

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL – MPDSA

VALTER MARCHÃO COSTA FILHO

**DIAGNÓSTICO E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO VÍRUS DA LEUCOSE
ENZOÓTICA BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS NO LESTE MARANHENSE**

SÃO LUIS – MA

2014

VALTER MARCHÃO COSTA FILHO

**DIAGNÓSTICO E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO VÍRUS DA LEUCOSE
ENZOÓTICA BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS NO LESTE MARANHENSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal da Universidade Estadual do Maranhão como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Defesa Sanitária Animal.

Área: Defesa Sanitária Animal

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos

SÃO LUIS – MA

2014

Costa Filho, Valter Marchão

C837d

Diagnóstico e fatores de risco associados ao vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos leiteiros no leste maranhense. / Valter Marchão Costa Filho. – São Luis, 2014.
84f.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação Defesa Sanitária Animal da Universidade Estadual do Maranhão, 2014.

Orientação: Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos.

1. Leucose. 2. Bovino. 3. Maranhão. 4. Vírus. 5. Frequência.
I. Título.

CDU 636.2.034

VALTER MARCHÃO COSTA FILHO

**DIAGNÓSTICO E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO VÍRUS DA LEUCOSE
ENZOÓTICA BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS NO LESTE MARANHENSE**

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de mestre em
Defesa Sanitária Animal.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos – UEMA

Orientador

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo– UEMA

1º membro

Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira – UEMA

2º membro

Dedico este trabalho aos meus pais, Valter (in memóiriam) e Maria dos Remédios; aos meus irmãos Gleiciene e Eduardo e a minha amada esposa Elane.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço . . .

A Deus, por sempre me dar força para superar os desafios da vida;

Ao meu orientador prof. Dr. Hamilton Pereira Santos, pela valiosa orientação que me foi repassado;

Ao prof. Dr. Helder de Moraes Pereira, pela sua grande colaboração a essa pesquisa;

Aos professores, Dr^a Francisca Neide Costa e Dr. Daniel Prazeres Chaves pelo esforço e empenho na implantação do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal;

Ao prof. Dr. Osvaldo Serra Pinto, presidente do Fundo de Desenvolvimento da Pecuária do Estado do Maranhão – FUNDEPEC, pela bolsa concedida;

Ao Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo, pelos ensinamentos;

A todos os demais professores do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal, em especial ao Prof^o Dr. Rabelo e Prof^o Dr. Clovis Impronta;

Aos diretores da AGED-MA, Dr. Fernando Lima e Dr^a. Margarida Prazeres, por permitirem a participação no mestrado;

A minha esposa Elane, pelo auxílio na normalização do trabalho;

Ao meu amigo Robert Barroso por sua amizade, colaboração e apoio principalmente nos momentos mais difíceis dessa caminhada;

Aos familiares de Robert Barroso, D. Socorro, sua mãe, e seus filhos, Pedro Guilherme, Robert Jr e Ticiania pela amizade e pela acolhida recebida;

As minhas amigas Adriana Prazeres Paixão e Ana Raysa, por suas inestimáveis ajudas;

A todos os demais colegas do mestrado, pela amizade construída ao longo desses dois anos;

Ao meu amigo Deolindo Neto no auxílio das coletas e processamento das amostras;

A todos os servidores da Unidade Regional de Pedreiras, em especial a Aritana Polary, Maria do Socorro, Edmilson, James Claudio, Regiane e Valdiane;

Ao médico veterinário Humberto de Campos e os demais servidores da UR de Codó, pelas coletas das amostras nos municípios de Codó, Timbiras, Alto Alegre, Peritoró e Coroatá;

Ao meu amigo médico veterinário Raimundo Nonato Monteiro Lobato, pelo auxílio nas coletas das amostras no município de Coroatá;

Ao aluno do mestrado acadêmico Rafael Soares, pela valiosa colaboração no processamento e diagnóstico das amostras;

Ao Diego e as alunas da graduação, Priscila, Carol, Thais e Jéssica pelo auxílio no processamento das amostras;

A Bibliotecária Marijane Martins e o Dr Mcgayver Rego pela confecção da ficha catalográfica e pela correção do abstract respectivamente;

Aos criadores que aceitaram ceder seus animais para realização dessa pesquisa;

A todos, meu muito obrigado.

COSTA FILHO, V. M. Diagnóstico e fatores de risco associados ao vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos leiteiros na regional de Codó – MA. [Diagnosis and risk factors associated with enzootic bovine leukemia virus in dairy cattle in the regional Codó – MA]. 2014. 84f. Dissertação (Mestrado em Defesa Sanitária Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2014.

RESUMO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma doença infecciosa, que tem evolução crônica e acomete principalmente bovinos leiteiros. A importância da doença reside nas perdas econômicas, devido ao descarte de bovinos sororeagentes, custos com o diagnóstico e o tratamento e complicações quando os animais apresentam linfossarcomas. A pesquisa foi realizada com o objetivo de determinar a ocorrência e a frequência da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) nos rebanhos com aptidão leiteira na Regional de Codó. Foram coletadas 398 amostras provenientes de 33 rebanhos dos municípios de Alto Alegre do Maranhão, Codó, Coroatá, Peritoró e Timbiras. Para o diagnóstico da enfermidade foi utilizado o teste de Imunodifusão em gel de ágar – IDGA e aplicado questionários com proprietários ou responsáveis dos animais para investigação dos fatores de risco associados à doença. A frequência de animais sororeagentes foi de 117/396 (29,55%). Os resultados observados da frequência da leucose em rebanhos foram de 31/33 (93,94%). Não houve associação estatística significativa para as variáveis estudadas ($P < 0,05$). A distribuição das frequências dos fatores de risco demonstrou que 100% dos entrevistados desconhecia a doença pesquisada, 96,97% utilizavam a mesma agulha para aplicação de vacina e vermifugação e a assistência veterinária só estava presente em 18,18% das propriedades. A distribuição espacial dos rebanhos - focos demonstrou que a Leucose está disseminada por todos os municípios pesquisados. A infecção pelo VLB está disseminada na região estudada.

Palavras-chaves: Leucose, bovino, Maranhão, vírus, frequência.

COSTA FILHO, V. M. Diagnosis and risk factors associated with enzootic bovine leukemia virus in dairy cattle in the regional Codó – MA. [Diagnóstico e fatores de risco associados ao vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos leiteiros na regional de Codó – MA]. 2014. 84f. Dissertação (Mestrado em Defesa Sanitária Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2014.

ABSTRACT

The Enzootic Bovine Leukosis (EBL) is an infectious disease which has a chronic evolution and affects mainly dairy cattle. The importance of the disease consists in economic losses due to infected bovine disposal, costs of the diagnosis and the treatment of complications and when the animals present lymphosarcomas. The research was conducted in order to determine the occurrence and frequency of Enzootic Bovine Leukosis (EBL) in cattle with dairy capability in Codo's Regional. There were collected 398 samples from 33 herds in the following cities, Alto Alegre do Maranhao, Codo, Coroata, Peritoro e Timbiras. In order to make the proper diagnosis from the disease, there was used the immunodiffusion's test from gel of agar – AGID, and applied questionnaires with owners or caretakers of animals to investigate risk factors associated with the disease. The frequency of infected animals was 117/396 (29.55%). The results observed in the frequency of leukosis herds were 31/33 (93.94%). There was no statistically significant association between the variables studied ($P < 0.05$). The frequency distribution of risk factors showed that 100% of the interviewed were unaware about the studied disease, and 96.97% used the same needle for applying vaccine and deworming and the veterinary care was only present in 18.18% of the properties. The spatial distribution of herds - focus demonstrated that Leukosis is widespread in all cities surveyed. BLV infection is widespread in the region studied.

Keywords: Leucosis, bovine, Maranhão, viruses, frequency.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de um retrovírus mostrando seus componentes. RNA: genoma; NC: proteína do nucleocapsídeo (p12); CA: capsídeo (p24); MA: matriz (p15); IN: intregase; RT: transcriptase reversa; PR: protease; TM: glicoproteína transmebranase (gp30); SU: glicoproteína de superfície (gp51); ENV: envelope.....	22
Figura 2: Ciclo simplificado replicativo dos retrovírus.....	24
Figura 3. Mapa político do Maranhão com destaque para municípios da Regional de Codó – MA, 2014.	46
Figura 4. Distribuição espacial dos rebanhos foco de LEB na Regional de Codó – MA, 2014.....	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Abordagens disponíveis para erradicação, controle e prevenção da Leucose Enzoótica Bovina.	43
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de rebanhos e animais amostrados por município na Regional de Codó – MA, 2014	48
Tabela 2. Distribuição do número de amostra por faixa etária na Regional de Codó – MA, 2014	48
Tabela 3. Frequência de bovinos reagentes e não reagentes para Leucose no teste de IDGA na Regional de Codó - MA, 2014	51
Tabela 4. Frequência de bovinos reagentes e não reagentes ao teste de IDGA por município na Regional de Codó-MA, 2014	51
Tabela 5. Número de rebanhos com bovinos reagentes e não reagentes ao teste de IDGA, Regional de Codó – MA, 2014.....	52
Tabela 6. Distribuição da frequência de bovinos reagentes e não reagentes por rebanho utilizando o teste de IDGA, Regional de Codó – MA, 2014.....	53
Tabela 7. Distribuição de bovinos reagentes e não reagentes por faixa etária ao teste de IDGA, Regional de Codó – MA, 2014	57
Tabela 8. Distribuição da frequência de bovinos reagente e não reagente por sexo ao teste de IDGA, Regional de Codó – MA, 2014	58
Tabela 9. Distribuição da frequência de bovinos reagentes e não reagentes por tamanho da propriedade ao teste de IDGA, Regional de Codó – MA, 2014	59
Tabela 10. Distribuição da frequência de bovinos reagentes e não reagentes por tamanho do rebanho ao teste de IDGA, Regional de Codó – MA, 2014	59
Tabela 11. Variáveis avaliadas para o estudo dos fatores de risco para o vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos na Regional de Codó - MA, 2014	60

Tabela 12. Distribuição das frequências dos fatores de risco para Leucose Enzoótica Bovina (LEB) em rebanhos na Regional de Codó - MA, 2014	61
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

nm -nanômetro

km² - Kilometros quadrado

% - Porcentagem

AGED-MA - Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Estado do Maranhão

Ag - antígeno

Ac - anticorpo

BLV - Bovine Leucosis Vírus

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EUA - Estados Unidos da América

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

GPS - Global Positioning System

GP - Glicoproteínas

HTLV1 - Vírus de linfócito T humano tipo 1

HTLV2 - Vírus de linfócito T humano tipo 2

IDGA - Imunodifusão em Gel de Agar

LEB - Leucose Enzoótica Bovina

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

PCR - Polymerase Chain Reaction

RNA - Ácido Ribonucléico

RNA_m - Ácido Ribonucléico mensageiro

TECPAR - Instituto de Tecnologia do Paraná

UV - Ultra Violeta

VLB - Vírus da Leucose Bovina

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Geral.....	19
2.2 Específico.....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Histórico	20
3.2 Agente Etiológico	21
3.3 Epidemiologia.....	24
3.3.1 Fonte de infecção	25
3.3.2 Vias de Eliminação	25
3.3.3 Transmissão.....	25
3.3.4 Porta de Entrada	27
3.3.5 Hospedeiros susceptíveis.....	27
3.3.6 Distribuição.....	27
3.3.6.1 Situação da Leucose Enzoótica Bovina no Mundo	27
3.3.6.2 Situação da Leucose Enzoótica Bovina no Brasil	30
3.3.6.3 Situação da Leucose Enzoótica Bovina no Maranhão	35
3.4 Patogenia	36
3.5 Resposta imunológica	36
3.6 Sinais Clínicos.....	37
3.7 Diagnóstico.....	38
3.7.1 Radioimunoensaio (RIA)	38
3.7.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	39
3.7.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	39
3.7.4 Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA).....	40

3.8 Controle, Profilaxia e Erradicação	40
3.9 Importância Econômica	44
4 MATERIAL E MÉTODO	46
4.1 Região Estudada.....	46
4.2 Definição da Amostra	47
4.3 Coletas das Amostras	49
4.4 Prova sorológica.....	49
4.5 Estudo dos Fatores de Risco	50
4.6 Análises Estatísticas	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÃO.....	63
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS	
APÊNDICES	
ANEXO	

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira apresentou um crescimento nas últimas décadas e atualmente o efetivo bovino do país ultrapassa as 206 milhões de cabeças, sendo que na região Nordeste está concentrado 16,88% do rebanho nacional (MAPA, 2011).

O Maranhão Localiza-se no extremo oeste da Região Nordeste e limita-se com três estados, o Piauí ao leste, o Tocantins ao sul e sudoeste e o Pará a oeste, além do Oceano Atlântico ao norte. Sua área é de 331 937,450 km², sendo o segundo maior estado da Região e o oitavo maior estado do Brasil. A agricultura e a pecuária são atividades importantes na economia do Maranhão. O Estado possui aproximadamente 7,3 milhões de cabeça de gado bovino, em mais de 77 mil propriedades, onde destas, 4.262 são propriedades com aptidão leiteira, produzindo aproximadamente 360.000 litros de leite por dia. Estes dados fazem do Estado o segundo maior rebanho do Nordeste e o décimo segundo do Brasil (MAPA, 2011; AGED/MA, 2013).

A regional de Codó localiza-se na mesorregião dos Cocais Maranhenses, na bacia do Rio Itapecurú. A regional é composta pelos municípios de Codó, Timbiras, Coroatá, Peritoró, Alto Alegre do Maranhão e São Mateus. A região tem uma população de 292.646 habitantes em uma área de 10.103.068 km² e um rebanho bovino de aproximadamente 225 mil cabeças. A economia baseia-se principalmente no setor primário e terciário, sendo a bovinocultura uma das forças motriz da economia da região (IBGE, 2010; AGED-MA, 2013).

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma doença infecciosa, causada pelo um vírus, que tem evolução crônica e acomete bovinos, principalmente o rebanho leiteiro, devido às condições intensivas ou semi-intensivas a que são submetidos (RADOSTITS et al., 2002).

A doença está difundida por todo o mundo, com situações epidemiológicas distintas em cada país e com variações de ocorrência entre os rebanhos, sendo maior no rebanho leiteiro. Países da Europa Ocidental já teriam conseguido erradicar a doença depois de implantarem programas de controle (BRAGA et al., 1998; OIE, 2014).

Estudos recentes realizados por Santos et al., (2011) Chaves et al., (2012) Oliveira, et al., (2013) e Soares et al., (2013) demonstram a presença da Leucose Enzoótica bovina no rebanho maranhense.

A Leucose Enzoótica Bovina foi descrita pela primeira vez na Europa em 1871 e hoje possui distribuição mundial, principalmente devido à movimentação e importação de animais após a segunda guerra mundial (OLSON & MILLER, 1987; BIRGEL et al., 1991).

A doença é causada pelo BLV, vírus pertence à família *Retroviridae*, gênero *Deltaretrovirus*. Os retrovírus, como são conhecidos os membros desta família, possuem a enzima transcriptase reversa, que sintetiza cópias de DNA pró-viral a partir do RNA viral podendo infectar linfócitos B, linfócitos T e monócitos (MURPHY et al., 1999; ICTV, 2014).

A transmissão horizontal é a principal forma de contágio da doença, principalmente através de fômites contaminados com sangue, tais como agulhas, seringas, instrumentos cirúrgicos, instrumentos de castração, instrumentos de descorna, luvas de palpação retal e de procedimentos cirúrgicos, tatuadores e aplicadores de brincos (BRAGA et al., 1998; LEUZZI JUNIOR et al., 2001; FLORINS et al., 2007; RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

A doença está distribuída por todo o país e a sua importância reside nas perdas econômicas, principalmente devido ao descarte de bovinos sororeagentes, diminuição da produção leiteira, custos com o diagnóstico e tratamento e custos com as complicações devido à ocorrência de linfossarcomas (LEUZZI JUNIOR et al., 2001).

A presença da doença implica em barreiras ao comércio internacional de animais, de sêmen e embriões, onde atualmente a maior parte dos países importadores exigem resultados negativos para a doença (FAVA & PITUCA, 2004).

Portanto, diante do exposto e considerando que a área estudada não apresenta informações sobre a situação da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina, este estudo científico visa determinar a frequência da enfermidade utilizando o teste de Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA) em rebanhos bovinos leiteiros nos municípios de Codó, Timbiras, Coroatá, Peritoró, Alto Alegre e São Mateus no Estado do Maranhão.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Determinar a frequência da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) nos rebanhos com aptidão leiteira na Regional de Codó.

2.2 Específico

- Identificar os fatores de risco associados à transmissão da Leucose Enzoótica Bovina (LEB);
- Estimar a faixa etária com maior frequência a da Leucose Enzoótica Bovina (LEB);
- Distribuir espacialmente os focos da infecção nos rebanhos da região.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico

A Europa é considerada o berço da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina. A primeira descrição da doença foi realizada por Leisering em 1871 na Alemanha e publicada na German Medical of Veterinary Journals. Leisering observou nódulos branco-amarelados compostos por células linfóides no baço de um animal. Este é considerada o primeiro relato da leucose bovina (OLSON & MILLER, 1987).

Após a Segunda Guerra Mundial a grande movimentação de animais provocada pelas migrações, permitiu que a doença se espalhasse por toda a Europa e em seguida para todos os continentes (BIRGEL et al., 1991). Porém, casos de bovinos com hipertrofia generalizada dos linfonodos, esplenomegalia e leucocitose já eram relatados na literatura americana antes da virada do século 20 (OLSON & MILLER, 1987).

Segundo Olson & Miller, (1987), vários outros registros da Leucose Enzoótica Bovina foram feitos em diversos países da Europa no início do século 20. Na Suécia a doença foi observada por Hjarre (1926) e Bendixen, (1927), no Reino Unido, casos de leucose bovino foram relatados por Jones (1929), na Holanda, incidentes com a doença foram descritas pela primeira vez por Jong (1931) e Vloten (1932). Na Bélgica casos da doença foram observados por Deriveaux em 1960. Na França a doença foi confirmada em partes do nordeste e noroeste do país por Lazar et al.(1937), Drieux (1938) Lombard (1939). Casos de leucose também foram relatados na Áustria por Reisinger (1941), Itália por Moretti (1944) e Machioni (1945) e na Espanha por Lozano em 1946.

A importação de animais foi o principal mecanismo de propagação da doença. A infecção difundiu-se no gado americano e canadense contribuindo para a disseminação do BLV a outros países da América do Sul (JOHNSON & KANEENE, 1992). A entrada da doença no Brasil pode ter ocorrido por meio da importação de animais dos EUA e Canadá (BRAGA et al., 1998).

