

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Clínica e Cirurgia Veterinária

Henrique Passos Peçanha Vieira

Perfil epidemiológico da Leucose Enzoótica Bovina em um sistema intensivo de produção de leite.

Belo Horizonte
2023

Henrique Passos Peçanha Vieira

Perfil epidemiológico da Leucose Enzoótica Bovina em um sistema intensivo de produção de leite.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Clínica e Cirurgia Veterinária:

Orientador: Antônio Último de Carvalho
Coorientador: Elias Jorge Facury Filho

Belo Horizonte
2023

V658p Vieira, Henrique Passos Peçanha ,1997-
Perfil epidemiológico da Leucose Enzoótica Bovina em um sistema
intensivo de produção de leite /Henrique Passos Peçanha Vieira. – 2023.
68f: il

Orientador: Antônio Último de Carvalho
Coorientador: Elias Jorge Facury Filho
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da
UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.
Bibliografias: f:62 a 68.

1. Bovino – Doenças - Teses - 2. Leucose bovina – Teses - 3. Diarreia
Elias Jorge em animais – Teses - I. Carvalho, Antônio Último de - II. Facury
Filho, – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária -
IV. Título.

CDD – 636.089 4

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

HENRIQUE PASSOS PEÇANHA VIEIRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovado(a) em 27 de fevereiro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Antonio Ultimo de Carvalho - Orientador(a)

Dr.(a). Elias Jorge Facury Filho

Dr.(a). Rogerio Carvalho Souza

Dr.(a). Jenner Karlisson Pimenta dos Reis



Documento assinado eletronicamente por **Jenner Karlisson Pimenta dos Reis** Membro de comissão, em 14/03/2023, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elias Jorge Facury Filho**, Professor do Magistério Superior, em 15/03/2023, às 20:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Ultimo de Carvalho**, Professor do Magistério Superior, em 11/04/2023, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rogerio Carvalho Souza**, Usuário Externo, em 14/04/2023, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2076238** e o código CRC **6EC7020F**.

Agradecimentos

Ser médico veterinário sempre foi um sonho, e o mestrado me tornou um profissional ainda melhor. Este trabalho é fruto das boas intenções de várias pessoas e das relações que construí, que me tornaram um profissional capaz de enfrentar desafios no campo, na escola e na vida pessoal.

Agradeço a todos da clínica de ruminantes da Escola da UFMG por todos os momentos de aprendizado e diversão, em especial ao professor Antônio Último de Carvalho e ao professor Elias Jorge Facury Filho pela orientação e por terem me guiado neste caminho do mestrado. Sem vocês, o conhecimento sobre a saúde de ruminantes seria infinitamente menor. Fazer parte desta história da clínica de ruminantes é para mim uma grande honra.

A ajuda nas coletas realizadas por Guilherme Lemos foi essencial para o trabalho em campo e acabei ganhando com isso um grande amigo. A realização dos IDGA não seria possível sem a ajuda e comprometimento da Amanda do Retro-lab, que foi importantíssima para as análises laboratoriais. A boa vontade e visão de mundo do Sr. Flavio Faria possibilitou a realização do trabalho que foi realizado em sua propriedade.

Muito obrigado ao professor Jenner Reis por me auxiliar neste mundo complexo dos retrovírus e me mostrar o melhor caminho para entendê-los.

Aos professores Rogério Carvalho de Souza e Raphael Carvalho de Souza, agradeço pelos ensinamentos e pela amizade, que foram o estopim inicial para eu me apaixonar pelo mundo dos bovinos. Dali surgiu minha vontade e minha primeira inspiração para buscar o conhecimento e ser professor.

Nada na minha vida é tão fundamental quanto minha família. Nunca faltou suporte, carinho, atenção. Meu pai e minha mãe são exemplos que tenho como meta. Meu irmão me inspira a cada dia, e muito de quem sou veio dele. Como irmão mais novo, sempre fui de copiá-lo e me espelhar em uma pessoa tão genial é para mim motivo de orgulho. À Laura Bastos, eu agradeço cada segundo destes dois anos de mestrado. Ela foi meu suporte e meus momentos de alegria mais intensos.

“Onde houver ódio, que eu leve o amor, onde houver
ofensa, que eu leve o perdão. Onde houver discórdia, que eu
leve a união. Onde houver dúvida, que eu leve a fé. Onde
houver o erro, que eu leve a verdade. Onde houver desespero,
que eu leve a esperança. Onde houver tristeza, que eu leve a
alegria. Onde houver trevas, que eu leve a luz.”

São Francisco de Assis.

