determining the BLV proviral DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR). The genomic DNA of 301 crossbreed dairy cattle were extracted from blood by using a purification kit Wizard Genomic DNA (Promega®), using for amplification of long terminal region (LTR) of the primers LTR256 LTR453 VLB. The 200bp PCR product was analyzed on agarose gel containing 1% blue-green dye. The results showed that the 301 blood samples analyzed by PCR, 32.22% (97/301) were positive for this region of VLB. It was conclude that the PCR protocol used in this study was effective in detecting BLV-infected cattle in the state of Sergipe, emphasizing the importance of comparing these preliminary results, the testing standards considered by the World Organisation for Animal Health, with a view to validation of this technique has much to contribute to the clinical-epidemiological study of LEB in the country.

Keywords: leukemia, molecular biology, diagnostic test.

INTRODUÇÃO

Cada vez mais, estudos têm sido propostos com a intenção de melhorar a produtividade, aliada ao aprimoramento da qualidade sanitária do rebanho, visando a

elucidação e implantação de medidas estratégicas à profilaxia de possíveis enfermidades que comprometem a produção (1).

Nesse sentido, a Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB), doença de etiologia retroviral, merece destaque em decorrência dos prejuízos econômicos provenientes da redução da produção leiteira, condenação de carcaças, óbitos decorrentes da própria doença e, sobretudo, inviabilidade da exportação de animais (2).

No Brasil, desde os anos 70, investigações epidemiológicas, com a utilização da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) vêm caracterizando a capacidade de disseminação da LEB, resultando numa prevalência na região Nordeste, com taxas entre 4,07% (3) e 41% (4).

No entanto, essas frequências podem estar subestimadas em decorrência da influência de aspectos como período de infecção, se o exame for realizado antes da soro-conversão, ou pela presença de anticorpos residuais provenientes do colostro (5). Daí a importância da avaliação de métodos diretos de diagnóstico, como por exemplo, a Reação em Cadeia da polimerase (PCR), para identificar a presença do DNA viral em linfócitos de bovinos infectados pelo Vírus da Leucose Bovina - VLB (6).

No Estado de Sergipe, o único estudo registrado para detecção de bovinos portadores do VLB foi realizado através da técnica IDGA, portanto a falta de registro na literatura empregando-se a PCR no diagnóstico da LEB faz com que os resultados obtidos nesta pesquisa possam servir de divisor na aplicação de novas ferramentas de diagnóstico, da presença de bovinos infectados pelo VLB, direcionando a novas perspectivas na implementação do controle dessa doença no estado.

Assim, objetivou-se com a realização desse estudo avaliar a aplicabilidade da detecção viral baseada na região LTR usando a técnica da PCR, em bovinos infectados pelo VLB criados no Estado de Sergipe.

MATERIAL E MÉTODOS

A população estudada foi proveniente de propriedades localizadas nas Mesorregiões Leste, Agreste e Sertão do Estado de Sergipe, perfazendo um total de 301 bovinos, fêmeas, com faixa etária entre dois e doze anos, mestiças da raça Girolanda (*Bos taurus indicus*), mantidas em regime semi-extensivo.

As amostras de sangue foram obtidas por meio de venopunção jugular e acondicionadas sob refrigeração em tubos estéreis e com anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD). No Laboratório Genoma da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) o

DNA genômico foi extraído utilizando-se o kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®) seguindo-se protocolo fornecido pelo fabricante.

Posteriormente, as amostras de DNA foram submetidas a uma mistura da PCR, utilizando *primers* específicos para a região LTR (região terminal específica dos *Retrovírus*) BLV-LTR256 (5'-GAG CTC TCT TGC TCC CGA GAC-3') e BLV-LTR453 (5'-GAA ACA AAC GCG GGT GCA AGC CAG-3'), 0,5 U *GoTaq® Hot Start Polymerase* (Promega®) e 200ng de DNA (7).

As condições de ciclagem da PCR convencional foram: 94°C por cinco minutos, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, anelamento à 65°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos, seguidos de uma extensão adicional à 72°C por dois minutos.