O primeiro relato da leucose enzoótica bovina na Colômbia foi realizado em 1957 a parti de casos clínicos e necropsias em animais (AFONSO et al., 1998). Segundo Resoagli et al., (2014) na Venezuela, a doença foi relatada pela primeira

vez por Marin et al., (1979), no Chile por Cripe et al., (1971) e Wittwer et al., (1971) e na Argentina foi confirmada sorologicamente por Murtagh et al., (1978).

A primeira citação da doença no Brasil foi realizada por Rangel & Machado (1943) e publicado nos Arquivos da Escola Superior de Veterinária de Minas Gerais, onde, foi observada a ocorrência de linfossarcoma em quatro bovinos no estado de Minas Gerais.

O vírus da leucose foi isolado pela primeira vez por Miller et al. em 1969, o que contribui para o desenvolvimento de técnicas sorológicas que permitiram o diagnóstico da infecção, como a imunodifusão dupla em gel de ágar, utilizando o antígeno da cápsula do vírus da Leucose Bovina (gp 51). A técnica de IDGA descrita por Miller & Van Der Maaten em 1977, é empregada nos programas de controle da Leucose em vários países. Atualmente, outras técnicas de diagnóstico estão disponíveis no mercado, porém a praticidade, o baixo custo e a especificidade tornaram o IDGA um teste amplamente utilizado para o diagnóstico da LEB em todo o Mundo (BIRGEL et al., 1991; LEUZZI JUNIOR et al., 2001).

3.2 Agente Etiológico

De acordo com o International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV o vírus causador da LEB, é um RNA vírus pertencente à família: *Retroviridae*, subfamília: *Orthoretrovirinae*, gênero: *Deltaretrovírus*, espécie: *Bovino Leucose Vírus* (BLV). O seu material genético é diplóide, ou seja, possui dupla fita de RNA simples de polaridade positiva (MURPHY et al., 1999; ICTV, 2014).

O nome retro (reverso) origina-se pela presença da enzima transcriptase reversa em todos os vírus desta família. O BLV é um retrovírus esférico e envelopado, tem cerca de 80-100nm de diâmetro e possui uma estrutura de três camadas, a mais interna é o complexo genoma - nucleoproteína, que inclui aproximadamente trinta moléculas de transcriptase reversa (MURPHY et al., 1999). Sua composição química é de 60% de proteínas, 35% de lipídeos, 2,2% de ácido nucléicos e 0,5% de carboidratos (ABRAMOVA et al., 1974; MUSSGAY et al., 1978). O vírus faz sua replicação dentro do núcleo da célula hospedeira e possui uma baixa taxa de transcrição. O VLB pode levar até 10 horas para completar todo o processo de formação de um novo vírion (MURPHY et al., 1999).

O Vírus da Leucose se caracteriza por infectar preferencialmente linfócitos B, mas também é capaz de infectar células T, monócitos e granulócitos.

(SCHWARTZ et al., 1994; MURPHY et al., 1999). O vírus também pode causar alterações na atividade fagocitária e no metabolismo oxidativo de monócitos-macrófagos alterando as suas funções (AZEDO et al., 2011).

O envelope viral é formado por glicoproteínas (gp) as principais são gp51 e a gp30. Ambas auxiliam o vírus na sua fusão com a célula alvo. O vírus é transcrito a partir do DNA presente no provírus. O DNA do provírus possui uma proteína percussora de envelope (Pr72) a qual é responsável pela formação das glicoproteínas GP51, considerada uma proteína de superfície e a GP30 que é transmembrânica. (SUZUKI & IKEDA, 1998; FLORINS, et al., 2007).

Os vírus da família Retroviridae possuem três genes em comum em seu material genético o “gag”, “pol” e “env” estes genes codificam as proteínas estruturais, transcriptase reversa ou polimerase de DNA e as glicoproteína do envelope respectivamente (FERRER et al.,1993; BRAGA et al., 1998).

O VLB e os outros membros do seu grupo, possuem na região 3’ chamada de região “X” os genes Tax, Rex, R3 e G4, que são importantes no ciclo do vírus dentro da célula do hospedeiro pois codificam as proteínas virais regulatórias e estão envolvidos na regulação da expressão gênica (LEUZZI JUNIOR et al., 2001; GILLET et al., 2007). Uma quarta região foi observada no BLV, onde foi localizado o gene “sarc” ou “onc”, característico desse vírus (FERRER et al.,1993).

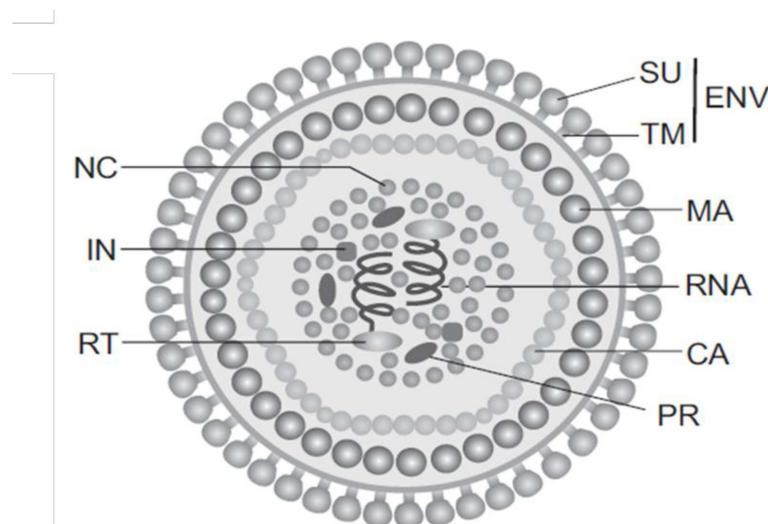


Figura 1: Representação esquemática de um retrovírus mostrando seus componentes. RNA: genoma; NC: proteína do nucleocapsídeo (p12); CA: capsídeo (p24); MA: matriz (p15); IN: integrase; RT: transcriptase reversa; PR: protease; TM: glicoproteína transmembranase (gp30); SU: glicoproteína de superfície (gp51); ENV: envelope. Fonte: (FLORINS et al., 2007; RAVAZZOLO & COSTA ,2007)

Os genes Tax e Rex codificam proteínas reguladoras do genoma viral e são importantes no processo de infecção do vírus. O Tax é um regulador indireto da transcrição do genoma proviral, quando interage com diferentes proteínas regulatórias celulares. Este desenvolve importante papel na ativação de genes celulares, atua na transcrição de receptores de citocinas (IL-2) e promove aumento da velocidade de transcrição viral pela ativação do LTR (FLORINS et al., 2007).

Os genes acessórios (Tax e Rex) também são observados no Vírus da Leucemia dos Linfócitos T em Humanos 1 e 2 (HTLV-1 e 2) e devido essa homologia genética o VLB também tem sido usado como modelo de estudo dessa doença pois apresenta muita similaridades estruturais, genômicas e patogenicidade com o vírus da leucemia humana (RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

A infecção se inicia pelo reconhecimento e ligação do vírus na célula alvo, o vírus após ligar-se ao linfócito, libera todo o seu conteúdo (nucleocapsídeo) dentro do citoplasma da célula hospedeira. Este evento é mediado pela glicoproteína do envelope, que interage com receptores específicos da membrana plasmática da célula alvo (RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

Por sua vez a enzima transcriptase reversa transcreve uma das fitas de RNA em fita dupla de DNA, esta fita migra até o genoma do linfócito com ajuda da integrase viral. Após se ligar ao genoma da célula hospedeira, o provírus passa a utilizar os comandos celulares para transcrição de RNA genômico e a produzir RNAm, que posteriormente é traduzido em proteínas virais no citoplasma. O vírus é liberado da superfície do linfócito revestido externamente pela membrana celular (LEUZZI JUNIOR et al. 2001; GILLET et al., 2007; RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

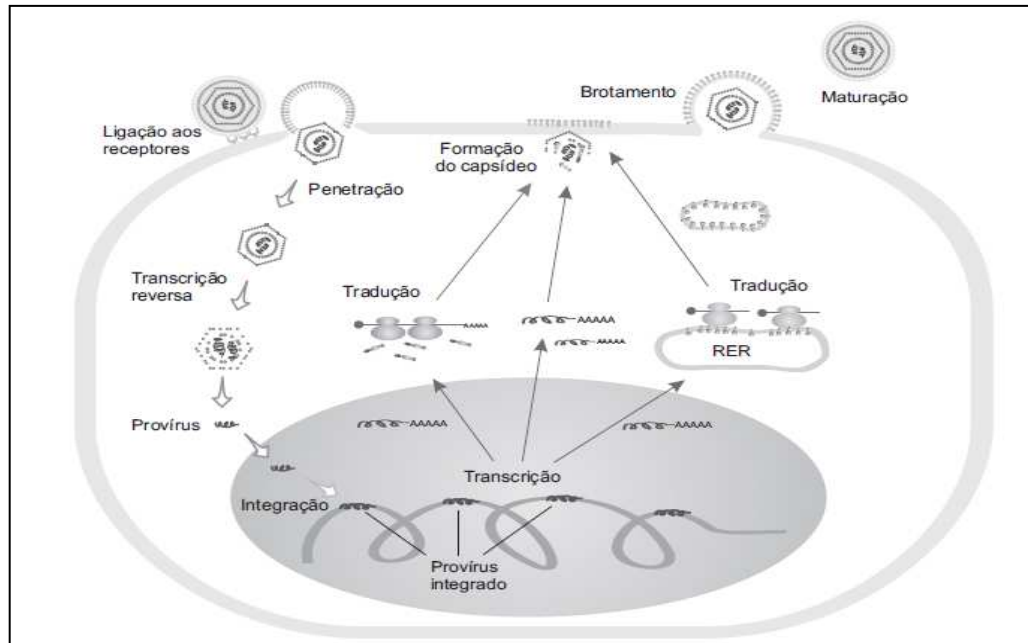


Figura 2: Ciclo replicativo simplificado dos retrovírus.

3.3 Epidemiologia

A Leucose Enzoótica Bovina teve sua origem na Europa e hoje possui distribuição mundial, com exceção de alguns países europeus que erradicaram a infecção a partir da década de 1980 (RAVAZZOLO & COSTA, 2007). A prevalência varia amplamente entre rebanhos (LEUZZI JUNIOR et al., 2001) porém é mais alta em grandes rebanhos do que em rebanhos menores, sendo maior em rebanhos leiteiros, comparada aos rebanhos de corte, provavelmente devido ao o confinamento mais restrito e a idade média mais alta dos rebanhos leiteiros (RADOSTITS et al., 2002).

Assim como os outros retrovírus, o BLV apresenta uma baixa transmissibilidade, ou seja, não é facilmente transmitido. A transmissão ocorre predominantemente entre animais do mesmo rebanho, e é incomum ocorrer entre rebanhos vizinhos. A transmissão iatrogênica, pela aplicação de vacinas, uso compartilhado de agulhas hipodérmicas, administração de medicamentos e procedimentos de palpação com toque retal contribuem de forma importante para a disseminação da infecção dentro dos rebanhos (RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

Os retrovírus podem ser inativados por solventes e detergentes lipídicos (álcool, éter, clorofórmio), pela temperatura de 56°C durante 30 minutos. O BLV é mais resistente ao raio UV e radiações-X do que os outros vírus. Uma possível explicação seria por possuírem um genoma diplóide (FERRER et al., 1993).

3.3.1 Fonte de infecção

A espécie bovina é a principal fonte de infecção do VLB, animais doentes ou portadores que albergam o agente etiológico, podem transmitir o vírus direta ou indiretamente a outros animais susceptíveis (DEL FAVA & PITUCO, 2004).

3.3.2 Vias de Eliminação

As vias de eliminação contêm linfócitos contaminados pelo vírus e a mais importante é o sangue de bovinos infectados, mais o leite desempenha importante papel na transmissão do VLB para animais lactentes (JOHNSON & KANEENE, 1992).

As vacas positivas prenhes podem transmitir o vírus para o feto; porém, menos de 10% dos animais nascidos de vacas positivas tornam-se portadores do vírus ao nascer. Em trabalhos, que analisam a transferência de embriões a partir de doadoras infectadas pelo BLV, não foi detectada transmissão para os embriões ou para as receptoras (RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

3.3.3 Transmissão

A infecção pelo VLB está estritamente relacionada às práticas de manejo adotadas nas propriedades. Principalmente em propriedades mais tecnificadas, devido ao manejo intenso em que o rebanho é submetido, como a palpação retal, imunização, transfusão sanguínea e cirurgias. Esses procedimentos permitem a transferência de linfócitos infectados entre animais no rebanho (BRAGA & LAAN, 2001).

A transmissão horizontal é a principal via de disseminação do vírus. A transmissão através de fômites contaminados com sangue, como agulhas, seringas, instrumentos cirúrgicos, instrumentos de castração, instrumentos de descorna, luvas de palpação retal e de procedimentos cirúrgicos, tatuadores e aplicadores de brincos são os principais meios de veiculação e transmissão do BLV (BRAGA et al., 1998; RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

Já a transmissão vertical da LEB pode ocorrer pela via uterina ou mesmo oral, através da ingestão de colostro e leite contendo linfócitos contaminados com o BLV.

Lucas et al., (1980) identificou partículas do VLB no sêmen de um touro, mas embora o vírus possa ser ocasionalmente encontrado no sêmen de touros, a inseminação artificial não parece ser um meio importante de disseminação do vírus.

Pesquisa recente realizada por Khamesipour et al., (2013) no Irã, utilizando o PCR demonstram a presença do BLV em 9 de 42 (21,42%) amostras de sêmen de bovinos. Outra pesquisa no mesmo país encontrou o DNA proviral pelo PCR em 36 das 172 amostras (20,93%) de sêmen de touros utilizados para inseminação artificial (SHARIFZADEH et al., 2011).

A transmissão do BLV no período pré-natal, pela via uterina, frequentemente ocorre após o primeiro trimestre de gestação em até 8% das gestações de animais soropositivos (FERRER et al.,1993; LEUZZI JUNIOR et al., 2001).

Apesar do VLB ser detectado no leite de vacas infectadas, e a ingestão de leite sem pasteurização representar um risco, no entanto não há evidências de que o VLB tenha potencial zoonótico (RADOSTITS et al., 2002).

Em estudo realizado por Lages (2007), para investigar a possibilidade da transmissão do vírus da leucose para cabritos recém-nascidos amamentados com colostro de vacas soropositivas detectou que, após o declínio da imunidade passiva nenhum caprino soroconverteu na vida adulta. Concluindo que o colostro de vacas soropositivas para LEB não é considerado um meio eficiente para a transmissão do VLB para caprinos.

KOHARA et al., (2006), examinando se o vírus da leucose bovina (BLV) possa ser transmitido através da palpação retal com a utilização da mesma luva obstétrica entre uma vaca BLV - positiva e novilhas BLV - negativos. Encontrou como resultado que três das quatro novilhas desenvolveram anticorpos contra BLV, determinado pelo teste de imunodifusão em ágar-gel (IDGA) entre a 7ª e 10ª semana após a primeira palpação retal. O DNA proviral do BLV foi detectado por PCR entre a 1ª e 5ª semana, ou seja, mais cedo do que a detecção dos anticorpos pelo teste de IDGA. Esse experimento demonstrar que a palpação retal é um mecanismo potencial de propagação do BLV em rebanhos, e que a detecção do DNA pró-viral em bovinos pela técnica de PCR é útil para o diagnóstico da infecção pelo BLV no rebanho.

3.3.4 Porta de Entrada

As portas de entrada do VLB, comprovadas por inoculação experimental são: a intradérmica, intramuscular, subcutânea, intravenosa, oral, intraperitoneal, intratraqueal e intra-retal (VAN DER MAATEN & MILLER, 1977; EVERMAN et al., 1986; BRAGA et al., 1998).

3.3.5 Hospedeiros susceptíveis

Em condições naturais, o vírus pode infectar bovinos, zebuínos, búfalos e capivaras (*Hydrochoerus hydrochoerus*). Infecções experimentais já demonstraram a susceptibilidade de ovinos, caprinos e coelhos. Os coelhos podem desenvolver tumores ou imunodeficiência após um tempo variável de incubação (RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

Todas as raças de bovinos são susceptíveis a infecção pelo vírus da leucose e normalmente os animais acometidos apresentam mais de dois anos de idade, sendo que a prevalência aumenta com a idade e há uma maior incidência de desenvolvimento de tumores em bovinos com idade entre quatro e oito anos (BRAGA et al., 1998); (RADOSTITS et al., 2002).

Del Fava et al., (2010) pesquisando a ocorrência de ovinos sororreagentes ao vírus da Leucose Bovina em 2.592 amostras proveniente dos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Pernambuco, Maranhão, Pará, Bahia, Mato Grosso, Rondônia e Acre, encontrou dois ovinos naturalmente infectados pelo VLB.

3.3.6 Distribuição

3.3.6.1 Situação da Leucose Enzoótica Bovina no Mundo

A doença está difundida por todo o mundo, mas em situações epidemiológicas distintas em cada país e com variações de ocorrência entre os rebanhos, sendo maior no rebanho leiteiro. Países da Europa Ocidental depois de implantarem programas de controle já teriam conseguido erradicar a doença; (BRAGA et al., 1998; OIE, 2012), porém a situação é diferente na Europa Oriental, onde a doença ainda está presente em vários países como a Bulgária, Croácia, Estônia, Letônia, Polónia, Roménia e Ucrânia (RODRÍGUEZ et al 2011).

Na Ásia, mais especificamente no Japão, um estudo soroepidemiológico realizado por Murakami et al., (2011) utilizando um total de 5.420 bovinos (3966

bovinos de leite, 797 animais de reprodução; 657 animais de engorda) em 209 fazendas, em sete prefeituras, utilizando os testes de ELISA e IDGA encontrou prevalência global de 28,6%. A prevalência da infecção pelo BLV em bovinos de leite foi de 34,7% em bovinos de engorda de 7,9% e em animais de reprodução 16,3%.

No mesmo país, estudo realizado em 139 fazendas encontrou que em 110/139 (79,13%) propriedades possuíam pelo menos um animal positivo para LEB utilizando o teste de ELISA. A análise de regressão logística determinou que o sistema de criação livre, descorna, e um grande número de mutucas no verão como fatores de risco para a LEB. O descarte do colostro de vacas positiva foi considerado um fator de proteção (KOBAYASHI et al., 2010).

Em províncias localizadas no Nordeste do Irã, Mousavi et al., (2014) pesquisando a LEB em um total de 429 amostras de sangue coletadas em laticínios industriais, utilizando para diagnóstico o ELISA indireto, encontrou como resultado que 109/429 (25,40%) foram soropositivo para o BLV.