Resumo

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma doença viral que afeta bovinos e pode causar grandes perdas de produção. Em animais mais velhos, a doença pode levar a um quadro de linfossarcoma generalizado. O objetivo deste trabalho foi entender a prevalência de LEB em uma fazenda de gado leiteiro confinado em Compost Barn e alguns parâmetros clínicos desses animais. Para isso, uma amostra de sangue em tubo ativador de coágulo foi coletada de todos os bovinos da fazenda, e palpação de linfonodos cervical superficial e supra mamário foi realizada em 282 animais. Além disso, dados zootécnicos dos animais foram recolhidos, incluindo produção de leite, intervalo entre partos, idade e categoria animal, e uma inspeção da propriedade foi realizada para entender os principais fatores de risco para a transmissão de LEB. O teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) foi realizado para LEB a partir do sangue coletado em tubo formador de coágulo. Uma segunda coleta de sangue (EDTA) de 24 animais foi realizada, 12 positivos para LEB e 12 negativos, para avaliar hemograma completo, fibrinogênio e proteína total. Para comparar as médias, foi realizado o teste T de Student, e uma análise descritiva avaliou as prevalências. A prevalência encontrada foi de 65,93% de animais positivos para LEB, sendo 14 bezerras (31,35%), 26 novilhas (36,30%) e 145 vacas (87,08%). Observou-se uma alta variação nas prevalências entre as categorias, sendo maior à medida que a idade aumenta. A média de idade dos animais positivos (59,22 meses) foi maior do que a dos animais negativos (46,083 meses) ($p < 0,05$), mostrando que quanto mais tempo um animal fica no rebanho, maior é a chance de ele se infectar pelo vírus da LEB. Os animais positivos apresentaram hematócrito mais baixo (32 vs 29, $p < 0,05$) e contagem de linfócitos (7,869⁹ vs 10,78, $p < 0,05$) e contagem de plaquetas maior (185,416 vs 243,916, $p < 0,05$) em comparação aos negativos. A produção de leite e o intervalo entre partos não tiveram impacto perceptível pela doença no estudo. Foi encontrada uma alta prevalência de 65,93% de LEB na fazenda, e diversos fatores podem estar envolvidos na transmissão do BLV. No estudo, o número de animais positivos com aumento de linfonodos e linfocitose chamou a atenção, características relacionadas a animais altamente transmissores.

Palavras-chave: biosseguridade; iatf; vírus; leite; blv; relação linfócito plaqueta

Abstract

Bovine Leukosis Virus (BLV) is a viral disease that affects cattle and causes significant production losses. In older animals, generalized lymphosarcoma may occur. The objective of this study was to understand the distribution of BLV prevalence in a confined dairy cattle farm in a Compost Barn and some clinical parameters of these animals. For this, a blood sample was collected in a clot activator tube from all the cattle on the farm, and palpation of the superficial cervical and supramammary lymph nodes was performed in 282 animals. In addition, zootechnical data such as milk production, calving interval, age, and animal category were collected, and a visit and inspection were conducted to understand the main risk factors for BLV transmission. The blood in the clot-forming tube was centrifuged, and the agar gel immunodiffusion test (AGID) was performed for BLV. A second blood collection (EDTA) was required for 24 animals, 12 positive for BLV and 12 negative, and a complete blood count, fibrinogen, and total protein were performed. To compare the means, the Student's T-test was performed, and a descriptive analysis evaluated the prevalences. The prevalence found was 65.93% of positive animals for BLV, being 14 calves (31.35%), 26 heifers (36.30%), and 145 cows (87.08%). It is possible to observe that there is high variation when comparing prevalences between categories, being higher as age increases. When comparing the mean age of positive (59.22 months) and negative (46.083 months) animals, the mean of positive animals is higher ($p < 0.05$), showing that the longer an animal stays in the herd, the higher the chance of being infected with BLV. Positive animals have a lower hematocrit (32 vs. 29, $p < 0.05$) and lymphocyte count (7,869⁰ vs. 10.78, $p < 0.05$) and a higher platelet count (185,416 vs. 243,916, $p < 0.05$) compared to negative animals. Milk production and calving interval had no noticeable impact on the disease in the study. A high prevalence of 65.93% of BLV was found on the farm, and several factors may be involved in BLV transmission. The number of positive animals with increases in lymph nodes and lymphocytosis drew attention, which are characteristics related to highly transmissible animals.

Keywords: biosecurity; tai; virus; Milk; blv; lymphocyte platelet rat

Lista de figuras:

| | |
|--|----|
| Figura 1 Vacas em lactação no compost barn, realizada na primeira visita a fazenda | 17 |
| Figura 2 Vaca necropsiada com quadro clínico de Leucose enzoótica bovina. a: tumoração retirada do abdômen. b: vaca em estação. c: massas Tumoraes distribuídas por todo o peritônio | 18 |
| Figura 3 Vaca da raça holandesa diagnosticada com leucose enzoótica bovina. O círculo mostra o linfonodo Cervical superficial aumentado | 19 |
| Figura 4 Ano das 1000 publicações mais relevantes levando em consideração o número de citações, relevância da revista publicada, e o índice de relevância do autor principal, utilizando os dados do software "Publish or Perish" de 20/02/2023 | 20 |
| Figura 5 As cores representam a prevalência nacional de rebanhos positivos e as porcentagens representam a prevalência média de animais positivos nos rebanhos dos países do continente americano. Adaptado e traduzido de GUTIÉRREZ, SILVINA ELENA et al., (2020) | 26 |
| Figura 6 Vaca da raça holandesa diagnosticada com leucose enzoótica bovina, podemos observar o linfonodo cervical superficial aumentado quando palpado segundo a técnica descrita por DIRKSEN, (1993). | 34 |
| Figura 7 Número de bovinos positivos e negativos na sorologia para LEB por categoria animal em uma fazenda leiteira de alta produção no município de Coromandel (MG) | 41 |
| Figura 9 Frequência dos bovinos da raça holandês, com sorologia positiva (IDGA) para leucose enzoótica bovina, de acordo com a faixa etária, em uma fazenda comercial intensiva de produção de leite em Minas Gerais. | 42 |