Seguindo-se ao procedimento anterior, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,0%, coradas com *Blue Green*. O tamanho dos fragmentos obtidos da PCR foi de aproximadamente 200pb. Para evitar resultados falsos positivos, foram utilizadas nas análises amostras controle positiva e negativa, diagnosticadas através da técnica da IDGA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 301 amostras analisadas pela PCR 32,22% (97/301) foram positivas. Esse resultado demonstra que a PCR detectou uma frequência maior de bovinos infectados pelo VLB no Estado de Sergipe em comparação à taxa de prevalência anteriormente obtida que foi de 4,07% (11/270) utilizando-se a técnica da IDGA (3). Todavia, os resultados são inferiores a estudos realizados em Minas Gerais apresentando DNA proviral em 61,53% (40/65) de bovinos infectados pelo VLB, utilizando a PCR (8), e anos depois, outros autores (9) detectaram 69,51% (57/82) animais positivos pela PCR em tempo real.

A grande variação dos resultados de incidência da LEB entre as pesquisas realizadas de acordo com alguns autores (1,10) deve-se, possivelmente, às diferentes condições de manejo aplicadas aos animais em cada área geográfica, ou a não hibridação dos iniciadores causados por variações genéticas do provirus VLB.

Concordando com os pesquisadores (11) na extração de DNA das amostras, foram ponderadas todas as precauções possíveis para se evitar a contaminação dos produtos da PCR, principalmente com a utilização materiais descartáveis, uso de câmara de fluxo laminar e higienização da bancada, a fim de permitir a confiabilidade do resultado.

Dessa maneira a presente pesquisa corrobora com as discussões dos autores (9, 12) de que a PCR tornou-se mais acessível economicamente devido ao aprimoramento da técnica, variedade de reagentes e aparelhos no mercado, entretanto, essa tecnologia ainda está distante

de ser aplicada na rotina das investigações epidemiológicas, principalmente pela carência de laboratórios especializados e profissionais qualificados.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a PCR com o protocolo utilizado no atual trabalho foi eficaz na detecção de bovinos infectados pelo VLB, em propriedades estabelecidas no Estado de Sergipe, ressaltando-se a importância da avaliação comparada destes resultados preliminares, a testes considerados padrões pela World Organisation for Animal Health (OIE), com vistas à validação desta técnica que muito tem a contribuir com o estudo clínico-epidemiológico da LEB no país.

REFERÊNCIAS

1. Del Fava C, Pituco EM. Infecção pelo vírus da leucemia bovina (BLV) no Brasil. *Biológico*. 2004; 66:1/2:1-8.
2. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Clínica Veterinária – Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos*. 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
3. Batista JM, Batista DM, Costa JN, Barros SLB, Souza TS, Almeida MGAR, *et al*. Prevalência sorológica da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos bovinos da mesorregião do sertão sergipano. *Vet Zootec*. 2011; 18:4:3:716-9.
4. Matos PF, Birgel Júnior EH, Birgel EH. Enzootic bovine leukosis: prevalence of seric antibodies on dairy cows breed at Bahia and comparasion between results of ELISA and the agar gel immunodiffusion tests. *Braz J Vet Anim Sci*. 2005; 42:3:171-9.
5. De Boer GF, Boerrigter HM, Groen J, Osterhaus AD. Identification of bovine leukemia virus (BLV) infected cattle by complex-trapping-blocking (CTB) ELISA employing monoclonal antibodies directed against BLV-p24. *Zbl Vet Med B*. 1987; 34:717-28.
6. Camargos MF. Padronização de uma PCR para o diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina e sequenciamento parcial do gene *env* [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária; 2001.
7. Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. *Microbes Infect*. 2006; 8:2163-71.
8. Camargos MF, Stancek D, Lessa LM, Reis JKP, Rocha MA, Leite RC. Development of a polymerase chain reaction and its comparison with agar gel immunodiffusion test in the detection of bovine leukemia virus infection. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2003; 40:341-8.

9. Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P, Mewes G, Ebner D, *et al.* Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zbl Vet Med B*. 1996; 43:621-30.
10. Dias NL, Fonseca Junior AA, Rodrigues D, Camargos MF. PCR em tempo real para diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina. *Cienc. Rural*. 2012; 42:8:1434-9.
11. Oliveira MCS, Regitano LCA, Roese AD, Anthonisen DG, Patrocínio E, Parma MM, *et al.* Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia de polimerase. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 2007.
12. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, *et al.* The real time polymerase chain reaction. *Mol Asp Med*. 2006; 27:95-125.
13. National Library of Medicine (US). International Committee of Medical Editors (ICMJE). Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: Sample references [Internet]. [acesso em 2013 jun 14]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
14. Rodrigues JG. Manual de elaboração de referências bibliográficas: normas de Vancouver [Internet]. [acesso em 2013 jun 14]. Disponível em: <http://www.bibmanguinhos.cict.fiocruz.br/pvancouver.htm>

9. ARTIGO CIENTÍFICO V

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa tese será apresentada no artigo intitulado “**VALORES DE REFERÊNCIA E INFLUÊNCIA DO FATOR ETÁRIO NA CONCENTRAÇÃO DA BETA2-MICROGLOBULINA EM UMA POPULAÇÃO DE BOVINOS LEITEIROS CRIADOS NO ESTADO DE SERGIPE**” (manuscrito), que se encontra doravante anexado.

**“VALORES DE REFERÊNCIA E INFLUÊNCIA DO FATOR ETÁRIO NA
CONCENTRAÇÃO DA BETA2-MICROGLOBULINA EM UMA POPULAÇÃO
DE BOVINOS LEITEIROS CRIADOS NO ESTADO DE SERGIPE”.**

Manuscrito submetido à revista
Veterinária e Zootecnia (suplemento).
ISSN 0102 -5716 *versão impressa*

**VALORES DE REFERÊNCIA E INFLUÊNCIA DO FATOR ETÁRIO NA
CONCENTRAÇÃO DA BETA2-MICROGLOBULINA EM UMA POPULAÇÃO
DE BOVINOS LEITEIROS CRIADOS NO ESTADO DE SERGIPE**

*Reference values and influence of age factor in concentration of β_2 -microglobulin in a dairy
cattle population raised in the State of Sergipe*

1. Roniery Carlos Gonçalves Galindo / Autor
2. Eneida Willcox Rêgo / Autor
3. Luiz Carlos Fontes Baptista Filho / Autor
4. Artur Cezar de Carvalho Fernandes / Autor
5. Jéssica Martins de Andrade / Autor
6. Luiz Cosme da Silva / Autor
7. Tamyres Izarely Barbosa Silva / Autor
8. Antônio Matos Fraga Junior / Autor
9. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo / Autor

Instituição/Institution: 1,2,3,4,5,6,7,9. UFRPE, Recife - PE - Brasil; 6. FPD, Aracaju - SE - Brasil

ABSTRACT

The Beta2-Microglobulin (β_2 -M) is a glycoprotein characterized as a marker of activation of the immune response, present in various cell types, especially lymphocytes, being useful in establishing prognosis, assessment of therapeutic response, and as an indicator of lymphosarcoma. thus, the aim of this work to establish the reference values in β_2 -M serum concentration and evaluate the effect of the age factor crossbreed cattle, aged between two and 12 years old, clinically healthy, raised in the state of Sergipe, using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Of the 50 serum samples analyzed, the concentration of β_2 -M in all groups was $1.32 \pm 0.52 \mu\text{g/ml}$, aged up to 48 months of age was $1.28 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$ and those above 49 months $1.35 \pm 0.49 \mu\text{g/ml}$, with no significant differences between age groups ($p=0.632$) for the variables studied. It can be concluded that the age factor did not influence the values of serum β_2 -M concentration in cattle population of this study.

Keywords: tumor marker, ELISA, diagnostic test.

INTRODUÇÃO

A Beta2-microglobulina (β_2 -M) é uma glicoproteína de peso molecular correspondente a 11800 dáltons, caracterizada como marcador biológico presente em vários

tipos celulares, principalmente os linfócitos, atuando como um indicador de linfossarcoma no ser humano (1). O interesse inicial em estudar a β_2 -M em humanos surgiu pela descoberta de que essa proteína apresenta estrutura análoga às imunoglobulinas (2).

É normalmente detectada em baixa concentração, no soro humano e dos animais, entretanto, em algumas doenças virais, principalmente quando se trata de um vírus oncogênico verifica-se aumento dessa proteína (3, 4). Em humanos, essa hiperglobulinemia também tem sido relatada nas alterações da resposta imune, em pacientes com Retrovírus (5).

Estes aspectos supracitados podem ser considerados na realização de pesquisas em bovinos infectados pelo Retrovírus causador da Leucose Enzoótica Bovina (LEB), uma vez que essa doença determina a supressão da resposta imunológica ou até mesmo a gênese do linfossarcoma no animal infectado (6, 7).