Na Bulgária, estudo realizado para determinar a evolução da infecção pelo BLV na população bovina daquele país, mostra incidência considerável da doença no país, variando de 8,49 % em 1997 a 22,26% em 2004. Nos outros anos as prevalências encontradas foram de 18,48% em 1998, 9,47% em 1999, de 14,02% em 2000, 11,84% em 2001, 10,94% em 2002 e 7,6% em 2003 (SANDEV et al., 2006)

Na Turquia, Kale et al., (2007) em pesquisa com 109 animais, 65 vacas foram soropositivas para leucose utilizando o teste de ELISA, onde a prevalência foi de 59,6%. A prevalência em vacas de 1ª lactação foi de 52,6% as vacas na 2ª lactação apresentaram prevalência de 62,8%, em 3ª lactação de 64,7%, em 4ª lactação de 61,5%, e em 5ª lactação a prevalência foi de 66,6%.

No Canadá nas províncias de New Brunswick, Nova Scotia, e Prince Edward Island, foi realizada uma pesquisa onde foram utilizados 30 rebanhos, sendo selecionados aleatoriamente em cada rebanho 30 vacas. A pesquisa encontrou prevalência em animais de 20,8% e em rebanho de 70,0% utilizando o teste de ELISA para diagnóstico da LEB (VANLEEUEWEN et al., 2001).

Em outra província no Canadá, Saskatchewan, foram coletados amostra de 1.530 vacas leiteiras em 51 rebanhos para determinar a presença de anticorpos

contra o vírus da leucose bovina, onde encontrou-se prevalência de 37,4% em animais e 89,1% em rebanhos (VANLEEUEWEN et al., 2005).

Informações sobre a situação epidemiológica da LEB nos Estados Unidos foram coletadas através do Monitoramento Nacional de Saúde Animal (NAHMS) realizado pelo Departamento de Agricultura (USDA) daquele país. Este levantamento realizado em 2007 revelou que 83,9% dos rebanhos leiteiros dos EUA foram positivos para LEB, pesquisa esta realizada em tanque de captação de leite utilizando o teste de ELISA (RODRIGUES et al., 2011).

Em outros estudos realizados no mesmo país, Burrridge et al., (1981) utilizando o teste IDGA, no estado na Flórida (EUA) encontrou prevalência de 47,8%. Kaneere et al., (1983) e Evermann et al., (1990) pesquisando a ocorrência da doença nos EUA encontraram respectivamente prevalências de 30,0% e 12,50%.

Na América do Sul, na Colômbia a prevalência encontrada foi de 43,9% em animais e 55,23% em propriedades, estudo este realizado em 51 municípios das regiões de Sabana de Bogotá, Valle de Chiquinquirá e Valle de Ubaté (ALFONSO et al., 1998).

Em Monteria, na província de Córdoba na Colômbia, um estudo foi realizado com 137 amostras de vacas com histórico de infertilidade e em 26 amostras de touros pertencentes a 28 fazendas. As amostras foram testados para determinar a presença de anticorpos contra o vírus da leucose bovina utilizando a técnica ELISA. O resultado mostrou uma soroprevalência de 35/163 (21%) para BLV. Não houve associação significativa das variáveis estudadas (raça, idade ou estado reprodutivo dos animais) ($p \geq 0,05$) com a presença de anticorpos contra o vírus da leucose bovina (BETANCUR & RODAS, 2008).

Benavides et al., (2013) em pesquisa realizada em San Juan de Pasto capital do departamento de Nariño na Colômbia, encontrou prevalência da LEB de 19,83% em 242 amostras de vacas com idade superior a 24 meses provenientes de sete rebanhos leiteiros.

Na Argentina na província de Pampa se analisou a presença da LEB em 1.798 amostras de soro de vacas provenientes de 30 rebanhos. Os soros foram analisados utilizando a técnica de IDGA, e a prevalência de rebanhos foi de 10% e a populacional de 0,17% (RUBIANES, 2004).

Em outra pesquisa realizada em três departamentos (Maracó, Realicó e Chapaleufú) na zona norte da província de Pampa na Argentina, encontrou

prevalência de 18,5% em 200 amostras provenientes de três explorações leiteiras (Baruta et al., 2012).

Jacobo, (2012) pesquisando a infecção pelo BLV em 528 fêmeas bovinas de acima dois anos em 28 rebanhos de sete departamentos da província de Corrientes na Argentina (Capital, Curuzu Cuatia, Stoned, Goya, Itati, Monte Caseros e San Cosme), 116 (21,9%) foram soropositivos pela técnica de imunodifusão gel de ágar (IDGA).

3.3.6.2 Situação da Leucose Enzoótica Bovina no Brasil

Diversos trabalhos no Brasil demonstram a presença do VLB na população bovídea, principalmente com aptidão leiteira, encontrando prevalência variada ao longo dos anos.

No Rio Grande do Sul em pesquisa realizada por Piosevan et al., (2013) analisando um total de 6.092 amostras de soro bovino submetidas à técnica de imunodifusão em gel de Agar (IDGA) para detecção de anticorpos específicos contra o vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV), 41,3% das amostras testadas apresentaram anticorpos específicos contra o o BLV.

Franceloso et al., (2008) pesquisando a prevalência da leucose em 26 propriedades leiteiras no Rio Grande do Sul, destas propriedades, 16/26 (61,5%) apresentou pelo menos um animal reagente para a doença. Para a detecção de anticorpos contra o BLV foi utilizado o teste de imunodifusão em gel de Agar (IDGA).

Rocha et al., (2014) em estudo para identificar a prevalência da LEB em rebanhos de 10 cidades da região Sudoeste do Paraná, das 1.706 amostras sanguíneas de bovinos analisadas 284 apresentaram anticorpos contra o Vírus da Leucose Bovina (VLB), o que significa uma prevalência de 16,64%.

Em estudo realizado por Barros Filho et al., (2010), de um total de 268 bovinos leiteiros das raças Holandesa Preta e Branca, Jersey, Pardo-Suíço e mestiços analisados na região metropolitana de Curitiba, 151/268 (56,34%) reagiram ao vírus da leucose pela prova de IDGA. A maior soropositividade ocorreu em animais mais velhos. Em animais com idade entre 36 e 60 meses das 63 amostras testadas 38 (60,32%) reagiram positivas e em animais acima de 60 meses de idade das 64 amostras, 56 (87,50%) foram positivas ao VLB.

Sponchiado, (2008) determinou a prevalência da Leucose Enzoótica Bovina em 1089 amostras de 55 rebanhos bovinos da raça Holandesa Preta e

Branca (HPB), distribuídas em 25 municípios do Estado do Paraná. Dos rebanhos estudados em 72,73% (40/55) foram encontrados animais soro-reagentes. Na população examinada 49,04% (534/1089) animais foram positivos para a doença. A maior prevalência foi encontrada em animais com idades superiores a sessenta meses de idade (61,98%), havendo aumento gradativo e significativo a partir dos 12 meses.

Na região Norte do estado do Paraná, em uma avaliação com 624 soros de animais produtores de leite tipo B, 254/624 (40,7%) dos animais testados para LEB foram positivos, distribuídos em 23/23 (100%) propriedades (LEUZZI JÚNIOR et al., 2003).

Em Santa Catarina, nas regiões Sul, Serra, Oeste e Norte do Estado em uma pesquisa com 454 amostras de sangue de bovinos leiteiros de 31 propriedades e quatro búfalos, utilizando o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), os resultados obtidos demonstraram que 42% (191/454) dos soros dos bovinos analisados eram positivos, e 67,74% (21/31) das propriedades continham animais positivos, nenhum soro bubalino foi reagente (RODAKIEWICZ, 2013).

Luders, (2001) no município de Mafra no estado de Santa Catarina, pesquisando a prevalência de anticorpos contra o VLB, em 129 propriedades testadas, 14 (10,85%) foram consideradas positivas. Das amostras testadas, 19/250 (7,6%) apresentaram anticorpos contra o VLB.

Birgel Junior et al., (2006) pesquisando a taxa de prevalência de anticorpos séricos antivírus da Leucose em 476 bovinos, da raça Simental no Estado de São Paulo por meio da prova de imunodifusão em ágar gel, utilizando-se o antígeno glicoprotéico (gp 51) encontrou uma taxa de prevalência de 9,24 % (44/476), sendo que 85,7% (6/7) dos rebanhos avaliados apresentaram animais sororeagentes. A estratificação da população em faixas etárias demonstrou uma maior prevalência em animais mais idosos. Em animais de 24 a 48 meses 9,78% (9/92) foram reagentes; na faixa etária de 48 a 72 meses 13,52% (12/51) e em animais com mais de 72 meses de idade 32,72% (18/55) apresentaram anticorpos séricos.

Megid et al., (2003), utilizando 1193 amostras de sangue bovino foram proveniente de 65 propriedades pertencentes à Microrregião da Serra de Botucatu - SP. Todos os 1193 animais avaliados eram adultos sendo 1177 fêmeas e 16

machos. Apenas em uma propriedade não foi encontrada animais sororreagentes para doença, e a prevalência total de animais positivos foi de 52%.

O professor Dr. Eduardo Harry Birgel é um dos maiores pesquisadores da Leucose no país, possuindo várias publicações a cerca do tema e colaborando em muitas outras pesquisas. Entre suas principais pesquisas a cerca da prevalência da leucose podemos destacar estudo realizado em São Paulo, encontrou prevalência de 53,8% (157/292) de animais soro-reagentes, analisando 292 amostras de soro sanguíneo de bovinos adultos de aptidão leiteira utilizando a técnica de IDGA (Birgel et al., 1983).

Em outro estudo realizado no mesmo Estado e pelo mesmo autor, com 462 amostras de soro sanguíneo pertencente a animais proveniente de propriedades produtoras de leite tipo B, 243 (52,6%) animais foram soro-reagentes (BIRGEL et al., 1988). No mesmo ano, em outra pesquisa, Birgel et al., (1988) encontrou prevalência de 44,9%, onde 774 dos 1722 soros de animais testado pela técnica de IDGA foram positivos.

Pesquisa realizado em São Paulo por Birgel et al., (1991), encontrou prevalência de 42,9% em bovinos leiteiros da raça Holandesa. Em outra pesquisa realizado por Birgel et al., (1994) com bovinos da raça Nelore no estado de São Paulo a prevalência encontrada foi de 4,15% (20/482) submetidos ao exame sorológico pelo IDGA.

Em Minas Gerais, em estudo para determinaram a prevalência da LEB de bovinos em diferentes idades e aptidões com amostra proveniente de 23 fazendas foi observando uma prevalência de 38,7% de animais positivos no sistema de produção de leite tipo C e 56,8% em sistemas de produção de leite tipo A/B, em animais de corte a frequência geral foi de 2,5%. Sendo as frequências mais altas em animais com idade igual ou superior a 30 meses, fato este, que ocorreu em todos os sistemas de produção (CAMARGOS et al., 2002).

No mesmo Estado, pesquisa realizada em 10 propriedades leiteiras com búfalas da raça Murrah, criadas sob manejo semi-intensivo, utilizando o teste de imunodifusão em gel de Agar (IDGA) para testar 670 amostras, todos os animais testados mostraram resultados negativos (RAJÃO et al.; 2010).

Pesquisa realizada em três microrregiões (Araxá, Frutal e Uberaba) do Triângulo Mineiro para a avaliação soropidemiológica da doença, foram testadas 853 amostras de soro de fêmeas bovinos, mestiças, com idade superior a 24 meses

por meio da prova de Imunodifusão em Gel de Ágar. Das 853 amostras analisadas, 19,1% apresentaram anticorpos antivírus da LEB e em 79,5% das propriedades continha pelo menos uma amostra positiva (MACEDO et al., 2013).

No Estado do Espírito Santo, Starling et al., (2013) avaliando a soroprevalência da leucose no rebanho bovino leiteiro do município de Alegre utilizando o teste de IDGA, encontrou que 114/409 (27,9%) das amostras testadas foram soro-reagentes, estas presentes em 87% das propriedades.

No Rio de Janeiro, pesquisas do início da década de 80 realizadas por (ROMERO & ROWE, 1981) e (CUNHA et al., 1982) encontraram prevalências de 53,3% (769/1444) em rebanho leiteiro e 26,9% (201/746) em rebanho mestiço de holandês respectivamente, utilizando o teste de IDGA.

No Norte Fluminense, estudo realizado na região utilizou 734 amostras de soro sanguíneo bovino, utilizando-se o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Das 734 amostras analisadas, 127 (17,30%) foram positivas ao vírus da leucose (BIANCHI, 2003).

Em outra pesquisa na região Centro-Oeste, realizada por Andrade e Almeida (1991) no estado do Goiás, com 670 amostras de soros sanguíneos de bovinos provenientes de 55 propriedades localizadas em 18 municípios, teve 46% de reagentes positivos para a raça Holandesa, 36,5% para mestiços Holandês/Zebu, 39,1% para o gado comum, 25% para Gir e 13,2% para o Nelore, não sendo encontrados animais reagentes da raça Simental e Caracu.

Estudo realizado em 15 municípios na região Norte do Estado do Tocantins por Fernandes et al., (2009), para determinar a soroprevalência da LEB, utilizando o teste de IDGA encontrou uma prevalência de 37% (326/881) em animais e na ampla maioria dos rebanhos examinados 94,7% (36/38) possuíam animais sororeagentes para a doença.

A ocorrência da infecção pelo Vírus da Leucose foi estudada por Molnár et al., (1999) no Estado do Pará, através do método de imunodifusão em ágar-gel (IDGA) e por ELISA indireto, onde a prevalência observada foi de 49,8% (359/721) no ELISA e 26,0% (174/668) no IDGA.

Na mesma região, no Estado do Amazonas pesquisa realizada em 661 amostras de soro sanguíneo, colhidas em 16 rebanhos leiteiros criados em quatro municípios da Microrregião de Manaus utilizando o teste de IDGA encontrou prevalência de na população examinada igual a 8,9% (59/661) (CARNEIRO et al.,

2003). No Acre e Roraima foram encontradas prevalências de 9,7% e 23,0% respectivamente (ABREU et al., 1990).

Em estudo realizado por Pinheiro Junior, (2013) em Alagoas foram examinados 17 rebanhos, com um total de 341 animais, distribuídos em oito municípios. Das 341 amostras analisadas, 95 (27,8%) foram positivas e o número de focos constatados foi de 12 (70,6%). Os exames foram realizados utilizando a técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA).

No Estado da Bahia, comparando a eficiência de três provas sorológicas para detecção de anticorpos anti-Vírus da LEB, o teste de ELISA, prova de Imunodifusão (IDGA)/gp51 importado e a IDGA/gp 51 produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR. Foram utilizados amostras de soro bovinos de provenientes de 13 propriedades, totalizando 796 animais. A infecção pelo VLB foi detectada em todos os rebanhos, com taxa de prevalência de 41,0% (MATOS et al., 2005).

SARDI et al., (2002), no mesmo Estado através de uma amostragem sorológica de 187 bovinos de 1 a 4 anos utilizando a técnica de ELISA, mostraram que, dos 187 soro, somente 14 foram positivos (7,5%).

Santos et al., (2013) utilizando amostras de 19 rebanhos leiteiros distribuídos em 15 municípios da microrregião de Garanhuns - PE, das 449 amostras submetidas à técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) constatou-se uma prevalência de 20,7% e 63,2% de focos para infecção pelo vírus da LEB. Na análise de regressão logística observou-se como fator de risco: sistema de criação intensivo, realização de exame de palpação e manejo dos tratadores.

Mendes et al., (2011) no Estado Pernambuco, estudando em 15 rebanhos a interconrrência entre Leucose e Tuberculose, encontrou as prevalência de 32,2% (213/662) e 14,1% (86/612) respectivamente. A prova sorológica utilizada para detecção da Leucose foi a imunodifusão em gel de Agar.

Em pesquisa realizada por Galindo et al., (2013) em Sergipe com 11 propriedade nas três mesorregiões que compõem o Estado utilizando 301 amostras, destas, 38/301 (12,62%) foram positivos e 263/301 (87,38%) soronegativos. Sete (63,63%) das 11 propriedades possuía pelo menos um animal positivo.

Silva, (2001) no Piauí, pesquisou a prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da LEB em 1.182 amostras provenientes de seis rebanhos mestiços de holandês/zebu e 794 amostras provenientes de animais da raça Pé-duro de cinco

municípios. A prevalência global encontrada foi de 16,9% (333/1976), em animais mestiços de Holandês/zebu a prevalência foi de 26,39 (312/1182) e em animais da raça Pé duro a prevalência encontrada foi de 2,64% (21/794).

3.3.6.3 Situação da Leucose Enzoótica Bovina no Maranhão

No Maranhão, um estudo foi realizado em 92 propriedades leiteiras, pertencentes a 23 municípios, localizados nas principais bacias leiteiras do Estado (Açailândia, Bacabal, Ilha de São Luís, Imperatriz e Pedreiras). Das 920 amostras de soro analisadas, 53,80% foram reagentes à LEB. Nas bacias leiteiras obtiveram-se frequências de 63,50%, 61,87%, 60,62%, 41,18% e 30,83%, para Bacabal, ilha de São Luís, Pedreiras, Imperatriz e Açailândia, respectivamente. Em todos os 23 municípios amostrados foram encontrados animais reagentes, com detecção de pelo menos um bovino sorologicamente positivo e o número de focos foi de 98,91%. A técnica utilizada na pesquisa para detecção da doença foi o IDGA. Dentre os fatores de risco encontrado na pesquisa destaca-se: o uso da mesma agulha para colheita de sangue ou vacinação, uso da mesma luva obstétrica em mais de um animal, a estabulação dos animais e a ausência de assistência veterinária (SANTOS et al., 2011).

Chaves et al., (2012) encontrou prevalências de 4,21% (10/232) e 5,18% (12/232) respectivamente para Leucose e Brucelose em búfalos estudando a intercorrência entre as duas doenças nesta espécie. Para diagnóstico da leucose enzoótica foi utilizado a técnica de imunodifusão dupla em gel de agar e para brucelose o teste do antígeno acidificado tamponado, seguida pelos testes confirmatórios do 2-mercaptoetanol e soroaglutinação.

No mesmo Estado, foram coletadas 160 amostras em 16 propriedades na bacia leiteira de Pedreiras para determinar a frequência de anticorpos contra a leucose utilizando o teste de IDGA. A frequência dos animais positivos foi de 60,62% (97/160) e como fator de risco o uso repetitivo da mesma agulha contribui para disseminação da doença (OLIVEIRA et al., 2013).

Soares et al., (2013), na baixada maranhense em pesquisa utilizando 360 amostras de sangue coletadas de búfalos machos e fêmeas, com idade igual e superior a 12 meses de idade, destas, 14,28% das amostras reagiram ao teste Imunodifusão em Gel de Agar, onde a faixa etária que mais ocorreu reação foi a de 24 meses de idade.

3.4 Patogenia

Após o VLB entrar no organismo do hospedeiro, a infecção tem início pela interação da glicoproteína do envelope viral a um receptor da superfície celular. Esta etapa é mediada pelas glicoproteínas gp51 e gp30 presentes na superfície do envelope viral que irá interagir com a membrana da célula-alvo através de receptores específicos. (MEIRELLES-BARTOLI, 2013).