Lista de Abreviaturas:

| | | |
|------|------|--|
| I | % | Porcentagem |
| II | BLV | Vírus da Leucose enzoótica bovina |
| III | BIV | Vírus da imunodeficiência bovina |
| IV | HTLV | Vírus-T linfotrópico humano |
| V | HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| VI | CEUA | Comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Minas Gerais |
| VII | CHCM | Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média |
| VIII | CS | Linfonodo cervical superficial |
| IX | EDTA | ethylenediaminetetraacetic acid |
| X | EUA | Estados Unidos da América |
| XI | IATF | Inseminação artificial em tempo fixo |
| XII | IDGA | Imunodifusão em gel de agar |
| XIII | IgG | Imunoglobulinas G |
| XIV | Kg | Quilogramas |
| XV | LEB | Leucose enzoótica bovina |

| | | |
|-------|-----------|---|
| XVI | MM | Linfonodo supra mamário |
| XVII | NA | Não se aplica |
| XVIII | R\$ | Real |
| XIX | RDW-cv | Red Cell Distribution Width covariância |
| XX | RDW-sd | Red Cell Distribution Width desvio padrão |
| XXI | Retro-LAB | Laboratório de Retrovírus da Escola de Veterinária Da Universidade Federal de Minas Gerais |
| XXII | RLP | Relação plaquetas linfócitos |
| XXIII | TECPAR | do Instituto Tecnológico do Paraná |
| XXIV | TMR | Total mix ratio |
| XXV | UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| XXVI | US\$ | Dólares |
| XXVII | VCM | Volume corpuscular médio |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução..... | 15 |
| 2. Revisão de literatura | 19 |
| 2.1. Vírus da Leucose enzoótica bovina (BLV):..... | 20 |
| 2.2. Leucose enzoótica bovina (BLV) | 22 |
| 2.3. Impactos da Leucose enzoótica bovina no rebanho bovino..... | 25 |
| 2.4. Leucose enzoótica bovina e seu impacto na saúde pública | 27 |
| 2.5. Fatores de risco para transmissão de Leucose enzoótica bovina: | 29 |
| 2.6. Linfonodos e sua importância na Leucose Enzoótica Bovina | 33 |
| 3. Material e Métodos:..... | 34 |
| 3.1. Características do rebanho..... | 34 |
| 3.2. Coletas de sangue..... | 35 |
| 3.3. Imunodifusão em gel de agar (IDGA): | 35 |
| 3.4. Hemograma:..... | 35 |
| 3.5. Análise estatística..... | 36 |
| 3.6. Escore de exame físico dos linfonodos palpáveis:..... | 36 |
| 3.7. Inspeção da propriedade | 36 |
| 4. Resultados:..... | 40 |
| 4.1. Frequência de animais soropositivos para leucose enzoótica bovina pela técnica de IDGA e a distribuição por faixa etária..... | 40 |
| 4.2. Exame físico dos linfonodos palpáveis e sorologia para Leucose Enzoótica bovina | 43 |
| 4.4. Análises Clínicas: | 46 |
| 4.5. Inspeção da propriedade: sobre aspectos gerais de manejos gerais | |

| | |
|---|-----------|
| do rebanho e de aspectos de saúde | 47 |
| 5. Discussão | 51 |
| 5.1. Frequência de animais soropositivos para leucose enzoótica bovina pela técnica de IDGA e a distribuição por faixa etária..... | 51 |
| 5.2. Índices zootécnicos das vacas e suas relações com a sorologia para Leucose Enzoótica Bovina | 54 |
| 5.3. Exame físico dos linfonodos palpáveis e sorologia para Leucose Enzoótica bovina | 55 |
| 5.4. Análises Clínicas em relação a sorologia para Leucose Enzoótica bovina | 56 |
| 6. Considerações finais: | 60 |
| 7. Conclusões | 61 |
| Referências..... | 62 |

1. Introdução

Algumas doenças, devido ao seu impacto na saúde pública ou na economia, necessitam de programas nacionais de controle e erradicação. No Brasil, exemplos dessas doenças incluem a Tuberculose, Brucelose, Febre Aftosa e Encefalopatia Espongiforme Bovina. A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) também possui esse mesmo padrão de controle em alguns países, como na Inglaterra, Finlândia e Dinamarca, onde já foi erradicada. Já nos Estados Unidos, há um plano de controle da doença em vigor.(KUCZEWSKI; ORSEL; BARKEMA; MASON; ERSKINE; VAN DER MEER, 2021).

No Brasil, ainda não existem planos de controle ou erradicação da LEB e ela circula de forma descontrolada. Acredita-se que a prevalência de rebanhos infectados no país seja alta, porém não há referências atualizadas com estudos epidemiológicos consideráveis que sustentem essa afirmação.(TOSTES, 2005)

Os impactos causados pela Leucose nos rebanhos são variados. Cerca de 30% dos animais infectados com o BLV apresentam linfocitose persistente. Segundo Da et al. (1993), animais com linfocitose persistente apresentam queda na produção de leite de até 10% quando comparados a animais saudáveis. Outro impacto se dá na longevidade dos animais positivos, tanto no gado de corte quanto no gado leiteiro. Um estudo realizado com 91 fazendas leiteiras nos EUA avaliou rebanhos positivos para leucose durante 29 meses e durante o período do experimento, os animais LEB positivos tiveram 30% maior chance de serem descartados ou de morrerem. (NEKOU EI *et al.*, 2016).



Figura 1 Vacas em lactação no compost barn, realizada na primeira visita a fazenda.