No entanto, a carência de bibliografia, referente aos valores da concentração da β_2 -M em bovinos compromete os estudos comparativos dessa proteína, em animais acometidos por enfermidades cuja patogenia promove alterações no sistema imune. Tendo em vista sua relevância, objetivou-se com esse trabalho estabelecer os valores de referência da concentração sérica da β_2 -M e avaliar o efeito do fator etário em vacas, fêmeas da raça Girolanda, com faixa etária entre dois e 12 anos, clinicamente sadias, criadas no Estado de Sergipe, utilizando-se o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento foram utilizadas 50 vacas da raça Girolanda (*Bos taurus indicus*), com faixa etária entre dois e 12 anos, procedentes de propriedades localizadas no Estado de Sergipe.

A higidez dos animais foi avaliada, para evitar possíveis interferências no resultado, seguindo critérios preconizados nos compêndios clássicos de clínica buiátrica (8, 9), como também foi realizada a detecção da presença da infecção pelo Vírus da Leucose Bovina (VLB) utilizando-se a técnica da imunodifusão em gel de ágar - IDGA (10).

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção jugular, em tubos a vácuo e sem anticoagulante. O sangue colhido foi centrifugado para obtenção do soro e as alíquotas acondicionados em tubos *eppendorfs* mantidos em refrigeração a -20°C (11).

A população estudada também foi estratificada para avaliar a influência do fator etário sobre a concentração sérica da β_2 -M, assim discriminada: GI (24 a 48 meses de idade) e GII (acima de 49 meses de idade).

No Laboratório Clínico de Animais de Produção, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LACAP/UFRPE), as amostras de soro foram submetidas à quantificação da β_2 -M, utilizando-se o kit *ELISA Bovine β_2 -Microglobulin Competitive (Novateinbio Inc, Cambridge - USA)*, seguindo-se as recomendações do fabricante.

Para a análise dos dados foram utilizadas as medidas estatísticas: média, desvio padrão e o coeficiente de correlação, bem como a utilização da técnica de estatística inferencial teste t-Student. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5,0% e os intervalos foram obtidos com 95,0% de confiança (12). O programa estatístico utilizado para digitação dos dados e a obtenção dos cálculos estatísticos foi o *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, na versão 17.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto aos resultados obtidos, se identificou que dos 50 animais da população desse estudo 22 (44,0%) pertenciam ao grupo GI e 28 (56,0%) ao grupo GII. A concentração média da β_2 -M, considerando os dois grupos foi de $1,32 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$, com intervalo de confiança de [1,17 a 1,47]. Na faixa etária até 48 meses de idade foi de $1,28 \pm 0,57 \mu\text{g/ml}$ [1,03 a 1,54] e acima de 49 meses $1,35 \pm 0,49 \mu\text{g/ml}$ [1,16 a 1,54]. A partir da análise estatística não foram verificadas diferenças significativas ao nível de 5,0%, entre as variáveis estudadas ($p=0,632$).

As médias obtidas nesse estudo estão abaixo dos mensurados por outros autores (13), os quais determinaram a concentração sérica da β_2 -M de $2,87 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$ em vacas da raça Holandesa, com a utilização da técnica Radioimunoensaio (RIA) considerada de alta sensibilidade, porém requer cuidados operacionais de biossegurança.

Além disso, a concentração sérica da β_2 -M ($1,32 \pm 0,52 \mu\text{g/ml}$) desse estudo está dentro do limite dos valores de referência encontrados em pesquisas realizadas em humanos que foi de 0.94 a $2.84 \mu\text{g/ml}$ através do imunoensaio enzimático de micropartículas -MEIA (14), considerado em outros ensaios mais sensível do que o ELISA (15).

Assim, para aplicação de medidas de profilaxia no rebanho, as pesquisas em bovinos sobre a determinação da concentração da β_2 -M devem ser consideradas igualmente relevantes aos estudos que foram realizados em humanos (16), principalmente nas infecções por Retrovírus e as viroses oncogênicas.

CONCLUSÕES

O método ELISA utilizado para determinação da concentração da β_2 -M demonstrou ser de fácil execução e comprovada eficiência na obtenção dos resultados. Conclui-se também

que a concentração sérica da β_2 -M de bovinos da raça Girolanda, no Estado de Sergipe com a metodologia utilizada não sofreu influência do fator etário.