O BLV infecta principalmente linfócitos B, nos quais produz uma infecção persistente, embora também possa infectar linfócitos T. Na maioria das vezes, a infecção pelo BLV é assintomática, e o reconhecimento dos animais positivos somente é possível pela realização de testes sorológicos (RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

Uma vez infectados os animais tornam-se portadores do agente pelo resto da vida. Entre os animais infectados, aproximadamente 30% desenvolvem uma linfocitose persistente, sem a manifestação de quaisquer sinais clínicos. A enfermidade (denominada leucose) caracteriza-se pela produção de tumores de origem linfóide, como linfossarcomas ou linfomas malignos, em diversos órgãos (RADOSTITS et al., 2002).

3.5 Resposta imunológica

Animais com Linfocitose Persistente (LP) e animais com tumores apresentam resposta imune celular e humoral diminuídas. As hipóteses elaboradas para explicar a menor proliferação destas células seriam de que certas proteínas retrovirais seriam imunossupressivas e/ou que níveis elevados de interleucina (IL-10), observados em animais com Linfocitose Persistente teriam efeitos inibitórios nas funções das células T auxiliares e também provocariam uma alteração na relação linfócitos B e T (MEIRELLES-BARTOLI, 2013).

Azedo et al., (2011) fazendo uma avaliação funcional de monócitos de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina (LEB), encontrou resultados que indicam que o vírus da LEB, apesar de infectar linfócitos B, altera funcionalmente os monócitos circulantes em bovinos que manifestam LP. Concluindo que bovinos naturalmente infectados pelo BLV, e que manifestam LP, apresentam alterações na atividade fagocítica e no metabolismo oxidativo de células

da linhagem monócito-macrófago, demonstrando que esses animais possuíam uma vulnerabilidade funcional.

3.6 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos são variáveis e estão relacionados com os órgãos e tecidos afetados pelos tumores. Perda de peso, agalactia, linfadenopatia (aumento de volume), anorexia, paralisia/paresia do posterior, febre, exoftalmia, dificuldade respiratória, obstrução intestinal e anormalidade no miocárdio são alguns sinais da doença. Podem apresentar-se massas tumorais de aspecto firme e coloração branca em qualquer órgão, mais principalmente no coração, rins, intestinos, abomaso, medula espinhal e útero. Pode ocorrer o aumento dos linfonodos superficiais, sendo mais comum na região retrolbulbar, onde causa exoftalmia uni ou bilateral, mas esta hiperplasia pode também ocorrer apenas em tecidos linfóides viscerais. Os principais achados de necropsia incluem o aumento generalizado dos linfonodos, tanto os superficiais como internos (BRAGA et al., 1998; LEITE et al., 2001; LEUZZI JUNIOR et al., 2001; RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

Silva Filho et al., (2011) investigou os sinais clínicos, laboratoriais e resultados de patologia em 24 bovinos com leucose enzoótica bovina atendidos na Clínica de Garanhuns, na Universidade Federal Rural de Pernambuco. Todos os animais apresentaram linfonodos superficiais dilatados. Outros sinais clínicos observados com frequência foram hiporexia, diminuição produção de leite, perda de peso progressiva, desidratação, hipomotilidade dos pré - estômagos e fezes escassas.

Exoftalmia, dispneia e útero aumentado foram observados com menos frequência. Em testes laboratoriais foram observados leucocitose média de (34.082 leucócitos/microlitro) com linfocitose (21.814linfócitos/mL) e neutrofilia (10.906 linfócitos / mL). Treze bovinos foram necropsiados e 11 foram abatidos. Foram observadas lesões macroscópicas nos linfonodos superficiais de todos os animais necropsiados. Seis tinham lesões nos nódulos linfáticos mesentéricos, seis no intestino, três no abomaso, dois no útero, um no coração, um no rúmen, um no coração e um no fígado.

Figuera & Barros, (2004) relatam em seu artigo um caso de linfossarcoma intracerebral em uma vaca holandesa de 2 anos de idade soropositivo para o vírus da leucose bovina e que apresentou como sintomas cegueira, embotamento e

anosmia por duas semanas. Na necropsia foram observados tumores caracterizados por massas branco-amareladas e macias em vários órgãos, incluindo linfonodos, baço, rim, fígado, intestino e útero. No hemisfério direito do telencéfalo, havia uma massa arredondada, macia, circunscrita, branco-rósea com 5,0 x 5,0 x 4,5 cm envolvendo os lobos parietal, temporal e occipital. Histologicamente, os múltiplos tumores tinham o mesmo aspecto e consistiam de pequenos linfócitos neoplásicos com baixa atipia e estroma escasso.

3.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico é realizado através da observação dos sinais, que no caso da Leucose não são patognomônicos para a doença. Neste caso, duas condições distintas devem ser consideradas no diagnóstico da LEB: o diagnóstico da enfermidade (leucose ou linfossarcoma) e o diagnóstico da infecção (RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

A suspeita da doença clínica, pela observação dos sinais deve ser confirmada por exames histopatológicos, sorológicos e identificação do agente. As técnicas mais comumente utilizadas são a imunodifusão em gel ágar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), mais o radioimunoensaio (RIA), a reação em cadeia de polimerase (PCR), o cultivo de células mononucleares sanguíneas periféricas e a detecção do DNA proviral por meio de microscopia eletrônica podem ser utilizados para o diagnóstico da doença (LEUZZI JUNIOR et al., 2001; OIE, 2012).

O diagnóstico da LEB é fundamental para o controle e a posterior erradicação da doença e kits de diagnósticos sorológicos (IDGA e ELISA) estão disponíveis comercialmente em todo o mundo. A utilização do teste de IDGA tornou-se obrigatória na importação e exportação de gado, sendo adotada como teste oficial de diagnóstico da Leucose Enzoótica dos bovinos pela Comunidade Econômica Europeia (MILLER, 1980; OIE, 2012).

3.7.1 Radioimunoensaio (RIA)

A técnica baseia-se na competição de um antígeno presente na amostra em análise com um antígeno marcado com isótopo radioativo pelo mesmo anticorpo. A concentração do antígeno em análise será inversamente proporcional à radiação emitida. Trata-se de uma técnica com alta especificidade e sensibilidade, porém com

elevado custo e grande risco operacional por manipular material radioativo. O Radioimunoensaio é um teste muito sensível, e tem como fundamento detectar anticorpos, porém é necessária a utilização de equipamentos altamente especializados, o que torna este tipo de teste dispendioso (SANTOS, 2009).

3.7.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O teste de “ELISA” (do inglês “Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay”) se baseia reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Nesse método, uma enzima reage com um substrato incolor para produzir um produto colorido, é covalentemente ligada a um anticorpo específico que reconhece um antígeno alvo. Se o antígeno estiver presente, o complexo anticorpo-enzima irá ligar-se a ele e a enzima catalisará a reação, a presença de produto colorido indica a presença de antígeno (OIE, 2012).

O teste pode ser utilizado para o diagnostico da Leucose. O método possui alta sensibilidade, aceitável especificidade, aliada a praticidade e rapidez da técnica. Para o diagnostico pode ser utilizado amostras de sangue ou leite (CARLI et al., 1993).

3.7.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica usada para amplificação *in vitro* de fragmentos de genomas selecionados, resultando na amplificação dessas sequencias em poucas horas. A utilização da reação em cadeia de polimerase (PCR) para detectar o pró-vírus do BLV tem sido descrita por diversos trabalhos. Primers construídos para coincidir com as regiões gag, pol e env do genoma têm sido usados com sucesso variável (CAMARGOS, 2001).

A Nested PCR aliada a eletroforese tem sido o método mais sensível para a detecção do vírus. Este método utiliza a sequencia do gene “env” que codifica a gp51. Este gene é altamente conservado, e tanto o gene como o antígeno estão geralmente presente em todos os animais infectados e em todo o curso da infecção. A PCR pode ser usada principalmente como um complemento para sorologia, como teste de confirmação (OIE, 2012; DIAS et al., 2012).

A detecção da infecção do BLV pela técnica de PCR pode ser útil nas seguintes circunstâncias: bezerros jovens com anticorpos do colostro; casos de tumor, para a diferenciação entre linfoma esporádico e infeccioso; tecidos do tumor a

partir de casos suspeitos recolhidos em matadouros; novas infecções antes do desenvolvimento de anticorpos contra o vírus da leucose bovina; casos com resultado fraco positivo ou incerto nos testes de ELISA e IDGA; no rastreio sistemático do gado em estações de teste de progênie (antes da sua introdução em centros de inseminação artificial) e gado usado para a produção de vacinas, garantindo que eles estejam livres do BLV (CAMARGOS, 2001; OIE, 201; DIAS et al. 2012;).

3.7.4 Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)

O primeiro teste sorológico empregado para diagnóstico da infecção para o BLV foi a imunodifusão em gel de Ágar (IDGA), utilizando a proteína do capsídeo (p24) como antígeno (RAVAZZOLO & COSTA, 2007). Porém, Miller E Van Der Maaten, (1976) utilizaram a glicoproteína principal do envelope (gp51) no desenvolvimento do teste de imunodifusão (IDGA) permitindo um aumento da sensibilidade do teste (LEUZZI JUNIOR et al., 2001).

Desta forma, os testes de IDGA atuais utilizam a glicoproteína gp51 ou uma combinação de gp51 e p24 como antígeno. A simplicidade, praticidade e custo baixo fizeram com que o teste de IDGA fosse aceito rapidamente em todo o mundo, tornando-se o teste oficial para detecção de anticorpos anti-BLV.

Pontos negativos podem ser observados neste teste como a baixa sensibilidade de detectar animais com baixos títulos de anticorpos, animais infectados recentemente; vacas gestantes próximos de três semanas que antecedem o parto; vaca a duas semanas de puerpério (OIE, 2012).

3.8 Controle, Profilaxia e Erradicação

Não existe uma vacina, nem tratamento efetivo, para a proteção dos animais. Como consequência a doença só pode ser combatida com medidas para prevenir, controlar ou erradicar. Apesar disso, o controle da doença é difícil devido à sua grande disseminação no rebanho nacional, principalmente nos rebanhos leiteiros (LEITE et al., 2001).

A doença tem uma evolução crônica apresentando um grande número de animais assintomáticos. O fato de no País não haver um programa de controle oficial dificulta o controle e posterior erradicação da doença (LEUZZI JUNIOR et al., 2001; MEIRELLES-BARTOLI, 2013).

Como medidas de controle e prevenção, sugeridos por Ferrer et al.,(1993); Braga et al., (1998), Leite et al., (2001); Ravazzolo & Costa, (2007); Rodrigues et al., (2011); Meirelles-Bartoli., (2013); podemos citar:

a) utilização de agulhas estéreis individuais e descartáveis para procedimentos profiláticos, clínicos e terapêuticos (aplicação de vacinas, antiparasitários, outros medicamentos, anestésicos e coleta de sangue);

b) utilização de luvas de palpação individuais para cada animal;

c) utilização de dispositivos de descorna elétricos ou a gás, em vez de equipamento cortante;

d) lavagem e desinfecção de instrumentos cirúrgicos ou de procedimentos potencialmente contaminados com sangue de animal infectado;

f) realizar sorologia em todo o rebanho para definir a situação sanitária;

g) eliminar os animais positivos;

h) adoção de um programa de controle de insetos hematófagos nas regiões em que há necessidade;

k) uso de inseminação artificial quando possível, evitando a transmissão de linfócitos infectados através da monta natural;

l) separação dos bezerros filhos de mães positivas, não permitindo que entrem em contato com animais negativos até que sua condição sorológica para o BLV possa ser definida;

m) manter na propriedade um banco de colostro, fazendo tratamento térmico do mesmo a 60°C por 60 minutos.

n) bezerro(a)s filhos de vacas positivas devem ser alimentadas com colostro e/ou leite de vacas sabidamente negativa;

o) segregação dos animais em grupos de positivos e negativos, os animais negativos devem ser manejados antes;

p) evitar a introdução de animais infectados.

q) Se houver a aquisição de bovinos provenientes de rebanho soronegativo, mantê-los separados do restante do rebanho por 30 dias e testá-los antes da entrada e ao final do período de isolamento.

r) Se forem provenientes de rebanho soropositivo, mantê-los isolados por três meses e em seguida testá-los, antes de introduzir ao rebanho;

Braga et al., (1997) avaliando a adoção de três alternativas de controle da infecção pelo BLV (eliminação, segregação e manejo misto) sugere que a

“eliminação” de animais positivos é o meio mais eficaz para diminuição imediata da incidência da doença no rebanho. A “segregação” também se mostrou útil em comparação com o “manejo misto” que obteve resultados muito variados indicando que esse tipo de controle necessita de um tempo maior para alcançar os objetivos.

Em estudo realizado no Japão, avaliou-se o efeito do congelamento do colostro como tratamento para prevenir a transmissão do Vírus da Leucose Bovina. Este bioensaio utilizou colostro de uma vaca positiva para leucose, onde dois litros de colostro foram separados para os dois tratamentos de inoculação, isto é, com e sem congelamento. Para o tratamento de congelamento, o colostro foi congelado a -25°C durante uma noite e em seguida descongelado. Um litro de colostro de cada um dos dois tratamentos foi centrifugado a 2,800xg durante 15min para remover a nata.

Em seguida, a fase aquosa e os sedimentos foram suspensos e centrifugados a 2,800rpm durante mais 15 minutos. As “pelotas” foram suspensos com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e lavou-se uma vez através da centrifugação. As “pelotas” de células foram ressuspensas com PBS e foram depois utilizadas para inoculação intraperitonea em duas ovelhas. A ovelha nº163 testou positivo para o BLV três semanas após a inoculação, utilizando o PCR e foi positivo após a 5ª semana com o IDGA, enquanto que a ovelha nº 164 que foi inoculado com células a parti do colostro tratado com tratamento térmico manteve-se negativa para o BLV em todos os testes até nove semanas após a inoculação. Os resultados do estudo indicam que o colostro deve ser congelado como uma alternativa útil para inativar a infectividade de linfócitos BLV-infectados (KANNO et al., 2014).

Na Croácia, estudo realizado por Lojkić et al., (2013) descreve o processo de erradicação da LEB em uma fazenda após a reintegração em território croata após a guerra. De 1998 a 2008, amostras de sangue de uma fazenda localizada na parte norte oriental da Croácia foram testados sorologicamente usando IDGA e ELISA. Em 2002, 2003 e 2004, 37%, 22% e 10% dos animais eram sorologicamente positivos respectivamente. Após as etapas iniciais de erradicação a doença reapareceu em 2008, quando todas as amostras de sangue examinadas reagiram positivamente em BLV- específico no nested-PCR. No final de 2010, depois de um programa de erradicação ampla, que incluiu a implementação regular do teste de ELISA em conjunto com o PCR para detecção de animais positivos, a fazenda obteve o status de "livre de BLV".

Rodrigues et al., (2011), propõe três abordagens diferentes para o controle e erradicação da doença destacando suas vantagens e desvantagens na implantação (Quadro 1).

Quadro 1. Abordagens disponível para erradicação, controle e prevenção da Leucose Enzoótica Bovina.

Abordagem	Base do programa de controle	Vantagens	Desvantagens
Teste e Eliminação	Identificar os animais positivos e descarta-los enviado para abate	Eficiente	Alto custo proibitivo ou/e impraticáveis dependendo dos níveis de prevalência inicial principalmente com a
		Requer o mínimo de investimento em instalações	Necessidade de vigilância constante
		A propriedade poderá está livre do BLV em um período relativamente curto	Requer políticas oficiais para ser bem sucedido (programa de sanidade instalado)
Teste e Segregação	Detectar e isolar os animais infectados em rebanhos separados	Não precisa descartar e consequentemente não é necessária a substituição dos animais positivos	Necessidades estruturais, alojamento e pastagens para o rebanho infectado e não infectado.
	Gerenciar separadamente os rebanhos infectados e não infectados na mesma propriedade		Aumento dos custos devido à duplicação das instalações e equipamentos de manejo
			Requer vigilância permanente
			Necessidade de compromisso ao longo prazo em programas sanitários
Teste e Administração (Gestão)	Adotar medidas de biossegurança e de gestão para minimizar a exposição de animais ao agente infecciosa	Custo-benefício	Requer a estrita e rigorosa observância das medidas de biossegurança implementadas
		Requer apenas o mínimo investimento em instalações	Necessidade de compromisso ao longo prazo em programas sanitários
		Não precisa a substituição animais	Susceptível a fatores ambientais
			Necessidades de uma formação e capacitação adequada de pessoal

Fonte: adaptado (RODRIGUES et al., 2011)

3.9 Importância Econômica

A preocupação com os aspectos econômicos da LEB teve início na Europa logo após a II grande guerra, devido o grande aumento do número de linfossarcoma em bovino detectado em matadouros. Devido a isso, houve a implementação em 1953, na Alemanha, do primeiro programa oficial de controle desta enfermidade (MEIRELLES-BARTOLI, 2013).

Os prejuízos com LEB vão além do descarte dos animais que apresentam linfossarcomas. Compreendem também restrições e imposição de barreiras internacionais ao comércio de animais, sêmen e embriões de animais soropositivos; a diminuição da produção de leite e da gordura do leite, a condenações de carcaças em abatedouros, gastos com medicamentos, atendimento veterinário (OIE, 2012). Em rebanhos leiteiros severamente afetados, a mortalidade anual chega a 2%, podendo atingir até 5% (RADOSTITIS et al., 2002).

Em animais soropositivos, no Brasil, foi observada, uma diminuição na produção leiteira de 11% em relação aos animais não reagentes (D'ANGELINO et al., 1991). Em outro estudo, nos EUA, realizado com vacas soro-positivas e com LP, concluiu-se que ocorreu uma diminuição na produção de leite e uma diminuição equivalente na produção do nível de gordura no leite desses animais (POLLARI et al., 1992).

Em estudo realizado por Rajão et al., (2014) para avaliar os efeitos da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB) na produção de vacas leiteiras no Brasil, demonstrou que vacas infectadas com o VLB apresentaram produção de leite inferior que de vacas não infectadas, tanto puras como mestiças. Porém não houve diferença na produção de leite de vacas positivas com e sem linfocitose persistente. Os resultados do estudo indicam que há uma associação entre a infecção pelo VLB com a queda na produção de leite.

Kale et al., (2007) na Turquia, realizou um estudo para avaliar 12 parâmetros de produção e reprodução, onde não encontrou diferença significativa entre o grupo de vacas BLV - soropositivas e BLV - soronegativas.