No ano de 2021, a equipe de Clínica de Ruminantes da Escola de Veterinária da UFMG realizou uma visita a uma fazenda de gado leiteiro localizada no município de Coromandel MG-BR. A fazenda possuía cerca de 300 animais e o proprietário relatou uma mortalidade alta nos animais adultos que ocorria há alguns meses. Os animais da fazenda eram da raça holandesa e eram mantidos em um sistema de confinamento em compost barn. Durante a visita, foi observado que a cama estava um pouco úmida e que a dieta apresentava baixa quantidade de fibra efetiva.

Ao chegar na fazenda, foi encontrado um animal já morto e uma necropsia foi realizada imediatamente. Durante a necropsia, foram identificadas massas brancacentas nos linfonodos, baço e fígado, com características semelhantes ao linfossarcoma, que estavam presentes de maneira generalizada. O diagnóstico presuntivo foi de Leucose enzoótica bovina. O material foi coletado e posteriormente submetido a Reação em cadeia de polimerases (PCR) para BLV e vírus da

imunodeficiência bovina BIV, sendo ambos positivos para os dois vírus, e o sarcoma foi confirmado pela histologia.



Figura 2 Vaca necropsiada com quadro clínico de Leucose enzoótica bovina. a: tumoração retirada do abdômen. b: vaca em estação. c: massas tumorais distribuídas por todo o peritônio

O proprietário relatou que haviam dois animais com um quadro semelhante aos animais que haviam morrido anteriormente. Segundo ele, os animais enfraqueciam vagarosamente e morriam após meses. Quando submetidos ao exame clínico, foi observado um aumento generalizado de linfonodos e presença de nódulos abdominais na palpação retal (figura 2 b). Esses quadros clínicos motivaram uma solicitação ao proprietário para que trouxesse ao tronco de contenção animais aparentemente saudáveis para uma avaliação geral. Logo no primeiro animal que entrou no tronco para ser contido, podia se observar o aumento do linfonodo cervical superficial esquerdo antes mesmo da palpação (figura 3), dado o aumento do mesmo.

Diante deste tornou-se necessário compreender melhor como a Leucose enzoótica bovina circulava na fazenda, e como abordar a doença em um sistema de

produção brasileiro. Dado a importância da LEB nos rebanhos, esta dissertação tem como objetivo compreender a circulação e o impacto da doença em uma fazenda leiteira do município de Coromandel, em Minas Gerais, Brasil, assim como os principais fatores de risco envolvidos na sua disseminação e manutenção na fazenda.



Figura 3 Vaca da raça holandesa diagnosticada com leucose enzoótica bovina. O círculo mostra o linfonodo Cervical superficial aumentado.

2. Revisão de literatura

A partir do início da busca por artigos sobre o tema, observou-se uma alta prevalência de artigos antigos da década de 1990. Com o intuito de verificar se essa observação era verdadeira, foram avaliadas as 1000 referências mais relevantes sobre o tema. Pode-se constatar que o maior número de publicações ocorreu no ano de 1990 e que as décadas de 1990 e 1980 foram as décadas com maior número de publicações relevantes sobre o tema. Nos anos seguintes, houve uma redução no número de publicações relevantes que se manteve até os dias atuais (Figura 4). A Leucose no Brasil é pouco discutida e, em comparação a outros temas, há poucos grupos de pesquisa dedicados ao assunto.

figura 4: Número de publicações relevantes com o tema Leucose enzoótica bovina do ano de 1980 a janeiro de 2023