REFERÊNCIAS

1. Piantino P, Andriulli A, Gindro T, Pecchio E, Masoero G, Cavallini G, *et al.* CA 19-9 assay in differential diagnosis of pancreatic carcinoma from inflammatory pancreatic diseases. *Am J Gastroenterol.* 1986; 81:436-9.
2. Smithies O, Poulik MD. Initiation of protein synthesis at an unusual position in an immunoglobulin gene? *Science.* 1972; 175:187-9.
3. Evrin PE, Wibell L. The serum levels and urinary excretion of β_2 -microglobulin in apparently healthy subjects. *Scand J. Clin.* 1972; 29:69-74.
4. Capelozzi VL. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer do pulmão. *J. Pneumol.* 2001; 27:321-8.
5. Almeida RAMB. β_2 -microglobulina e citocinas séricas como indicadores de falha terapêutica aos anti-retrovirais [Tese]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista; 2009.
6. Schwartz I, Levy D. Pathobiology of Bovine Leukemia Virus. *Vet. Res.* 1994; 25:521-536.
7. Melo LEH. Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnia; 1991.
8. Rosenberger G. Exame Clínico dos Bovinos. 3th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993.
9. Radostits OM, Gay CC; Blood DC, Hinchcliff KW. Clínica veterinária - um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
10. Miller JM, Van Der Maaten MJ. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur. J. Cancer.* 1977;13:1369-75.
11. Birgel EH. Hematologia clínica veterinária. In: Birgel, EH, Benesi, FJ. Patologia clínica veterinária. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p.2-50.
12. Zar JH. Biostatistical analysis. 3th ed. New Jersey: Prentice Hall; 1996.
13. Kunugiyama I, Ito N, Takagaki Y, *et al.* Measurement of Beta 2-Microglobulin in bovine serum and urine by Radioimmunoassay. *J Vet Med Sci.* 1996; 58: 617-622.
14. Matoković D, Hasp M, Petrić P, Skorpava S, Rajić MT. Value of β_2 -microglobulin in the serum of healthy subjects older than 40 years. *Ther Apher Dial,* 2011; 15:315-318.

15. Dietemann J, Berthoux P, Gay-Montchamp JP, Batie M, Berthoux F. Comparison of ELISA method versus MEIA method for daily practice in the therapeutic monitoring of tacrolimus. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16:2246-2249.
16. Alrayes MH, Albaset HHA. Significance of tumor necrosis factor- α and B2 microglobulin in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Egypt J Hospit Med*. 2003; 12:28-37.

**NORMAS PARA ENVIO DOS RESUMOS
(CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA)**

1. **Os anais serão publicados como suplemento da revista científica Veterinária e Zootecnia, publicada na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.** O suplemento estará disponível on line na data do evento.
2. Os trabalhos devem ser redigidos em língua portuguesa e apresentados na forma de **resumo expandido**.
3. Serão aceitos trabalhos científicos, estudos prospectivos ou retrospectivos e relatos de caso com valor para a comunidade científica. Não serão aceitas revisões de literatura.
4. O resumo deverá ser redigido em um mínimo de três e um máximo de quatro páginas.
5. O título do trabalho deverá ser apresentado em português com espaçamento simples, em negrito, caixa alta e centralizado. Logo abaixo deve ser apresentado o título em inglês, sem negrito, em itálico, com somente a primeira letra do título em maiúsculo e centralizado.
6. Quando for o caso, indicar a entidade financiadora da pesquisa como primeira chamada de rodapé.
7. O nome do autor e co-autor(es) deverá(ão) ser indicado(s) apenas nos dados iniciais no site, quando do cadastramento e envio dos resumos. Não deverão constar do texto enviado para avaliação. O mesmo acontecerá com a filiação de cada autor e co-autor.
8. Será permitido um número máximo de nove Co-autores, totalizando com o autor principal, no máximo 10 participantes em cada trabalho.
9. No cadastramento e submissão do trabalho indicar o nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico para correspondência do autor principal. Será obrigatório o cadastramento do CPF do AUTOR e COAUTORES, exclusivamente para fins de controle de numeração de recebimento de trabalhos através do nosso sistema informatizado, evitando duplicações e erros de sistema;
10. Pelo menos um dos autores deverá estar inscrito no Congresso para a apresentação do resumo (o número máximo de resumos expandidos por inscrito será de três).
11. O texto deve ser organizado da seguinte forma:
 1. **I. Título em português;**
 2. **II. Título em inglês;**
 3. **III. Abstract** (resumo em inglês, com um máximo de 200 palavras);
 4. **IV. Keywords** (máximo de cinco);
 5. **V. Palavras-chave** (máximo de cinco);
 6. **VI. Introdução** (contendo os objetivos);
 7. **VII. Material e Métodos;**
 8. **VIII. Resultados;**
 9. **IX. Discussão** (se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente);
 10. **X. Conclusões;**
 11. **XI. Agradecimentos** (se necessário);
 12. **XII. Referências** (devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver).
12. O resumo **NÃO** deve conter tabelas, estruturas químicas e ilustrações (figuras, esquemas, gráficos, entre outros).
13. O texto deve ser digitado em espaço 1,5, fonte *Times New Roman*, tamanho de 12 pontos (Deverão ser mantidas margens de 2,5 cm à esquerda, direita, superior e inferior).
14. Não utilizar como palavras-chave e keywords, palavras que constem do título.
15. O nome do apresentador deve ser sublinhado.