A associação entre bovinos expostos ao BLV e produtividade do rebanho foi estudada por Ott et al., (2003). Os resultados deste estudo mostram que os rebanhos com animais positivos produziam 218 kg de leite menos por vaca/ano comparado a aqueles rebanhos com vacas negativas. A redução média da VAP (valor anual de produção) foi de \$59 por vaca em rebanhos positivos em relação a

rebanhos negativos. Para a indústria de laticínios como um todo a soropositividade do BLV em rebanhos foi associada com perdas para produtores de \$ 285.000.000 e \$ 240.000.000 para os consumidores.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Região Estudada

O Maranhão está localizado na Região Nordeste do Brasil, ocupando uma área de 331 935,507 km², sendo o segundo maior estado da região e o oitavo maior estado do Brasil (IBGE, 2011). O rebanho bovino maranhense superou em 2013 a marca de 7,3 milhões de cabeça, ocupando o posto de segundo maior rebanho do Nordeste superado apenas pelo o Estado da Bahia (BRASIL, 2014).

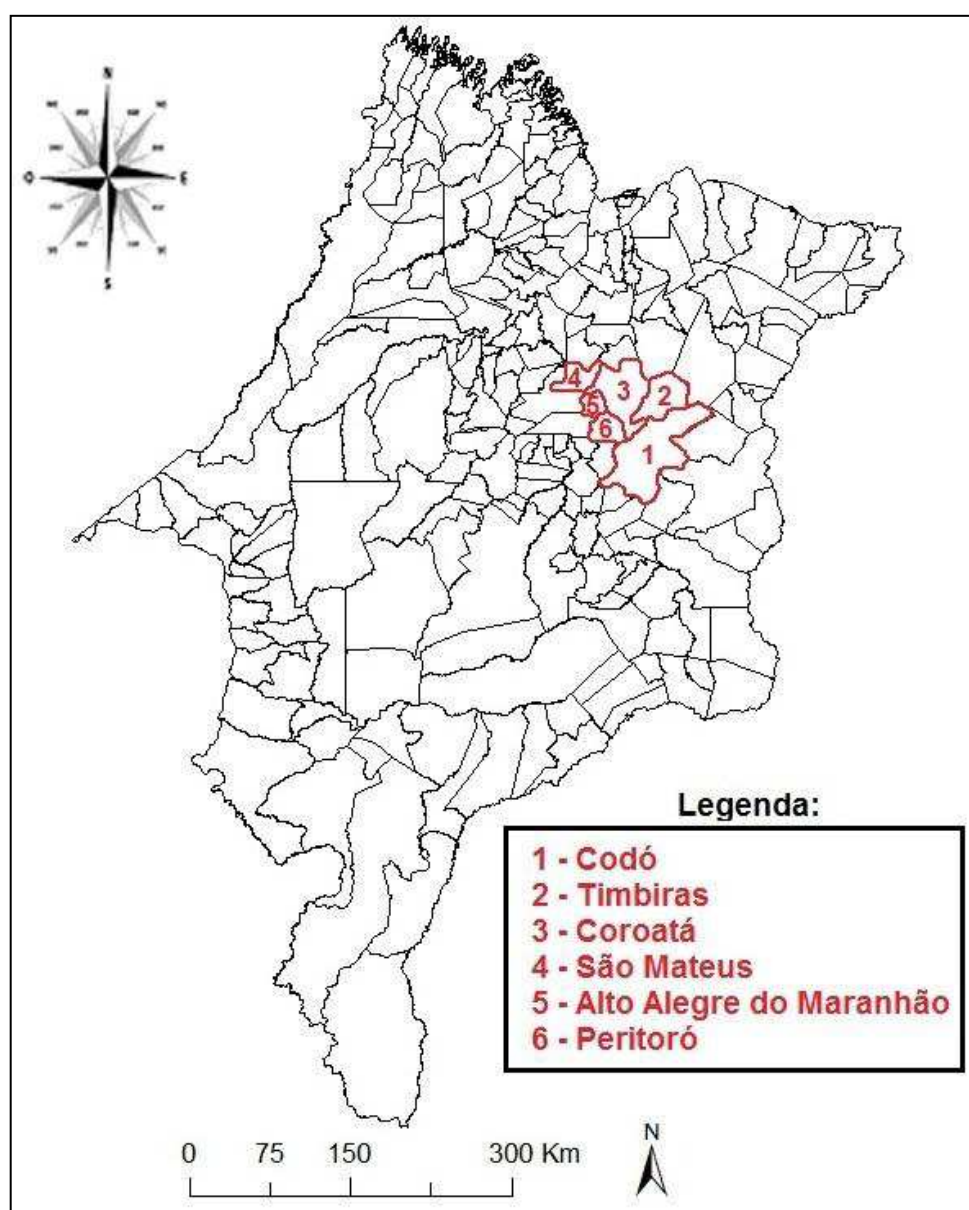


Figura 3. Mapa político do Maranhão com destaque para os municípios da Regional de Codó – MA, 2014.

A área do estudo localiza-se na mesorregião dos Cocais Maranhenses, na bacia leiteira do Rio Itapecurú na Regional de Codó. A regional de Codó é composta pelos municípios de Codó, Timbiras, Coroatá, Peritoró, Alto Alegre do Maranhão e São Mateus, este último, não participou da pesquisa por não possuir propriedades leiteiras cadastradas no serviço oficial (AGED-MA, 2012).

4.2 Definição da Amostra

Para determinar o numero de rebanhos a serem amostrados, utilizou-se a fórmula de Triola, (1999) e Callegari & Jacques, (2007). Onde: N = tamanho da população; E_0 = erro amostral tolerável; n_0 = primeira aproximação do tamanho da amostra e n = tamanho da amostra. Foram utilizados dados cadastrais da Agencia de defesa Agropecuária do Maranhão (AGED – MA) da II etapa de vacinação contra febre aftosa do ano de 2012.

N = tamanho da população;
 E_0 = erro amostral tolerável;
 n_0 = primeira aproximação do tamanho da amostra;
 n = tamanho da amostra

$$n_0 = \frac{1}{E_0^2}$$

Erro amostral: 5%;
Grau de confiança: 95 %;

$$n = \frac{N \cdot n_0}{N + n_0}$$

Considerando um total de 42 propriedades, um erro amostral de 5% e o grau de confiança de 95 % obteve-se um $n = 38$. Distribuídos proporcionalmente em relação à quantidade de rebanhos leiteiros que cada município contém.

$$n = \frac{N \cdot n_0}{N + n_0} = \frac{42 \cdot 400}{42 + 400} = 38$$

$$n_0 = \frac{1}{E_0^2} = \frac{1}{0,05^2} = 400$$

A amostragem inicial era de 38 rebanhos com 10 amostras por rebanho, totalizando 380 amostras. Ao iniciar as visitas prévias das propriedades selecionadas, constatou-se uma diminuição do número de propriedades com aptidão leiteira na área estudada em relação ao informado ao serviço defesa oficial do Estado. Essa diminuição do número de rebanhos amostrados foi compensada pelo o aumento do número de amostras por rebanho, que passou de 10 para 12 amostras por rebanho, fazendo um total de 396 amostras, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Número de rebanhos e animais amostrados por município na Regional de Codó – MA, 2014

Municípios	Nº Rebanhos	Nº Amostras
Alto Alegre do Maranhão	7	84
Codó	10	120
Coroatá	7	84
Peritoró	6	72
Timbiras	3	36
Total	33	396

Os animais foram selecionados pelo método de amostragem aleatória simples com a seguinte estratificação: três novilhas de 12 a 36 meses de idade, seis vacas com idade entre 36 a 84 meses, duas vacas acima de 84 meses e um reprodutor. (Tabela 2)

Tabela 2. Distribuição do número de amostra por faixa etária na Regional de Codó – MA, 2014

Faixa Etária	M	F	Total
<36 m	6	99	105
36 - 72	25	198	223
>72	2	66	68
Total	33	363	396

4.3 Coleta das Amostras

As coletas das amostras foram realizadas no período de setembro de 2013 a maio de 2014. As amostras de sangue dos bovinos foram colhidas através da punção da veia jugular, utilizando tubos à vácuo de 09 ml, e após a colheita foram devidamente identificados. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente para ocorrer à coagulação e retração do coágulo.

Após esse período as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 3200rpm. O soro obtido foi separado em duas alíquotas de 1,5ml, acondicionado em tubos eppendorf, mantidos em temperatura de congelamento (-20°C) até a realização dos exames sorológicos (Apêndices B,C).

4.4 Prova sorológica

A técnica laboratorial para detecção da infecção pelo BLV nas amostras foi realizada no Laboratório de Doenças Infecciosas do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. A técnica utilizada para detecção de animais portadores de anticorpos da LEB foi a Imunodifusão em gel de ágar - IDGA proposta por Miller & Van Der Maaten, (1976).

A técnica baseia-se na migração radial dupla de antígeno (Ag) e anticorpo (Ac), através do gel de ágar. O encontro dos reagentes, em proporções ótimas, leva a formação de complexo Antígeno - Anticorpo insolúveis que se precipitam tornando-se visíveis sob a forma de uma linha ou banda de precipitação.

A técnica de IDGA constitui nas seguintes etapas (Anexo A):

- ✓ Preparação da solução tampão;
- ✓ Ajuste do pH da solução;
- ✓ Adição do ágar Noble;
- ✓ Adição do ágar nas placas de Petri;
- ✓ Acondicionamento das placas em temperatura de 2º a 8ºC;
- ✓ Perfuração dos poços utilizado um cortador padrão;
- ✓ Remoção por sucção dos cilindros do ágar e da umidade residual de cada poço;
- ✓ Adição dos reagentes e soros testados;
- ✓ Incubação das placas em câmara úmida;
- ✓ Leitura das placas após 48 a 72 horas;

4.5 Estudo dos Fatores de Risco

Para o estudo dos fatores de risco associados à infecção pelo BLV no rebanho estudado, foi realizado em todas as propriedades com o proprietário ou responsável pelo rebanho a aplicação de um questionário sócio epidemiológico contendo questões referentes ao: manejo utilizado na criação, sanidade dos animais, manejo alimentar e manejo reprodutivo (Apêndice A).

Todas as propriedades foram georefenciadas utilizando GPS Garmim 76 para se realizar a distribuição espacial dos rebanhos focos da LEB.

4.6 Análises Estatísticas

Os resultados foram tabulados em planilhas utilizando o software Microsoft Excel 2007. Para o cálculo das frequências, dividiu-se o número de amostras reagentes pelo número total de amostras multiplicado o resultado encontrado por 100.

Para o estudo da relação dos fatores de risco foi utilizado o teste exato de Fisher. O teste de Qui-quadrado de independência foi utilizado quando as condições para o teste Exato de Fischer não foram verificadas considerando o grau de significância de 5%, onde $p < 0,05$. Os cálculos foram realizados no software Instat versão 3.05.

Para a elaboração da figura com a distribuição espacial dos rebanhos focos foi utilizando o software GPS TrackMaker versão 13.9.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, após a realização do teste de Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) na amostragem total de 396 amostras de bovinos em diferentes rebanhos na Regional de Codó no Estado do Maranhão, estão expostos na Tabela 3 e 4. Observou-se que 117/396 (29,55%) reagiram positivamente para a LEB e 279/396 (70,4%) não reagiram nas amostras de soro sanguíneo utilizando o teste de IDGA.

Tabela 3. Frequência de bovinos reagentes e não reagentes para Leucose no teste de IDGA na Regional de Codó - MA, 2014

Soro-reação	Nº Absoluto	Nº Relativo
Reagentes	117	29,55%
Não Reagente	279	70,45%
Total	396	100,00%

Com relação aos cinco municípios amostrados que compõem a Regional de Codó, em todos os municípios 5/5 (100%) foram registrados animais reagentes. Em relação ao número de bovinos reagentes e não reagente para Leucose pelo o teste de IDGA obteve-se frequências de 30/84 (35,71%), 30/120 (25,00%), 30/84 (35,71%), 21/72 (29,17), 6/36 (16,67%) em Alto Alegre, Codó, Coroatá, Peritoró e Timbiras, respectivamente como demonstra a tabela 4.

Tabela 4. Frequência de bovinos reagentes e não reagentes ao teste de IDGA por município na Regional de Codó-MA, 2014

Municípios	Nº Amostras	Reagentes	(%)	Não Reagente	(%)
Alto Alegre do MA	84	30 ^a	35,71	54	64,29
Codó	120	30 ^a	25,00	90	75,00
Coroatá	84	30 ^a	35,71	54	64,29
Peritoró	72	21 ^a	29,17	51	70,83
Timbiras	36	6 ^a	16,67	30	83,33
Total	396	117	29,55	279	70,45

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao teste de Qui Quadrado ($p < 0,05$) com 95% de confiança. Qui Quadrado= 7,136; $p = 0,1289$.

Nos 33 rebanhos bovinos leiteiros amostrados a frequência de foco da leucose foi de 31/33 (93,94%) conforme Tabela 5. Foram consideradas rebanhos-foco aquelas propriedades que possuíam pelo menos uma amostra reagente ao BLV. A variação no percentual de animais reagentes por rebanho para o BLV foi de 0,00 a 83,33%.

Tabela 5. Número de rebanhos com bovinos reagentes e não reagente ao teste de IDGA, Regional de Codó – MA, 2014

Municípios	Nº Rebanhos	Reagente	(%)	Não Reagente	(%)
Alto Alegre do MA	7	6	85,71	1	14,29
Codó	10	9	90,00	1	10,00
Coroatá	7	7	100,00	0	0,00
Peritoró	6	6	100,00	0	0,00
Timbiras	3	3	100,00	0	0,00
Total	33	31	93,94%	2	6,06%

Em seis dos sete (85,71%) rebanhos do município de Alto Alegre do Maranhão foi diagnosticado pelo menos 01 amostra reagente ao BLV. O percentual animais reagentes nos rebanhos variou de 0 a 66,67%.

Fato semelhante ocorreu no Município de Codó onde nove dos dez (90,00%) rebanhos estudados continham pelo menos 01 amostra reagente ao BLV. A variação de animais reagentes nos rebanhos foi de 0 a 83,33%.

Nos demais municípios, Coroatá, Peritoró e Timbiras, em todos os rebanhos foi diagnosticada pelo menos uma amostra reagente ao BLV. O percentual de animais reagentes teve variação de 8,33% a 75,00%, 8,33% a 58,33% e 8,33% a 25,00% respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição da frequência de bovinos reagente e não reagente por rebanho e município utilizando o teste de IDGA, Regional de Codó – MA, 2014

Municípios	Rebanho	Nº Amostras	Reagentes	(%)	Não Reagente	(%)
Alto Alegre do Maranhão	P16	12	8	66,67	4	33,33
	P17	12	3	25,00	9	75,00
	P18	12	5	41,67	7	58,33
	P19	12	7	58,33	5	41,67
	P20	12	6	50,00	6	50,00
	P31	12	1	8,33	11	91,67
	P34	12	0	0,00	12	100,00
	Sub -Total	84	30	35,71	54	64,29
Codó	P01	12	1	8,33	11	91,67
	P02	12	0	0,00	12	100,00
	P03	12	3	25,00	9	75,00
	P06	12	10	83,33	2	16,67
	P07	12	2	16,67	10	83,33
	P08	12	2	16,67	10	83,33
	P14	12	3	25,00	9	75,00
	P15	12	3	25,00	9	75,00
	P32	12	3	25,00	9	75,00
	P33	12	3	25,00	9	75,00
	Sub -Total	120	30	25,00	90	75,00
Coroatá	P24	12	3	25,00	9	75,00
	P25	12	5	41,67	7	58,33
	P26	12	7	58,33	5	41,67
	P29	12	1	8,33	11	91,67
	P28	12	1	8,33	11	91,67
	P30	12	4	33,33	8	66,67
	P11	12	9	75,00	3	25,00
	Sub -Total	84	30	35,71	54	64,29
Peritoró	P12	12	4	33,33	8	66,67
	P21	12	7	58,33	5	41,67
	P22	12	4	33,33	8	66,67
	P23	12	1	8,33	11	91,67
	P27	12	2	16,67	10	83,33
	P35	12	3	25,00	9	75,00
	Sub -Total	72	21	29,17	51	70,83
Timbiras	P04	12	3	25,00	9	75,00
	P05	12	2	16,67	10	83,33
	P10	12	1	8,33	11	91,67
	Sub -Total	36	6	16,67	30	83,33
Total		396	117	29,55	279	70,45

Os dados mostram que a Leucose está difundida no rebanho bovino estudado com frequência geral de 29,55% (117/396). Os municípios de Alto Alegre do Maranhão e Coroatá apresentaram frequências de sororeagentes mais elevadas (35,71%). A frequência encontrada no município de Peritoró foi de 29,17%. Em e Codó de 25,00%, enquanto que o município de Timbiras apresentou frequência de bovinos reagentes de 16,67%.

Uma vez introduzida na região a infecção pelo BLV pode ter sido disseminada através da movimentação de animais entre propriedades, principalmente pela compra e venda de bovinos sem a exigência de exame negativo para a doença, pelo “aluguel de pasto” e/ou “gado de meia” que ocorre durante a época seca, onde rebanhos diferentes convivem durante um determinado tempo sob o mesmo manejo alimentar e sanitário. A ausência ou assistência veterinária deficiente, o desconhecimento da doença por parte dos criadores, práticas de manejo inadequadas que não impedem a propagação do vírus e a inexistência de programas sanitários contribuem para a manutenção do vírus na região.

A maioria dos animais infectados pelo BLV não desenvolvem linfossarcomas ou quaisquer outros sinais clínicos. Os animais permanecem portadores do vírus e só podem ser identificados através do diagnóstico laboratorial. Estes animais torna-se importante fonte de infecção, disseminando a doença por todo rebanho e consequentemente na região com grande facilidade já que dificilmente serão identificados (BRAGA & LAAN, 2001; RAVAZZOLO & COSTA, 2007).

Algumas medidas profiláticas, para limitar a disseminação do vírus no rebanho incluem a utilização de agulhas descartáveis para evitar a contaminação de animais negativos, a desinfecção de instrumentos à base de iodo ou cloro; a utilização de uma luva por palpação retal; assepsia dos instrumentos cirúrgicos e aqueles utilizados para identificação do animal (BRAGA et al., 1998; LEITE et al., 2001).

As medidas de erradicação da doença no rebanho estariam baseadas em um diagnóstico precoce da doença utilizando testes sorológicos, eliminação dos animais positivos e uma supervisão sanitária permanente dos rebanhos (RODRIGUES et al., 2011).

A frequência de reagentes (29,55%) para a leucose encontrada na Regional de Codó apresentou-se abaixo dos estudos sorológicos realizados por Sponchiado, (2009) no Estado do Paraná - 49,04% (534/1089); Fernandes et al., (2009) em Tocantins -37,0% (326/881); Santos et al., (2011) no Maranhão - 53,8% (495/920); Ferreira et al., (2013) no Maranhão - 60,62% (97/160); Megid et al., (2003) em São Paulo - 47,4% (618/1193) e Barros Filho et al., (2010) no Paraná - 56,34% (151/268);

O resultado da pesquisa foi superior aos estudos realizados por Birgel Jr., (2006) em São Paulo - 9,24% (44/476); Silva, (2001) no Piauí - 16,85% (333/1976); Carneiro et al., (2003) no estado do Amazonas - 9,60% (58/604); Rocha et al., (2014) no Paraná -16,64%; Sardi et al., (2002) no Estado da Bahia - 7,5%; Santos et al., (2013) em Pernambuco - 20,7% e Galindo et al., (2013) em Sergipe – 12, 62 (38/301).