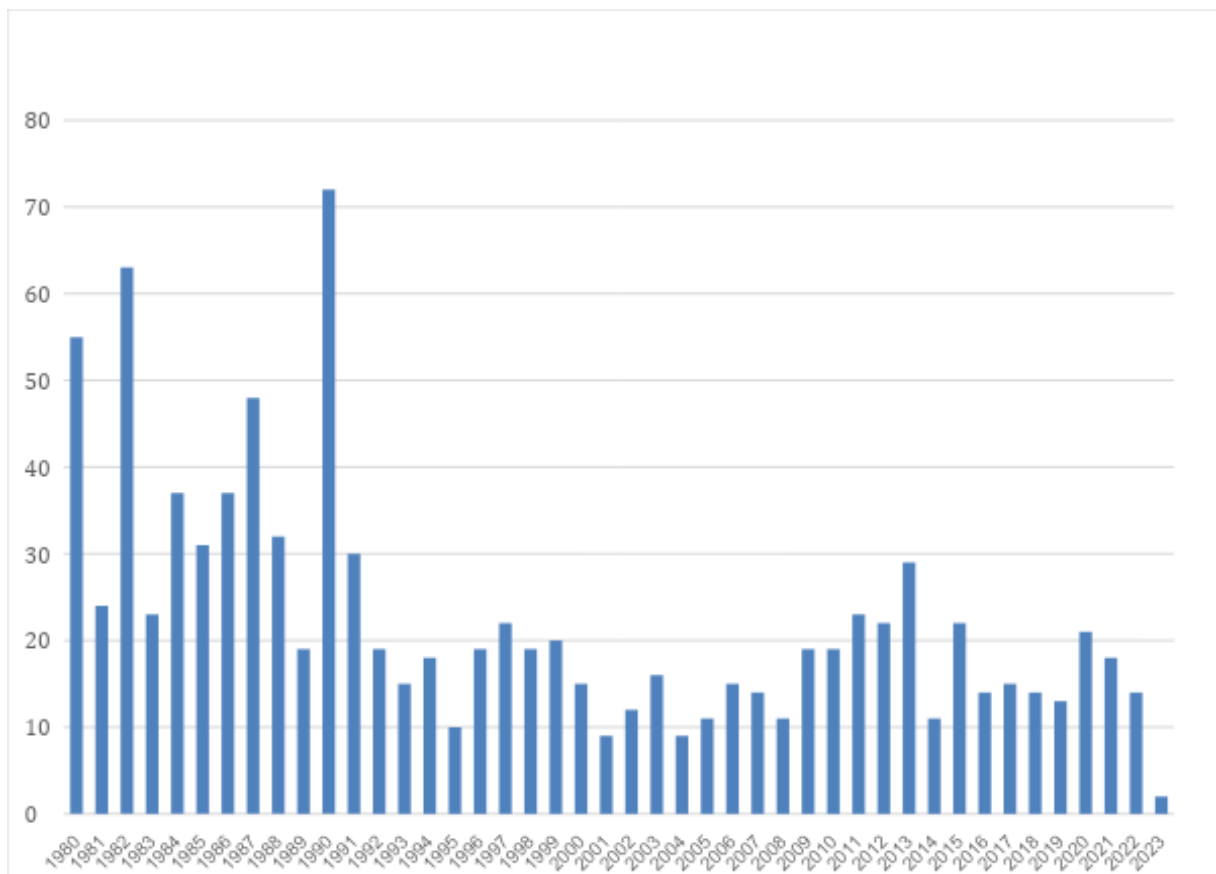


Figura 4 Ano das 1000 publicações mais relevantes levando em consideração o número de citações, relevância da revista publicada, e o índice de relevância do autor principal, utilizando os dados do software "Publish or Perish" de 20/02/2023.

2.1. Vírus da Leucose enzoótica bovina (BLV):

O vírus da leucose bovina (BLV) é um agente infeccioso que pode causar diversos distúrbios em bovinos, incluindo linfomas e outras doenças benignas. Embora a infecção pelo BLV seja comum em rebanhos leiteiros no Brasil e em todo o mundo, a maioria dos animais infectados não apresenta sinais clínicos de doença. No entanto, cerca de 30% dos animais infectados com o BLV desenvolvem linfocitose persistente, uma condição em que há uma expansão policlonal de células B CD5 + não malignas. Em alguns casos, o BLV pode progredir para o estágio de linfossarcoma de células B malignas, mas apenas em cerca de 1-5% dos casos.

O BLV é um retrovírus tipo C que é geneticamente semelhante aos vírus de leucemia/linfoma de células T humanos e símios. Ele pertence ao gênero Deltaretrovirus e compartilha um ancestral comum com outros vírus desse grupo. Embora as sequências do gene do BLV de isolados de diferentes origens sejam altamente conservadas, pequenas alterações nessas sequências podem afetar a infectividade e/ou patogenicidade do vírus. Variantes do BLV foram encontradas em diferentes regiões geográficas (CAMARGOS et al., 2007).

Ao redor do mundo, os impactos na produção bovina têm levado à busca de um melhor entendimento do BLV. O vírus tem predileção pelos linfócitos B, o que causa uma disfunção imune nos bovinos, reduzindo a intensidade de partes importantes da resposta e desencadeando maiores casos de doenças infecciosas, redução na produção tanto de leite quanto de carne, falhas na vacinação, maiores índices de mortalidade e descarte involuntário. Cerca de 25 a 30% dos animais que possuem o vírus apresentam um quadro de leucemia, no qual produzem uma grande quantidade de linfócitos, levando a uma linfocitose persistente, e uma parte dos animais desenvolve um linfossarcoma generalizado, afetando principalmente os órgãos linfóides como baço e linfonodos. As massas costumam se alojar no

abdômen e tórax e na necropsia é possível observar massas brancacentas de característica fibrosa. (PEEK; DIVERS, 2018)

Apesar das fortes evidências de sinalização e funcionamento imune anormal, poucas pesquisas investigaram os efeitos em larga escala da infecção pelo BLV na imunidade do hospedeiro e na resistência a outras doenças infecciosas. Frie et. al 2018 investigou possíveis mecanismos pelos quais o BLV poderia interferir na produção de IgM em bovinos naturalmente infectados. Os resultados sugerem uma possível via transcricional pela qual o BLV interfere na produção de IgM em bovinos naturalmente infectados. As vacas LEB+ apresentaram menor IgM plasmática total e menor expressão dos genes que produzem esta resposta (FRIE *et al.*, 2018).

Com o objetivo de investigar se bovinos sadios e infectados pelo BLV provocam respostas humorais semelhantes após a imunização contra a febre aftosa, realizou-se um estudo de campo com 35 novilhas holandesas, selecionadas com base em seu status sorológico para BLV. Foram imunizadas com uma única dose de uma vacina comercial para febre aftosa. O IgG foi significativamente menor em novilhas infectadas com BLV ($p < 0,01$). E foi possível concluir que bovinos infectados com BLV obtêm uma resposta sorológica de baixa magnitude desafiados com uma vacina comercial contra a febre aftosa. (PUENTES *et al.*, 2016)