16. Os casos omissos a estas normas serão submetidos ao Comitê Científico e por ele decididos.
17. As dúvidas sobre quaisquer procedimentos referentes aos trabalhos científicos encaminhados para este Congresso poderão ser sanadas através dos seguintes meios: Fale conosco disponibilizado através do site:

APÊNDICES

FIGURA 3. Linfonodo sub-ilíaco esquerdo hipertrofiado.



Fonte: Acervo pessoal

FIGURA 4. Linfonodo pré-escapular direito hipertrofiado.



Fonte: Acervo pessoal

FIGURA 5. Linfonodo pré-escapular esquerdo hipertrofiado.



Fonte: Acervo pessoal

FIGURA 6. Linfonodo sub-mandibular direito hipertrofiado.



Fonte: Acervo pessoal

Tabela 2 Concentração e leitura da absorbância da β 2-microglobulina de cada amostra do grupo de bovinos VLB-positivos.

Animal	Leitura da absorbância	Leitura da concentração de B2MG (μ g/ml)
A1	1,612	0,9205
A2	1,472	1,5988
A3	1,528	1,3275
A4	1,357	2,1560
A5	1,345	2,2141
A6	1,490	1,5116
A7	1,532	1,3081
A8	1,407	1,9138
A9	1,122	1,7083
A10	1,466	1,6279
A11	1,355	2,1657
A12	1,621	0,8769
A13	1,367	2,1076
A14	1,456	1,6764
A15	1,403	1,9331
A16	1,525	1,3421
A17	1,534	1,2984
A18	1,602	0,9690
A19	1,634	0,8140
A20	1,551	1,2161
A21	1,585	1,0514
A22	1,667	0,6541
A23	1,440	1,7539
A24	1,600	0,9787
A25	1,445	1,7297
A26	1,600	0,9787
A27	1,467	1,6231
A28	1,560	1,1725
A29	1,512	1,4050
A30	1,686	0,5620

Tabela 3. Concentração e leitura da absorvância da β 2-microglobulina de cada amostra do grupo de bovinos VLB-negativos.

Animal	Leitura da absorvância	Leitura da concentração de B2MG (μ g/ml)
A31	1,510	1,4147
A32	1,441	1,7490
A33	1,568	1,1337
A34	1,203	0,8646
A35	1,568	1,1337
A36	1,560	1,1725
A37	1,262	0,2500
A38	1,580	1,0756
A39	1,546	1,2403
A40	1,354	2,1705
A41	1,442	1,7442
A42	1,585	1,0514
A43	1,162	1,2917
A44	1,575	1,0998
A45	1,259	0,2813
A46	1,429	1,8072
A47	1,436	1,7733
A48	1,529	1,3227
A49	1,502	1,4535
A50	1,445	1,7297
A51	1,340	2,2384
A52	1,353	2,1754
A53	1,456	1,6764
A54	1,450	1,7054
A55	1,421	1,8459
A56	1,297	2,4467
A57	1,497	1,4777
A58	1,152	1,3958
A59	1,254	0,3333
A60	1,199	0,9063