Frequências semelhantes ao estudo foram observados por Murakami et al., (2011) no Japão com prevalência global de 28,6%; Mousavi et al., (2014) no Nordeste do Irã, com resultado de 25,40% (109/429); Starling et al., (2013) no Estado do Espírito Santo com 27,9% (114/409); Pinheiro Junior, (2013) em Alagoas - 27,8% e Mendes et al., (2011) no Estado Pernambuco 32,2% (213/662).

O número de rebanhos focos do estudo (93,94%), foi semelhante ao encontrada em outra pesquisa no Maranhão (98,91%) realizado por Santos et al., (2011) indicando que a doença permanece com alta frequência no rebanho maranhense. Também foi semelhante ao encontrado por Fernandes et al., (2009) no Tocantins (94,7%). Resultado superior foi observado no Paraná por Leuzzi Júnior et al., (2003) onde animais positivos estavam distribuídos em 100% propriedades pesquisadas.

Resultados inferiores mais não menos preocupantes foram observados por Pinheiro Junior, (2013) em Alagoas (70,6%); Starling et al., (2013) no Espírito Santo (87%); no Triângulo Mineiro (79,5%) por Macedo et al., 2013; por Birgel Junior et al., (2006) em São Paulo (85,7%); em Santa Catarina (67,74%) por Rodakiewicz, 2013; no Paraná (72,73%) por Sponchiado, (2008) e no Rio Grande do Sul (61,5%) por Frandoloso et al., (2008).

Observa-se que no Brasil a infecção está disseminada na maioria dos Estados, porém o país não tem um programa sanitário instalado para o combate da doença. O controle e erradicação da LEB só serão alcançados quando medidas

sanitárias obrigatórias forem implementadas em todos os rebanhos bovinos, principalmente os leiteiros que apresentam altos índices a prevalência da doença.

A Instrução normativa nº 50 de 24 de setembro de 2013 do MAPA, inclui a Leucose enzoótica bovina como doença de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial composto pelas unidades do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pelos Órgãos Estaduais de Defesa Sanitária Animal. A notificação da suspeita ou ocorrência de doença pode ser realizada por qualquer cidadão, bem como por todo profissional que atue na área de diagnóstico, ensino ou pesquisa em saúde animal. A doença requer notificação mensal de qualquer caso confirmado.

Na Figura 4 está demonstrada a distribuição espacial dos rebanhos – foco na região. A doença está difundida na região estudada e distribuída em todos os municípios pesquisados. Os rebanhos não reagentes estão em municípios diferentes o que sugere que não existe uma área em que a doença não esteja presente.

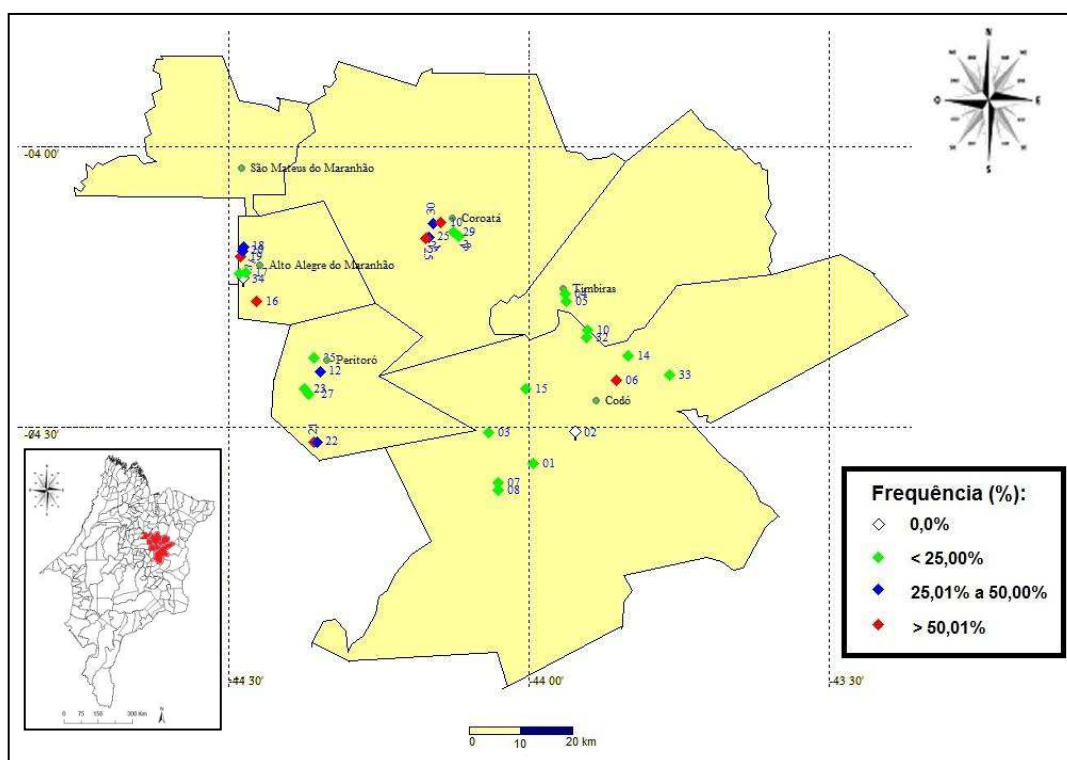


Figura 4. Distribuição espacial dos rebanhos foco de LEB na Regional de Codó – MA, 2014.

Até o momento, focos de leucose no Maranhão foram descritos em pesquisas nos seguintes municípios: Açailândia, Amarante, Bacabal, Bernardo do Mearim, Bom Lugar, Cidelândia, Igarapé Grande, Imperatriz, Paço do Lumiar, João Lisboa, Lajeado Novo, Lago Verde, Olho d'Água das Cunhas, Pedreiras, Raposa,

São José de Ribamar, São Luís, Porto Franco, São João do Paraíso, Senador La Roque, São Francisco do Brejão, São Luís Gonzaga e Trizidela do Vale, (SANTOS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013). Com a realização do presente estudo, demonstrou-se a ocorrência de focos da doença em mais cinco municípios: Alto Alegre, Codó, Coroatá, Peritoró e Timbiras.

Estão descritos na tabela 7 os resultados das 396 de amostras de soro bovino avaliados no teste de IDGA, distribuídos em três faixas etárias. Os resultados detalham os números de animais reagentes e não reagentes expressos em números absolutos e relativos.

Tabela 7. Distribuição de bovinos reagentes e não reagente por faixa etária ao teste de IDGA, Regional de Codó – MA, 2014

Faixa etária (meses)	Nº Amostras	Reagentes	(%)	Não Reagentes	(%)	Total
< 36	105	13 ^a	12,38	92	87,62	105
36 - 72	223	76 ^b	34,08	147	65,92	223
> 72	68	28 ^c	41,18	40	58,82	68
Total	396	117	29,55	279	70,45	396

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ao teste Qui-quadrado ($P < 0,05$) entre as faixas etárias com 95% de confiança.

Qui Quadrado= 21.484; $p < 0.0001$

Houve diferença estatisticamente significativa quando comparada as faixas etárias. Uma maior frequência de animais reagentes foi observada em animais acima de 72 meses (41,18%). Isso se deve ao maior tempo de vida desses animais e consequente um maior tempo de exposição ao vírus. O que sugere também que os animais dessa categoria possam ser responsáveis pela manutenção da doença no rebanho.

Os resultado corroboram com os achados de autores como Oliveira et al.,(1997); Birgel et al., (1988); Biachi, (2003); Birgel Junior et al., (2006); Sponchiado, (2008) e Barros Filho et al., (2010) que afirmaram haver um aumento da prevalência com o passar da idade dos bovinos.

Birgel et al., (1988) encontraram soro-positividade de 35,6% (26/73) em bovinos na faixa de 12 a 24 meses de idade e 78,6% (33/42) em animais acima de 84 meses.

Em outro estudo realizado com 1.448 bovinos da raça Holandesa, a positividade foi de 34,5% de animais com 13 a 18 meses e 66,7% para animais com idade de 109 a 114 meses (Oliveira et al.,1997).

Sponchiado, (2008) observou que a maior prevalência foi encontrada em animais com idades superiores a sessenta meses de idade (61,98%), havendo aumento gradativo e significativo a partir dos 12 meses.

Barros Filho et al., (2010) em animais com idade entre 36 e 60 a prevalência foi de 60,32% e em animais acima de 60 meses de idade a prevalência encontrada foi de 87,50%.

Birgel Junior et al., (2006) em animais de 24 a 48 meses a prevalência foi de 9,78%; na faixa etária de 48 a 72 meses encontrou 13,52% e em animais com mais de 72 meses de idade 32,72% apresentaram anticorpos séricos.

Biachi, (2003) A estratificação dos animais estudados em três faixas etárias demonstrou uma maior prevalência entre os de 11 a 15 anos (27,78%) seguidos pelos de 6 a 10 anos (19,68%) e pelos de 1 a 5 anos (11,01%). Esses resultados demonstram que a prevalência tende a aumentar proporcionalmente com a idade.

Tabela 8. Distribuição da frequência de bovinos reagente e não reagente por sexo ao teste de IDGA, Regional de Codó – MA, 2014

Sexo	Nº Amostras	Reagentes	(%)	Não Reagentes	(%)	Total
M	33	13 ^a	39,39	20	60,61	33
F	363	104 ^a	28,65	259	71,35	363
Total	396	117	29,55	279	70,45	396

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao teste de Qui Quadrado ($p < 0,05$) com 95% de confiança.

Qui Quadrado= 1,677; $p = 0,1953$

A Distribuição da frequência de bovinos reagente e não reagente por tamanho da propriedade e pelo tamanho do rebanho estão descritas nas tabelas 9 e 10 respectivamente.

Tabela 9. Distribuição da frequência de bovinos reagente e não reagente por tamanho da propriedade ao teste de IDGA, Regional de Codó – MA, 2014

Tamanho da Propriedade (Ha)	Nº Amostras	Reagentes	(%)	Não Reagentes	(%)
< 150	180	49 ^a	27,22	131	72,78
151 A 500	144	48 ^a	33,33	96	66,67
> 501	72	20 ^a	27,78	52	72,22
Total	396	117	29,55	279	70,45

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao teste de Qui Quadrado ($p < 0,05$) com 95% de confiança.

Qui Quadrado= 1,567; $p = 0,4567$

Tabela 10. Distribuição da frequência de bovinos reagente e não reagente por tamanho do rebanho ao teste de IDGA, Regional de Codó – MA, 2014

Tamanho do rebanho (cab.)	Nº Amostras	Reagentes	(%)	Não Reagentes	(%)
< 150	192	61 ^a	31,77	131	68,23
>151	204	56 ^a	27,45	148	72,55
Total	396	117	29,55	279	70,45

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao teste de Qui Quadrado ($p < 0,05$) com 95% de confiança.

Qui Quadrado= 0,8867; $p = 0,3464$

Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparada a distribuição de reagentes e não reagentes para a LEB por sexo, o tamanho da propriedade e o tamanho do rebanho.

Quanto à análise dos fatores de risco, não houve associação estatística significativa para as variáveis estudadas ($P < 0,05$) e a infecção pelo vírus da leucose no rebanho como demonstrado na Tabela 12.

Tabela 11. Variáveis avaliadas para o estudo dos fatores de risco para o vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos na Regional de Codó - MA, 2014

Variável		IDGA (n = 33)		Indicadores	
		Reagente	Não Reagente	P- Valor (<0,05)	OR (IC)
Estabulação	Sim	29	2	-	
	Não	2	0		
Aquisição de Animais	Sim	10	0	-	
	Não	21	2		
Inseminação Artificial	Sim	9	1	0,5208	0,4091 (0,022 - 7,280)
	Não	22	1		
Assistência Veterinária	Sim	5	1	0,3352	0,1923 (0,010 - 3,613)
	Não	26	1		
Vermifugação	Sim	29	1	0,1761	14,5000 (0,639 - 328,72)
	Não	2	1		
Conhece a LEB	Sim	0	0	-	
	Não	31	2		
Utilização da mesma agulha	Sim	30	2	-	
	Não	1	0		
Utilização da mesma luva	Sim	3	0	-	
	Não	28	2		

A vermifugação (OR = 14,5; IC 95% [0,639 - 328,72]), aumentou a chance de transmissão da LEB em 14,5 vezes quando este fator está presente. O ato de vermifugar o rebanho está intimamente ligada à utilização da mesma agulha constatada em 96,97% dos rebanhos pesquisadas, onde estes informaram que utilizam e reutilizam a mesma agulha para vacinações e aplicações de medicamentos.

Apesar do presente estudo não ter encontrado associação estatística significativa ($P < 0,05$) entre os fatores de risco estudado e a doença pesquisada, outros estudos no Estado destacam fatores de risco associado à doença.

Em estudos no Maranhão Santos et al., (2011), verificou associação estatística significativa entre animais reagentes para LEB e uso repetido da mesma

agulha ($P = 0,0000$), uso repetido da mesma luva obstétrica ($P=0,0021$), estabulação dos animais ($P=0,0014$) e ausência de assistência veterinária ($P=0,0161$). Oliveira et al., (2013) na análise univariada dos fatores de risco para LEB demonstrou que o uso repetitivo da mesma agulha para vacinação e vermifugação, mostrou-se como fator de risco associado à transmissão, com 2,14 vezes mais chances dos animais adquirirem a infecção quando este fator está presente.

Fernandes et al., (2009) não encontrou associação estatística entre a doença e assistência veterinária ($P=0,1214$), mais sugere que a intervenção humana, incluindo médicos veterinários e auxiliares envolvidos com a pecuária, cujos procedimentos técnicos como palpação retal para o controle ginecológico, diagnóstico de gestação, palpação vaginal ou obstétrico de vacas podem contribuindo para a propagação. Pinheiro Junior et al., (2013) observou associação significativa para assistência técnica ($p<0,000$).

Tabela 12. Distribuição das frequências dos fatores de risco para Leucose Enzoótica Bovina (LEB) em rebanhos na Regional de Codó - MA, 2014

Variável	Situação				Total
	Presente	(%)	Ausente	(%)	
Estabulação	31	93,94	2	6,06	33
Aquisição de Animais	10	30,30	23	69,70	33
Inseminação Artificial	10	30,30	23	69,70	33
Assistência Veterinária	6	18,18	27	81,82	33
Vermifugação	30	90,91	3	9,09	33
Conhece a LEB	0	0,00	33	100,00	33
Utilização da mesma agulha	32	96,97	1	3,03	33
Utilização da mesma luva	3	9,09	30	90,91	33

O elevado número de focos observado neste estudo 31/33 (93,94%) associado à prevalência encontrada 117/396 (29,55%) pode estar relacionada ao baixíssimo nível de conhecimento da doença, onde todos os proprietários ou responsáveis pelos animais disseram desconhecer totalmente a doença estudada.

A utilização da mesma agulha foi constatada em 96,97% das propriedades. Esse dado é um fato preocupante, pois vários autores na literatura nacional e estrangeira citam a reutilização da mesma agulha como uma forma importante de transmissão da doença (LEITE et al., 2001; LEUZZI JUNIOR et al., 2001; DEL FAVA & PITUCO, 2004; SANTOS et al., 2011).

O valor encontrado neste estudo para a variável utilização da mesma agulha (96,97%) foi próximo ao encontrado por Sponchiado, (2009) no Paraná, onde se constatou que em 96,36% das propriedades pesquisadas ocorria a reutilização de agulhas e seringas sem prévia desinfecção.

A estabulação dos animais está presente em 31/33 (93,94%) das propriedades. A aquisição de animais por parte dos criadores só foi constatada em 10/33 (30,30%) mesmo valor encontrada para a variável inseminação artificial. A reutilização de luva obstétrica para palpação retal para diagnóstico de prenhes foi constatada em 3/33 (9,09%) das propriedades.

A assistência veterinária está ausente em grande parte das propriedades estudadas, apenas 06/33 (18,10%) declaram possuir assistência veterinária, valor inferior ao encontrado por Santos (2011) onde um terço das propriedades (33,70%) pesquisadas nas bacias leiteiras de Bacabal, São Luís, Pedreiras, Imperatriz e Açailândia declararam possuir assistência veterinária.

As informações obtidas nas propriedades através da aplicação do questionário permitiram caracterizar alguns aspectos da pecuária leiteira da região. A raça predominante utilizada nos rebanhos é a girolando (81,56%), mais se observou também a presença de bovinos das raças holandesas (6,81%), Pardo Suíço (6,06%), Gir (3,78%), Nelore (1,26%) e Jersey (0,50%). Quanto à alimentação uma combinação de capim+ração é fornecida em 45,45% das propriedades, somente o capim em 42,42% enquanto que a combinação de capim+cevada em 12,12%, feno e silagem não são muito utilizados na região (21,21%). A combinação de sal mineral+sal comum é fornecido em 78,78% das propriedades. A origem da água fornecida aos animais vem em sua maioria de poço (36,36%) depois de uma combinação de poço+açude (33,33%) e somente de açude (30,30%).