Buscando entender a resposta a vacinações vacas adultas em lactação, tanto aquelas com resultados negativos quanto positivos para a Leucose Enzoótica Bovina (LEB), foram vacinadas com Bovi-Shield GOLD® e tiveram sua resposta imunológica à vacina medida durante um período de 28 dias. O plasma foi coletado para medir os títulos de IgM, IgG1 e IgG2 produzidos contra o herpes vírus bovino 1 (BHV 1), *Leptospira*, bem como para caracterizar os títulos de anticorpos neutralizantes produzidos contra BHV 1 e os vírus da diarreia viral bovina tipos 1 e 2. As vacas LEB+ produziram títulos significativamente mais baixos de IgM contra BHV1, *L. hardjo* e *L. pomona*, além de apresentarem títulos mais baixos de IgG2 contra BHV1. Finalmente, células B de vacas LEB+ exibiram maior expressão de CD25 e redução da expressão de MHCII em resposta à estimulação *in vitro*. Todos os dados deste

estudo sustentam a hipótese de que vacas LEB+ falham em responder à vacinação tão fortemente quanto vacas LEB-, e conseqüentemente, podem ter imunidade protetora reduzida quando comparadas a vacas saudáveis. (FRIE *et al.*, 2016).

2.2. Leucose enzoótica bovina (BLV)

A LEB foi descrita pela primeira vez no Brasil por Rangel e Machado em 1943, e desde então, a doença tem sido relatada em todas as regiões do país. Os rebanhos positivos podem apresentar de 60 a 90% dos animais com sorologia positiva. Os fatores de risco envolvidos na transmissão da LEB estão amplamente distribuídos no país e o trânsito de animais favorece a disseminação da doença. O que explica a distribuição de relatos da LEB em todos os estados. As prevalências variam consideravelmente de região para região e muitos pecuaristas desconhecem a realidade das próprias fazendas. (PEREIRA *et al.*, 2013) (TOSTES, 2005).

A Instrução Normativa Nº 50, DE 24 DE SETEMBRO DE 2013 do Ministério de Agricultura e Pecuária (MAPA), instrui a necessidade de notificação de uma doença por médico veterinário ou profissional da área. Caracteriza a LEB na qualidade de “Doenças que requerem notificação mensal de qualquer caso confirmado” diferente da brucelose e tuberculose que são de notificação imediata em casos positivos. Não é da rotina do médico veterinário brasileiro reportar um caso positivo de LEB e não existe obrigatoriedade real quanto a notificação faltando-se dados oficiais sobre a doença.

Podemos dividir a transmissão dentro de um rebanho em vertical e horizontal, e o BLV possui vias em ambas as maneiras de transmissão. A transmissão vertical ocorre quando a vaca passa a doença ao seu bezerro, e no caso da BLV, essa infecção pode ocorrer via transplacentária via colostro e leite, embora ainda haja controvérsias sobre o assunto. A transmissão horizontal ocorre entre os animais do rebanho sem vínculos parentais, e o BLV possui diversos meios de transmissão

possíveis. Quaisquer quantidades de sangue podem significar transmissão do agente, como compartilhamento de agulhas, luvas de palpação, coito e moscas hematófagas. Além disso, o BLV pode ser encontrado na saliva, muco e secreções, tendo importância no contato de animais sadios e doentes. (GUTIÉRREZ, GERÓNIMO *et al.*, 2014) (JULIARENA *et al.*, 2016)

No Brasil, os bovinos positivos para LEB passam por uma situação incomum. A falha no diagnóstico e o desconhecimento da LEB por parte dos veterinários e proprietários levam a doença a circular livremente entre os rebanhos, havendo total descaso em relação à doença. Não existe tratamento específico para LEB. No entanto, medidas preventivas devem ser tomadas para que a transmissão intrarebanhos e interrebanhos diminua (TOSTES, 2005).

Os métodos de controle e erradicação da LEB envolvem o acompanhamento sorológico dos animais do rebanho e, em muitos países, opta-se pela eliminação dos animais positivos, uma vez que não há tratamento específico para a doença. No entanto, em países onde a prevalência nos rebanhos é alta, como nos Estados Unidos, eliminar os animais positivos é inviável, pois representaria eliminar a maioria dos animais do rebanho. Estratégias como a identificação e segregação dos animais doentes podem ser utilizadas e há diversos trabalhos que demonstram a redução da prevalência da doença quando se combinam técnicas de biossegurança associadas à redução dos fatores de risco para a transmissão da doença. (KUCZEWSKI *et al.*, 2019)

Não se tem estudos atuais que contemplem de forma epidemiológica a prevalência de leucose no Brasil. Os trabalhos realizados são estudos transversais de uma pequena região ou de poucas propriedades. Considerando essas lacunas, acredita-se que a prevalência nos rebanhos leiteiros seja alta e que diversos fatores de risco estão presentes nas propriedades que facilitam a transmissão da doença. Após um inquérito sorológico na região do triângulo mineiro no qual foram avaliadas fêmeas leiteiras acima de 24 meses, encontrou-se uma prevalência de 19% de animais positivos na imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para LEB. Concluindo que

a doença está circulando na região, mas em uma prevalência mais baixa que a média no restante do país, os proprietários não tinham conhecimento sobre a doença e os fatores de risco para a LEB estão presentes nas propriedades estudadas (MACÊDO, 2013).