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados da análise de 396 amostras de bovinos colhidas de 33 rebanhos e testadas sorologicamente para Leucose Enzoótica Bovina (LEB) utilizando o teste de imunodifusão em gel de Agar (IDGA) nos rebanhos com aptidão leiteira da regional de Codó no Estado do Maranhão, conclui-se que:

- A infecção pelo VLB está disseminada na região estudada e medidas de controle devem ser implementadas para impedir a propagação do vírus;
- Pela distribuição espacial dos rebanhos – focos pode-se observar que a doença está distribuída com frequência heterogênea e em toda a região;
- Os fatores de risco associados à infecção pelo BLV são: uso repetido da mesma agulha, uso repetido da mesma luva obstétrica, estabulação dos animais e ausência de assistência veterinária, porém nenhum dos fatores de risco pesquisados no estudo obteve associação estatística significativa com a doença estudada;
- Animais com idade mais avançadas apresentaram uma frequência maior de sororeagentes;
- Todos os proprietários de rebanhos pesquisados desconhecem a Leucose Enzoótica Bovina;

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Sugere-se que seja feita pesquisas em rebanho com aptidão mista e/ou corte para determinar a situação da infecção nestas outras populações bovinas;
- A implantação de um programa sanitário ou a inclusão da doença nos programas sanitários já existentes pode contribuir a médio e longo prazo para a redução da prevalência da doença;
- Além dessas medidas, campanhas de conscientização e de educação sanitária devem ser realizadas para demonstrar aos produtores envolvidos na cadeia produtiva da bovinocultura, o real impacto que a Leucose Enzoótica Bovina pode acarretar para a economia do Estado.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOVA, E.N.; KONDRATEV, V.S.; SYTINSKII, I.A. The biochemistry of leucosis in cattle. **The Veterinary Bulletin**, v.44, p.689-711, 1974.
- ABREU, J. M. G.; ARAUJO, W. P.; BIRGEL, E. H. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina em animais criados na bacia leiteira de Fortaleza, Estado do Ceará. **Arquivo da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, Salvador, v. 17, n. 1, p. 67-90, 1994.
- ABREU, V. L. V.; SILVA, J. A.; MODENA, C. M.; MOREIRA, E. C. Prevalência da leucose enzoótica bovina nos Estados de Rondônia e Acre. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 42, n. 3, p. 203-210, 1990.
- AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO MARANHÃO. **Resultado da II Etapa da Campanha de Vacinação Contra Febre Aftosa no Estado do Maranhão**, 2012.
- AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO MARANHÃO. Coordenadoria de Defesa Animal. Programa de Prevenção e Erradicação da Febre Aftosa. Efetivo de bovídeos leiteiros do Estado do Maranhão. Jun.2013
- ALFONSO, R.; ALMANSA, J.E. & BARRERA, J. del C. Prevalencia serológica y evaluación de los factores de riesgo de leucosis bovina enzoótica em la Sabana de Bogotá y los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá, Colombia. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v. 17 n. 3, p. 723-732, 1998.
- ANDRADE, J. R. A.; ALMEIDA, M. M. R. Prevalência da leucose enzoótica bovina na bacia leiteira de Goiânia, Goiás. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 10, n. 60, p. 49-53, 1991.
- 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. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1131-1140, out. 2011.
- BARROS FILHO, I. R.; GUIMARÃES, A. K.; BIONDO, A. W.; KRÜGER, E. R.; WAMMES, E. V ; OLLHOFF, R. D.; PIEKARZ, C. H. ; SPONCHIADO, D. Prevalência da leucose enzoótica em bovinos leiteiros criados na região metropolitana de Curitiba – Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p. 511-515, jul./set. 2010.
- BARUTA, D.A.; ARDOINO, S.M.; BRANDAN, J.L.; SOSA, R.E.; MARIANI, E.L.; RIESCO, S.R.; ALBRECHT, E. Relevamiento serológico de leucosis bovina enzoótica en tambos de tres departamentos de la zona norte de la pampa. In: JORNADAS LATINOAMERICANAS SOBRE LEUCOSIS BOVINA. Argentina: **Anais**. Sociedad Argentina de Virología. División de la Asociación Argentina de Microbiología, 2012, p.11.

BATISTA, J. M. Prevalência de anticorpos séricos anti vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos bovinos do Estado de Sergipe. Universidade Federal da Bahia. Dissertação (Mestrado) 89p. Salvador, 2013.

BENAVIDES, Bibiana B.; QUEVEDO, Darío Alejandro Cedeño; CRUZ, María Fernanda Serrano De La. Epidemiological study of bovine leukemia virus in dairy cows in six herds in the municipality of Pasto, Nariño **Revista Lasallista de Investigación**, v. 10, n. 1, p. 18-26, 2013.

BETANCUR, César; RODAS, Juan. Seroprevalencia del virus de la leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos de montería. **Rev.MVZ** Córdoba v. 13, n. 1, p. 1197-1204, 2008.

BIANCHI, I. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina na Região Norte Fluminense. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 2003

BIRGEL, E. H.; AYRES, M. C. C.; BIRGEL JUNIOR, 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. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, suplemento., p. 129, 1999.

BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J.; D'ANGELINO, J. L.; AYRES, M. C. C.; COSTA, J. N.; BARROS FILHO, I. R.; BIRGEL JÚNIOR, E. H. Prevalência da leucose enzoótica dos bovinos em zebuínos da raça Nelore, criados no Estado de São Paulo. **Arquivo da Escola Medicina Veterinária Universidade Federal da Bahia**, Salvador, v. 17, n. 1, p. 55-66, 1994.

BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; HAGIWARA, M. K.; PRADO, M. S. S. Considerações sobre a leucose enzoótica dos bovinos adultos em rebanho leiteiro criado no Estado de São Paulo. I - Prevalência de soro-reagentes. In: SEMANA DE VETERINÁRIA DA FMVZ/USP, 2., 1983, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1983. p. 70.

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

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

BIRGEL, E.H.; D'AGELINO, J.L.; GARCIA, M.; ZOGNO, M.A. Ocorrência da infecção causada pelo vírus da Leucose Bovina em gado leiteiro criado no Estado de São

Paulo. Avaliação pela detecção de anti-corpos séricos por imunodifusão com antígeno viral. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 43., 1988, Campinas, SP. **Resumos**. Campinas: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1988b. p. 31.

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

BRAGA, F.M.; VAN DER LAAN, C.W.; SCHUCH, L.F.; HALFEN, D.C. Infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (blv). **Ciência Rural**, Rio Grande do Sul, v. 28 n. 1, p. 163-172, 1998.

BRAGA, F. M., VAN DER LAAN, W. Leucose Enzoótica Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A.A. **Doença de ruminantes e eqüinos**. 2.ed. São Paulo: Varela. 2001, v. 1, p. 126-134.

BRAGA, Fátima Machado; VAN DER LAAN, Carlos Willi; HALFEN, Daniza Coelho e VIDOR, Teimo. Avaliação de métodos de controle da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina. **Ciência Rural**, vol.27, n.4, p. 635-640, 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resultados da vacinação contra Febre Aftosa do 2º semestre de 2013**. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Fechamento_Vac_2%C2%AA%20etapa_2012_imprensa.pdf, Acessado em: 17/04/2014

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 50 de 24 de setembro de 2013. Altera a lista de doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal e de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial. **Diário Oficial da União** (DOU) de 25 de Setembro de 2013.

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

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística - Princípios e Aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

CAMARGOS, M. F. Padronização de uma PCR para o diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina e sequenciamento parcial do gene *ENV*. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2001.

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

CARLI, K.T.; BATMAZ, A.; SEN, A.; MINBAY, A. Comparison of serum, milk and urine as samples in an enzyme immunoassay for bovine leukemia virus infection. **Research in Veterinary Science**, v.55, n.3, p.394-395, 1993.

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

CHAVES, Nancyleni P.; BEZERRA, Danilo C.; SANTOS, Larissa S. dos; SÁ, Janaira S.; SANTOS, Hamilton P.; PEREIRA, Hélder de M. Intercorrência entre leucose enzoótica e brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em sistema de produção extensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 131-134, fevereiro, 2012.

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

DEL FAVA, Claudia ; BASÍLIO, Marianna de Lima Freitas; DONATO, Talita Maria de; RIBEIRO, Claudia Pestana; OKUDA, Líria Hiromi ; Eliana DE STEFANO, Eliana de; PITUCO, Edviges Maristela. Ocorrência de ovinos (*Ovis aries*) soropositivos ao vírus da leucemia bovina no Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 47, n. 6, p. 483-487, 2010.

DEL FAVA C.; PITUCO, E. M. INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCEMIA BOVINA (BLV) NO BRASIL. **Instituto Biológico**, São Paulo, v.66, n.1-2, p.1-8, jan./dez., 2004

DIAS, N. L.;FONSECA JÚNIOR, A. A.; RODRIGUES, D. S.; CAMARGOS, M. F. PCR em tempo real para diagnóstico da leucose enzoótica bovina. **Ciência Rural**, v.42, n.8, ago, 2012.

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

FERNANDES, C.H.C.; MELO, L. E. H.; TENÓRIO, T. G. da S.; MENDES, E. I.; FERNANDES, A.C. de 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. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.3, p.327-334, jul./set., 2009.

FERRER, J.F.; GIBBS, E.R.P.J.; MURPHY, F.A. **Veterinary Virology**. 2nd ed. Sandiego: Academia Press, p. 561-595, 1993.

FIGHERA, Rafael Almeida; BARROS, Claudio Severo Lombardo de. Linfossarcoma intracerebral em bovino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, p.943-945, mai./jun., 2004.

FLORINS, A. KETTMANN, R. WILLEMS, L. Le virus de la leucémie bovine et l'homéostasie du compartiment lymphocytaire périphérique. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** v. 11, n. 1, p. 69–78, 2007.

FRANDOLOSO, R. ANZILIERO, D. SPAGNOLO, J. KUSE, N, FIORI, C. SCORTEGAGNA, G. T. BARCELLOS, L, J, G. KREUTZ, L. C. prevalência de leucose enzoótica bovina, diarreia viral bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e neosporose bovina em 26 propriedades leiteiras da região nordeste do Rio Grande Do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1102-1106, out./dez. 2008.

GALINDO, Roniery Carlos Gonçalves; RÉGO, Eneida Willcox; MELO, Mauro Tavares de; BAPTISTA FILHO, Luiz Carlos Fontes; GUIMARÃES, José Cláudio Torres; FRAGA JUNIOR, Antonio Matos Fraga; FERNANDES, Artur Cezar de Carvalho; SILVA, Tamyres Izarely Barbosa; MELO, Lúcio Esmeraldo Honório de. Levantamento sorológico da leucose enzoótica em bovinos leiteiros criados no Estado de Sergipe, Brasil. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA. **Anais**.

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.16, p. 4-18, 2007.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), disponível em: http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20133235&taxa_name=Bovine%20leukemia%20virus; acessado em : 17/04/2014 às: 16:40h

JACOBO, Roberto A. Leucosis bovina en la provincia de corrientes. In: JORNADAS LATINOAMERICANAS SOBRE LEUCOSIS BOVINA. 3 Y 4 DE MAYO DE 2012 - BUENOS AIRES – ARGENTINA. **Anais**, Argentina: Sociedad Argentina de Virología . División de la Asociación Argentina de Microbiología,2012. p.10.

JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. **Veterinary Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 287-311, 1992.

KALE, M.; BULUT, O.; YAPKC, O.; GULAY, M S; PEHLIVANOGLU, F; ATA, A and YAVRU, S. Effects of subclinical bovine leukemia virus infection on some production parameters in a dairy farm in southern Turkey. **Afr.vet.Ver.** v. 78, n. 3, p. 130–132, 2007.

KANNO, Toru; ISHIHARA, Ryoko; HATAMA, Shinichi; OUE, Yasuhiro; EDAMATSU, Hiroki; KONNO, Yasuhiro; TACHIBANA, Satoshi and MURAKAMI, Kenji. Effect of Freezing Treatment on Colostrum to Prevent the Transmission of Bovine Leukemia Virus. **J. Vet. Med. Sci.** v. 76, n. 2, p. 255–257, 2014.

KHAMESIPOUR, Faham; DOOSTI, Abbas; SHAHRAKI, Amin Khodadoustan; GOODARZI, Mehdi. Molecular detection of bovine leukemia virus (BLV) in the frozen semen samples of bulls used for artificial insemination in Iran. **Res. Opin. Anim. Vet. Sci.**, v. 3, n. 11, p. 412-416, 2013.

KOBAYASHI, Sota; TSUTSUI, Toshiyuki; YAMAMOTO, Takehisa; HAYAMA, Yoko, KAMEYAMA, Ken-ichiro; KONISHI, Misako; MURAKAMI, Kenji. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 1, 2010.

KOHARA, Junko; KONNAI, Satoru; ONUMA, Misao. Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. **Jpn. J. Vet. Res.** v. 54, n. 1, p. 25 – 30, 2006.

LAGES, S. L. S.; VESCHI, J. L.; CASTRO, R. S.; BUZINARO, M. G.; ALEXANDRINO, B. ; DUTRA, I. S.; SAMARA; S. I. Detecção de anticorpos heterólogos contra o vírus da leucose enzoótica bovina em caprinos. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 89-94, 2007.

LEITE, R. C.; LOBATO, Z. I. P.; CAMARGOS, M. F. Leucose enzoótica bovina. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília: n. 24, p. 20-28, 2001.

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, jul./dez., 2001.

LEUZZI JUNIOR, L. A.; GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; FREIRE, R. L.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Influência da idade e do tamanho do rebanho na soroprevalência da leucose enzoótica bovina em rebanhos produtores de leite tipo B, na região de Londrina do Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, Niterói, v. 10, n. 2, p. 93-98, 2003.

LOJKIĆ, I., BALIĆ, D.; RUDAN, N.; KOVAČIĆ, M.; ČAČ, Ž.; PERIŠKIĆ, M.; BEDEKOVIĆ, T.; ROIĆ, B.; GROZDANIĆ, I. CIGLAR. Eradication of bovine leukosis virus on a dairy farm through improved virus detection. **Vet. Arhiv**, v. 83, p. 581- 591, 2013.

LUCAS, M.H.; DAWSON, M.; CHASEY, D.; WIBBERLEY, G.; ROBERTS; D.H. Enzootic bovine leucosis virus in semen. **Veterinary Research**, Paris: v. 106, n. 6, p. 128, 1980.

LUDERS, M. A. Prevalência de Anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina em fêmeas com mais de dois anos no rebanho de bovinos leiteiros no município de Mafra-SC. 2001. 30 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agroveterinária/Sanidade Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lajes, 2001.

MACEDO, D. M. R.; BASSI, P. B.; BITTAR, E. R.; BITTAR, J. F.F. Análise dos fatores de risco e prevalência da leucose enzoótica bovina em três microrregiões do triângulo mineiro. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA (I SIMPREV). **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 4, 2013. **Resumo**.

MATOS, P. F.; BIRGEL JUNIOR, Eduardo Harry ; BIRGEL, E. H. . Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na

Bahia e comparação entre resultados do teste de Elisa e da imunodifusão em gel de ágar. **Brazilian Journal of Veterinary Research the Animal Science**, São Paulo, v. 42, p. 171-180, 2005.

MEIRELLES-BARTOLI R. B.; SOUSA D. B.; Leucose enzoótica bovina: Importância do desenvolvimento da enfermidade na eliminação viral. **PUBVET**, Londrina, v. 7, n. 11, 2013.

MENDES, I, E. Avaliação da intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose bovina em vacas leiteiras do Estado de Pernambuco. **Tese** (Doutorado em Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária, 2009.

MILLER, J.M.; MILLER, L.D.; OLSO, C.; GILLETTE, K.G. Virus like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. **J. Nat. Cancer. Inst.**, v.43, p. 1297-305, 1969.

MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Serological detection of bovine leukemia virus infection. **Vet. Microbiol.**, v. 1, p. 195, 1976.

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, 1977.

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

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

MONTANARI, K. C. S. Gestão sanitária do abortamento bovino: vírus da leucemia bovina como agente causal. **Dissertação**. Instituto Biológico, São Paulo, 2013;

MOUSAVI, Shalaleh; HAGHPARAST, Alireza; MOHAMMADI, Gholamreza; TABATABAEIZADEH, Seyed-Elias. Prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in the northeast of Iran. **Veterinary Research Forum**, v. 5, n. 2, p. 135 – 139, 2014.

MURAKAMI, Kenji; KOBAYASHI, Sota; KONISHI, Misako; KAMEYAMA, Ken-ichiro; YAMAMOTO, Takehisa; TSUTSUI, Toshiyuki. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 148, Issue 1, p. 84–88, february, 2011.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINECK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**, California: Academic Press, 3 ed., 1999, p.382 – 383

MUSSGAY, M.; KAADEN, O.R. Progress in studies on the etiology and serologic diagnosis of enzootic bovine leukosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.79, p.43-72, 1978.

NAHMS-USDA Bovine Leukosis Virus on U.S. Dairy Operations, 2007. Disponível em:

http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_BLV.pdf. Acesso em: 27 Apr. 2011.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Enzootic Bovine Leukosis. Terrestrial Manual - 2012 - CHAPTER 2.4.1.1. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf acessado em: 17/04/2014, às 19:30h.

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

OLIVEIRA, Emerson Antônio Araújo de; SANTOS, Hamilton Pereira; PEREIRA, Helder de Moraes; CASTRO, Roberto Soares de; SOUSA, Vanessa Evangelista; SÁ, JANAIRA SILVA; SOARES, Rafael Rodrigues; OLIVEIRA, Mayra da Silva; CUNHA, Wallington Pereira da. Leucose enzoótica bovina: diagnóstico e fatores de risco em rebanhos leiteiros da regional de Pedreiras- Maranhão. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA. **Anais**.

OLSON, C.; MILLER, J. History and terminology of enzootic bovine leukosis. In: BURNBY, A. **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus**. Boston. Kluwer. p. 3-11, 1987.

OTT S.L.; JOHNSON R.; WELLS S.J. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. **Prev Vet Med**. Dec 12, v.61, n. 4, p. 249-62, Dec. 12, 2003.

PIOVESAN, M.; FERNANDES, M. H. V.; CORRÊA, R. A.; PRADO, M. H. J.; CAMARGO, A. D. RODRIGUES, P. R. C. Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarreia viral bovina e vírus da leucose enzoótica bovina na região da campanha do estado do Rio Grande do Sul. **Science and Anima Health**. v.1, n.1, p. 38-49, jul./dez. 2013.

POLLARI, F. L.; WANGSUPHACHART, V. L.; DI GIACOMO, R. F.; EVERMANN, J. F. Effect of bovine leukemia virus infection on production and reproduction in dairy cattle. **Canadian Journal Veterinary Research**, Ottawa, v. 56, p.289-295, 1992.

RADOSTITS, O. M; GAY, C. C; BLOOD, D. C et al. **Clínica Veterinária**. 9 ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002, p.940-951.

RAJÃO, Daniela Souza; HEINEMANN, Marcos Bryan; REIS, Jenner Karlisson Pimenta; BRAZ, Gissandra Farias; HADDAD, AMARAL, João Paulo; RIBEIRO, Antonio Candido Cerqueira Leite; LEITE, Romulo Cerqueira. Effects of bovine leukemia virus infection on crossbred and purebred dairy cattle productive performance in Brazil. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 891-900, mar./abr. 2014.

RANGEL, N. M., MACHADO, A. V. Contribuição à oncologia comparada em Minas Gerais. [Contribution to the comparative oncology in Minas Gerais State]. **Arq. Esc. Sup. Vet. E.M.G.**, v.1, p.83-96, 1943.