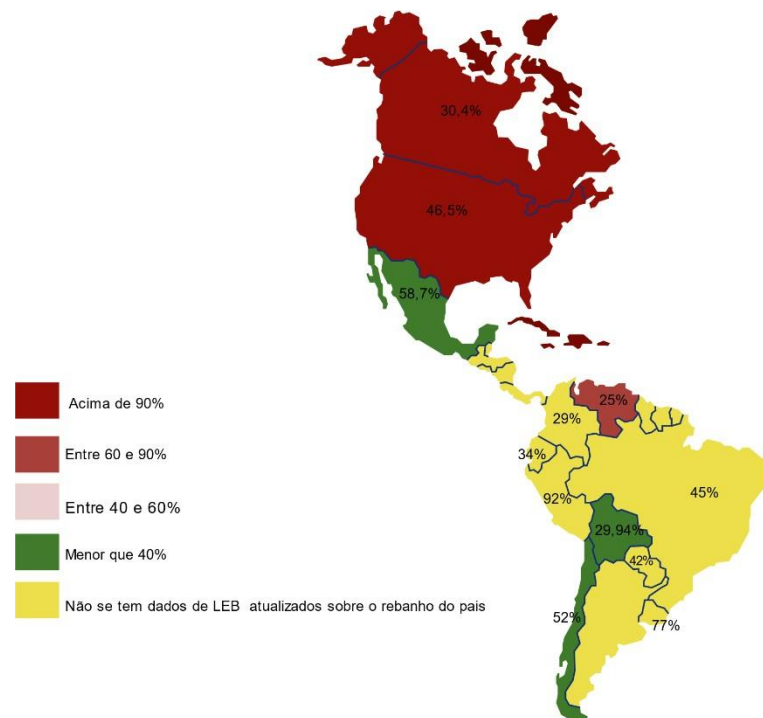
Na Paraíba, um estudo epidemiológico foi realizado a fim de entender a prevalência da LEB nos rebanhos, foram realizados 2.067 IDGAs de bovinos de 400 rebanhos distribuídos em todas as microrregiões do estado. A prevalência considerando os rebanhos positivos foi de 23.4 % e quando avaliados os animais positivos foi encontrada a prevalência de 10.8 %. Um achado interessante é que a doença está bem distribuída no estado não tendo diferença de distribuição entre as microrregiões (RAMALHO, 2020). Um estudo semelhante foi realizado nos estados de Rondônia e Acre, encontrou-se como prevalência de animais positivos 23% em Rondônia e 9,7% no Acre.(GUTIÉRREZ, SILVINA ELENA *et al.*, 2020)

Bovinos de corte podem ter uma menor prevalência da doença. Um estudo realizado por Piovesan 2021 encontrou uma soroprevalência de 0,26 % de LEB em animais machos, originários de diversas regiões do Rio Grande do Sul. Foram testados 109.327 bovinos machos de raças europeias com até 24 meses de idade que iriam ser encaminhados para exportação. Concluiu-se com este estudo que a prevalência era menor comparado aos estudos em bovinos leiteiros na mesma região (PIOVESAN, 2021).

Um estudo realizado em 6 províncias da China avaliou a prevalência de LEB via ELISA e encontrou 49,1% do gado leiteiro (964/1.963) e 1,6% do gado de corte (22/1.390) positivas para LEB (YANG *et al.*, 2016). A prevalência de LEB ao redor do mundo varia muito, os Estados Unidos (94,2%) e Canadá (90,8%) possuem uma alta prevalência de fazendas positivas, assim como vários outros países americanos, como Venezuela (60,8%), Peru (92,5%) (figura 5). Os programas de controle de LEB nas Américas são recentes ou não existem e os rebanhos possuem uma alta prevalência da doença o que dificulta o seu controle. Alguns países europeus já são considerados livres de LEB como é o caso da Finlândia e Inglaterra e possuem

planos de controle consolidados e eficientes, as prevalências nas fazendas eram baixas o que facilitou a erradicação da doença a partir do descarte de animais positivos. (GUTIÉRREZ, SILVINA ELENA *et al.*, 2020)

Figura 5: Prevalências nacionais e dos rebanhos dos países do continente americano de Leucose enzoótica bovina



*Figura 5 As cores representam a prevalência nacional de rebanhos positivos e as porcentagens representam a prevalência média de animais positivos nos rebanhos dos países do continente americano. Adaptado e traduzido de GUTIÉRREZ, SILVINA ELENA *et al.*, (2020)*

2.3. Impactos da Leucose enzoótica bovina no rebanho bovino:

A LEB está presente em grande parte dos rebanhos de bovinos brasileiros, porém, somente uma parcela dos animais positivos 3 a 5% apresentaram o quadro clínico de linfoma ou linfossarcoma generalizado. A Leucose é uma doença viral que afeta principalmente linfócitos B, assim o principal impacto relacionado à doença está

em uma disfunção do sistema imune. A LEB causa alterações que impactam a produção do animal levando a redução da produção de leite e a redução do ganho de peso nos animais positivos.

A falha na imunidade tem impacto real na saúde dos animais positivos para LEB. Após uma avaliação de 854 vacas leiteiras mestiças clinicamente saudáveis, em diferentes fases de lactação, foi possível observar uma associação positiva entre o vírus LEB e a presença de mastite subclínica ($P < 0,05$, OR = 1,41, IC = 1,07-1,86). O estudo foi realizado em fazendas localizadas em 12 municípios do sul do Espírito Santo, Brasil. A soro prevalência de LEB foi determinada por IDGA e a mastite subclínica pelo CMT. A prevalência de LEB e mastite subclínica foi de 56,79% e 43,55%, respectivamente. (DE ALMEIDA *et al.*, 2021)

Os impactos na saúde decorrem em menores produções e consequentemente impactos econômicos. Em um estudo detalhado de 105 vacas na China avaliou a soropositividade dos animais para LEB via Elisa. As vacas BLV-positivas tiveram a produção de leite significativamente menor no início (26,8 vs. 30,9 kg) e no meio da lactação (22,2 vs. 26,1 kg) e também tiveram CCS significativamente maior na lactação (início = 5,2 vs. 4,3; meio = 4,9 vs. 3,9) (YANG *et al.*, 2016).