RAVAZZOLO, A. P.; COSTA, U. M. Retroviridae. In: Eduardo Furtado Flores. (Org.). **Virologia Veterinária**. 1 ed. Santa Maria, 2007, p. 809-837

RESOAGLI, J. P.; JACOBO, R. A.; STORANI, C; A.; CIPOLINI, M. F.; DECO, M.; CORREA, E. Resultados serológicos de leucosis enzootica bovina en la zona N.O. en Rodeos de Cría de la Provincia de Corrientes, Argentina. **Cátedra de Enfermedades Infecciosas - Facultad de Ciencias Veterinárias – UNNE**, disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCcQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.unne.edu.ar%2Funnevieja%2FWeb%2Fcyt%2Fcyt%2Fveterinarias%2Fv-050.pdf&ei=WL-RU-CRJtHQsQSrooEo&usg=AFQjCNFodezSd9LqTzhgo6AGQME2ntVLBQ&sig2=nqEU L5aTskSVHpprHqZBrQ> acessado em: 17/04/2014

ROCHA, José Francisco Xavier da; AIRES, Adelina Rodrigues; ROCHA, Ricardo Xavier da; AMARAL, Carolina; CARPES, José Luiz da Silva; GALVÃO, Abílio Trindade; LEAL, Marta Lizandra. Soroprevalência do vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos da região sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. **Revista Agrocientífica**, v. 1, n. 1, p. 17-22, jan./jun. 2014.

RODAKIEWICZ, S. M. Determinação da heterogeneidade do vírus da leucose bovina no Estado de Santa Catarina. **Dissertação** (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2013.

RODRÍGUEZ, Sabrina M.; FLORINS, Arnaud; GILLET, Nicolas; BROGNIEZ, Alix de; SÁNCHEZ-ALCARAZ, María Teresa; Boxus, Mathieu; BOULANGER, Fanny; GUTIÉRREZ, Gerónimo; TRONO, Karina; Alvarez, Irene; VAGNONI, Lucas and WILLEMS, Luc. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLV. **Viruses**, v 3, p. 1210-1248, 2011.

RUBIANES, N. A. Leucosis enzoótica bovina: estudo seroepidemiológico em rebaños de cria de La provincia de La Pampa – Argentina. **Ciência Veterinária**. v. 6, n. 1, p. 22-33, 2004.

SANDEV, Nikolay; ILIEVA, Darinka; SIZOV, Ignat; RUSENOVA, Nikolina; ILIEV, Emil. Prevalence of enzootic bovine leukosis in the Republic of Bulgaria in 1997-2004. **Veterinarski Arhiv**, v. 76, n. 3, p. 263-268, 2006.

SANTOS, Cláudio Fernandes. Leucose enzoótica bovina na região norte Fluminense : bioquímica sérica de animais soropositivos e soronegativos. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2009. 68 f.

SANTOS, H. P. Leucose enzoótica bovina: estudo epidemiológico na bacia leiteira do Estado do Maranhão e aperfeiçoamento do diagnóstico. **Tese** (Doutorado em

Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2010.

SANTOS, G. R.; OLIVEIRA, J. M. B.; BRANDESPIM, D. F.; OLIVEIRA, A. A. F.; MOTA, R. A.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. Análise epidemiológica da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (leb), na microrregião Garanhuns, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v.35, n. 4, p. 371-377, out./dez., 2013.

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. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.3, p.351-358, jul./set., 2011.

SANTOS JÚNIOR, Gislaine Raquel; OLIVEIRA, Mário Baltazar de; BRANDESPIM, Daniel Friguglietti; OLIVEIRA, Andréa Alice da Fonseca; MOTA, Rinaldo Aparecido; PINHEIRO JÚNIOR, José Wilton. Análise epidemiológica da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (LEB), na microrregião Garanhuns, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v. 35, n. 4, p. 371-377, out./dez. 2013.

SARDI, S. I.; CAMPOS, G. S.; BARROS, S. L. B.; EDELWEISS, G. L.; MARTINS, D. T. Detecção de anticorpos contra o vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (pi-3) e o vírus da leucose bovina (vlb) em bovinos de diferentes municípios do Estado da Bahia, Brasil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 61-65, nov. 2002.

SARDI, Sílvia inês; CAMPOS, Gúbio Soares; CAMPOS, SÍLVIA BONFIM; EDELWEISS, GABRIELA LORENS; EDELWEISS, DELANE TIGRE. Detecção de anticorpos contra o vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (pi-3) e o vírus da leucose bovina (vlb) em bovinos de diferentes municípios do Estado da Bahia, Brasil. **R. Ci. Méd. Biol.**, Salvador, v. 1, n. 1, p. 61-65, nov., 2002.

SCHWARTZ, I., BENSAD, A., POLACK, B., PERRIN, B., BERTHELEMY, M., LEVY, D. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. **Journal of Virology**, v.68, n.7, p.4589-4596, 1994.

SHARIFZADEH, A.; DOOSTI, A.; DEHKORDI, P. G. Molecular Detection of Bovine leukemia Virus (BLV) in the Semen Samples of Bulls. **World Journal of Zoology**, v.6, n. 3, p. 285 – 290, 2011.

SILVA FILHO, Alonso P.; AFONSO, José Augusto B.; SOUZA, José Cláudio de A.; RIET-CORREA, Franklin; DANTAS, Antônio F.; DANTAS, Alexandre C.; COSTA, Nivaldo de A. e MENDONÇA, Carla L. Linfossarcoma em bovinos no Agreste Meridional de Pernambuco1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.7, p.591-597, julho, 2011.

SILVA, S. V. Leucose enzoótica dos bovinos. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose dos bovinos em rebanhos cruzados – holandês/ zebu e em animais

da raça Pé-duro, criados no Estado do Piauí. São Paulo, 2001.176f. **Tese** (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

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

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

SOARES, Rafael Rodrigues; SANTOS, Hamilton Pereira; PEREIRA, Helder de Moraes; FREITAS, Ermilton Junio Pereira de; SÁ, Janaira Silva; SOUSA, Vanessa Evangelista de; OLIVEIRA, Emerson Antônio Araújo; CUNHA, Wallington Pereira da; OLIVEIRA, Mayra da Silva; CHAGAS, Daniel Fernando Paulino. Ocorrência de leucose enzoótica bovina em rebanhos bubalinos da baixada maranhense. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA. **Anais**.

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

SPONCHIADO, D. Prevalência de anticorpos séricos anti-Vírus da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos da raça Holandesa Preta e Branca, criados no Estado do Paraná. Curitiba: 2008. 101f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

STARLING, R. Z. C.; BEZERRA, A. O.; SALARDANE, I.; FERREIRA, P. G.; CLIPES, R. C.; DONATELI, D. M. Soroepidemiologia da leucose enzoótica bovina em propriedades leiteiras do município de Alegre, estado do Espírito Santo, Brasil. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v.6, n.12, p. 427 – 441, 2013.

TRIOLA, Mário F. **Introdução à Estatística**. 7. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999.

VAN DER MATEEN, J. M., MILLER J. M. Susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection by various routes of exposure. **Advances in Comparative Leukemia Research**. p 29 – 32, 1977.

VANLEEUEWEN, John A.; FORSYTHE, LeeAnn; TIWARI, Ashwani; CHARTIER, Renee. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in dairy cattle in Saskatchewan. **Can Vet J**, v. 46, p. 56-58, January, 2005.

VANLEEUEWEN, John A.; KEEFE, Gregory P.; TREMBLAY, Rob; POWER, Christine; WICHTTEL, Jeff J. Seroprevalence of infection with Mycobacterium avium subspecies

paratuberculosis, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus in Maritime Canada dairy cattle. **Can Vet J**, v. 42, p. 193-198, 2001.

WEISS, R. A. The discovery of endogenous retroviruses. **Retrovirology**, v.3, p.67, 2006.

APÊNDICES

(APÊNDICE A)

QUESTIONÁRIO LEUCOSE

IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO									
N.º _____ Propriedade:			Endereço:				Data / /		
Proprietário:			Telefone:		Município:		Estado:		
Regime de Criação:			Área total: _____ ha;						
Área destinada ao Pastejo e/ou capineiras: _____ ha									
ANIMAIS:									
BOVINOS									
0 a 12 M		12 a 24 M		24 a 36 M		mais de 36 M		TOTAL	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
OUTRAS ESPÉCIES									
BUBALINOS	OVINOS	CAPRINOS	EQUINOS	SUÍNOS	AVES	CANINOS	MUARES	ASININOS	
MANEJO DA CRIAÇÃO									
1 - Como são criados os animais? () Extensivo () Semi-Intensivo () Intensivo									
2 - Adquire animais com frequência? () Sim () Não									
2.1 - Procedência _____ Realizou Quarentena () Sim () Não									
2.1 - Qual sexo? () Macho () Fêmea									
3 - Tipo de Exploração Animal: () Leite () Carne () Mista									
REPRODUTIVO									
4 - Quantos nascimentos ocorrem durante o ano (média) ? _____									
5 - Taxa de Mortalidade: () Alta () Média () Baixa									
6 - Época do ano em que ocorre o maior número de parições? _____									
7 - Os bezerros ao nascerem apresentam-se:									
() Normais () Anormais () Fracos () Dificuldade de locomoção () Outros									
8 - Idade em que a fêmea é coberta pela primeira vez? _____									
9 - Realiza Inseminação Artificial () Sim () Não									
ALIMENTAR									
10 - Alimentação () Capim () Ração () Capim + Ração () Outros _____									
11 - Como é fornecida aos animais? () No cocho () À pasto () Ambos									
12 - Costuma fornecer feno e/ou silagem aos animais () Sim () Não									
Qual a origem? _____									
13 - Durante o ano oferece sal para os animais () Sim () Não									
Qual o tipo? () Mineral () Comum									
14 - locais onde os animais pastam e/ou fica armazenado feno e silagem os cães tem acesso?									
() Sim () Não									
15 - Fornece água () Sim () Não Qual a origem? () Poço () Rio () Barreiro									
SANITÁRIO									
16 - Possui assistência veterinária () Sim () Não									
17 - Faz vacinação () Aftosa () Raiva () Manqueira () Brucelose () Outras									
Quando? _____									

18 - Foi realizado coleta de material dos animais para a realização de exames?

() Sim () Não Qual(is) e Quando? _____

19 - Que testes foram realizados?

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

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

() Periódico () Esporádico () 6 em 6 meses ou 3 em 3 meses () Anualmente

Como? Produto(s)? _____

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

Qual (is)? Para que? _____

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

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

23 - Presença de ratos () Sim () Não

24 - Que outros roedores domésticos e silvestres que existem na propriedade? _____

26 - Usa a mesma agulha em vários animais? () Sim () Não

27 - Usa a mesma luva obstétrica em vários animais? () Sim () Não

28 - Conhece a Leucose Enzootica Bovina () sim () não

(APÊNDICE B)**FICHA CADASTRAL DA PROPRIEDADE**

FICHA Nº _____

Ficha Cadastral da Propriedade**Dados Gerais**

Nome da Propriedade: _____

Bacia Leiteira: _____ Município: _____

Endereço: _____

Coordenadas Geográficas: Lat: _____ Long: _____

Nome do Proprietário: _____

Raça dos animais: _____ Pelagem: _____

Sistema de criação: _____

ANIMAIS								
Faixa etária	< 03 anos		> 03 e < 07 anos		> 07 anos		TOTAL	
Sexo	M	F	M	F	M	F	M	F
Quantidade								

(APÊNDICE C)

FORMULÁRIO DE COLETA DE AMOSTRAS

Nº DA PROPRIEDADE:_____ DATA DA COLETA ____/ ____/ ____

PROPRIEDADE: _____

PROPRIETÁRIO: _____

MUNICÍPIO: _____

Nº ORDEM	Nº DE SEQUENCIA	NOME (Nº) DO ANIMAL	SEXO	IDADE	RAÇA	PELAGEM
01						
02						
03						
04						
05						
06						
07						
08						
09						
10						
11						
12						

ANEXO

(ANEXO A)

TÉCNICA DA IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAR (IDGA)

1 PREPARAÇÃO DO TAMPÃO

A solução tampão foi preparada misturando-se:

NaCl.....	42,5g
KCl.....	0,1g
Na ₂ HPO ₄ (anidro).....	0,6g
KH ₂ PO ₄	0,1g
EDTA dissódico.....	0,186g
NaN ₃ (azida sódica).....	0,05g
Água destilada q.s.p.	500ml

- Realiza-se uma agitação até completa homogeneização e diluição. Ajustou-se o pH para 7,3 com solução de NaOH a 1N e foi conservada a 4°C.
- Pesava-se 0,9g de ágar Noble e dissolvia em 100ml de tampão. Fervia-se esta solução em banho maria até o ágar dissolver-se por completo.
- Utilizava-se placas de Petri de vidro com 50mm de diâmetro ou lâminas de vidro 3cm x 12cm e lâminas 4,5 cm x 15 cm, ambas sem ranhuras.
- Adicionava-se 5ml de ágar a 0,9% ainda quente em cada placa, 11ml de ágar a 0,9% na lâmina de 3cm x 12cm e na lâmina de 4,5 cm x 15 cm . As placas e lâminas eram mantidas por uma hora em temperatura ambiente (20°C a 25°C) em local livre de pó, permitindo a evaporação da umidade excedente e o resfriamento da ágar.
- As placas de ágar não perfuradas eram conservadas com tampas para baixo, as lâminas também eram conservadas até uma semana entre 2°C a 8°C, dentro de uma câmara úmida. Antes do uso verificava se o ágar estava ressecado ou coberto de umidade.

2 PERFURAÇÃO DOS POÇOS

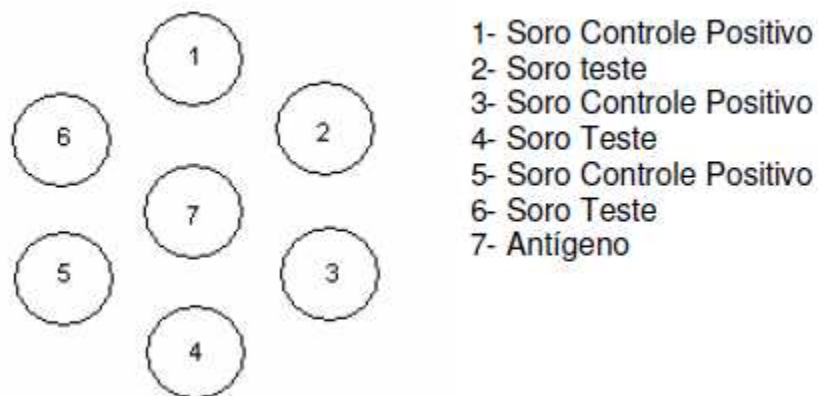
- Foi utilizado um cortador padrão com sete perfuradores (um deles central e seis periféricos) com 4mm de diâmetro, com 3mm de distância entre os poços.
- O ágar foi cortado somente após o mesmo estar suficientemente solidificado, a fim de evitar fragmentação das bordas no momento da retirada dos cilindros de ágar.
- Removeram-se por sucção os cilindros do ágar e a umidade residual de cada poço, usando uma ponteira conectada a uma bomba a vácuo. As placas e lâminas perfuradas eram utilizadas imediatamente após o corte.

3 ADIÇÃO DOS REAGENTES E INCUBAÇÃO DAS PLACAS

- Os soros testados foram colocados alternadamente ao redor do poço central em um volume de 25 microlitros por poço. Para realização desse procedimento utilizava-se uma micropipeta e ponteiras individuais. Um total de três amostras eram testadas no conjunto de sete poços. Todos deveriam ser preenchidos. Se não houvesse três amostras para testar, era necessário preencher os poços remanescentes com um dos soros testes.
- O soro controle positivo era colocado ao lado do soro a ser testado. Também utilizava-se uma micropipeta e uma ponteira. O volume para preencher os poços era de 25 microlitros.
- O poço central era preenchido com 25 microlitros de antígeno (Ag), com a utilização de uma micropipeta e ponteira (FIGURA 1). Importante salientar que tanto os reagentes como os soros testados preenchiam os poços até o nível superior do ágar sem deixar menisco. As placas eram cobertas, deixadas em repouso alguns minutos antes de movimentá-las. As lâminas apenas ficavam em repouso. Com esse procedimento reduzia-se a possibilidade do derramamento do Ag e soros sobre a superfície do ágar.

- As placas e as lâminas eram incubadas em câmara úmida em uma temperatura de 37 oC.

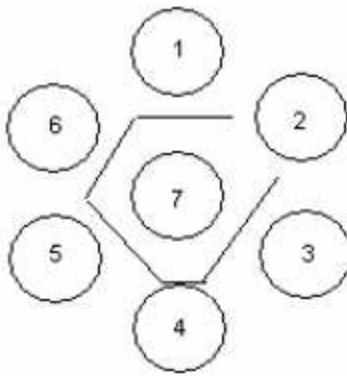
FIGURA 1 – Demonstração de como é realizado o teste de imunodifusão em gel de Agar.



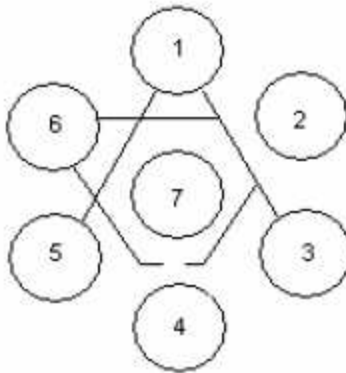
4 LEITURA DAS PLACAS

- As leituras das placas e das lâminas foram realizadas em ambiente escuro, com o auxílio de um foco de luz forte, feixe estreito, que podia ajustar sua intensidade e posições variáveis, a fim de verificar o aparecimento de linhas de precipitação nas placas e lâminas. A reação era observada contra um fundo preto.
- A leitura era feita após 48 horas a 72 horas de incubação. A FIGURA 2 demonstra as possibilidades de leitura das placas.

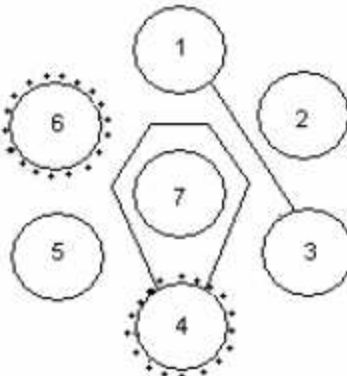
FIGURA 2 – demonstrações das possíveis leituras do teste de imunodifusão em gel de ágar, utilizando o kit de leucose bovina fabricado pelo TECPAR.



- 1- Soro Controle Positivo
- 2- Soro testado - Negativo
- 3- Soro Controle Positivo
- 4- Soro testado - Fracamente Positivo
- 5- Soro Controle Positivo
- 6- Soro testado - Positivo
- 7- Antígeno



- 1- Soro Controle Positivo
- 2- Soro testado – Reação Inespecífica
- 3- Soro Controle Positivo
- 4- Soro testado – Fortemente Positiva
- 5- Soro Controle Positivo
- 6- Soro testado – Reação Inespecífica
- 7- Antígeno



- 1- Soro Controle Positivo
- 2- Soro testado – Duas linhas de precipitação.
- 3- Soro Controle Positivo
- 4- Soro testado – Negativo com turvação ao redor do poço.
- 5- Soro Controle Positivo
- 6- Soro testado – Positivo com turvação ao redor do poço.
- 7- Antígeno