No Canadá, uma avaliação também buscou entender se animais positivos para LEB produziram menos leite, mas de uma perspectiva diferente, observando quanto de leite os animais produziram durante toda a vida produtiva, dado que os animais positivos vivem menos que os negativos ($p < 0,05$). No geral, 4.052 vacas de 348 rebanhos foram incluídas no estudo. As vacas positivas para LEB tiveram probabilidades consistentemente maiores de serem descartadas (ou morrer) do que as vacas negativas. Vacas infectadas apresentaram produção de leite durante a vida produtiva significativamente menor [-2.554 kg (-3.609 a -1.500) e -1.171 kg (-2.051 a -292), em comparação com as negativas. No geral, previu-se que as vacas com teste positivo produziram menos leite em comparação com as vacas com teste negativo durante a vida (NEKOU EI *et al.*, 2016).

O controle da leucose bovina pode ter impactos econômicos negativos a curto prazo na produção de leite, mas a redução da prevalência da doença traz retornos positivos a longo prazo para as propriedades que implementam medidas de controle. Um estudo realizado em Alberta, no Canadá, avaliou diferentes metodologias de controle em rebanhos ao longo de 10 anos. Cada estratégia de controle teve um custo anual específico e produziu uma redução anual na prevalência da doença, afetando a receita líquida anual. Vacas infectadas com leucose geraram uma receita líquida média anual parcial de \$7.641, enquanto vacas não infectadas geraram \$8.276. O custo médio das estratégias de controle variou de \$193 a \$847 por animal ao longo de 10 anos. Ao longo desse período, o ganho médio das estratégias de controle foi de \$1.315 por vaca, mostrando-se economicamente viável. (KUCZEWSKI *et al.*, 2019)

2.4. Leucose enzoótica bovina e seu impacto na saúde pública:

Muito se tem discutido sobre a possível relação entre a leucose bovina e o câncer de mama em mulheres. Nesse contexto, foi realizado um estudo que selecionou 2.710 amostras de câncer de mama, independentemente da idade, etnia ou município de origem dos indivíduos. Os resultados mostraram que o gene BLV estava presente em 26,8% (728/2.710) das amostras de pacientes com câncer de mama e em 10% (10/80) das amostras sem câncer (controle negativo). Isso indica uma correlação significativa entre a presença do gene BLV e o câncer de mama (odds ratio = 0,3889; intervalo de confiança = 1,18; $p = 0,0029$). Portanto, os achados desse estudo sugerem que existe uma possível ligação entre o BLV e o carcinoma de mama humano. Vale ressaltar que outros fatores de risco também devem ser considerados para o desenvolvimento do câncer de mama, e mais pesquisas são necessárias para compreender melhor essa interação. (KHAN *et al.*, 2022)

Na busca de entender a relevância do BLV para humanos, estudo de caso-controle foi realizado utilizando tecidos de mama fixados em formalina de um arquivo de 239 doadores. Para determinar a exposição da mama ao BLV, foi realizada a

técnica de PCR. Foi observado que a frequência de DNA do BLV no epitélio mamário de mulheres com câncer de mama (59%) foi significativamente maior do que em controles normais (29%) (odds ratio ajustado multiplicado = 3,07, intervalo de confiança = 1,66–5,69, $p = 0,0004$, risco atribuível = 37%). Estes resultados indicam que a presença do DNA amplificado do BLV está significativamente associada ao câncer de mama. Além disso, a magnitude da razão de chances encontrada é comparável àquelas de fatores de risco bem estabelecidos relacionados à história reprodutiva para o câncer de mama. (BUEHRING *et al.*, 2015)

Uma possível teoria sobre a propagação do vírus em humanos é através do consumo de alimentos contaminados. Com esse objetivo, um estudo foi conduzido para detectar a presença de DNA do vírus da Leucose enzoótica bovina (BLV) em carne bovina e leite in natura destinados ao consumo humano, utilizando a técnica de PCR. Quase metade das amostras analisadas (49%) apresentaram DNA proviral positivo. Embora se saiba que o BLV é um vírus de RNA, a presença do DNA proviral nos alimentos sugere que essa forma de transmissão seja uma possibilidade. (OLAYA-GALÁN *et al.*, 2017)

2.5. Fatores de risco para transmissão de Leucose enzoótica bovina:

Dentro de um programa de controle entender os fatores de risco que aumentam as chances de transmissão da doença é importante para a eficácia do projeto, a análise de fatores de risco é sempre complexa pois envolve muitas variáveis o que impacta no resultado final, a interrelação entre os fatores de risco implica na necessidade de um n grande para que exista diferença estatística. No Japão 139 fazendas leiteiras foram testadas por ELISA para BLV a fim de encontrar os fatores de risco associados à transmissão de LEB. Neste estudo transversal, amostras de sangue foram coletadas de 30 vacas adultas selecionadas aleatoriamente em cada uma das fazendas. Informações sobre o manejo do rebanho foram coletadas por meio de um questionário. Uma análise de regressão mostrou relevante as seguintes características como fatores de risco ($p < 0,05$): sistema de freestall, descorna, moscas hematófagas (KOBAYASHI *et al.*, 2010).

Um estudo realizado na Colômbia também identificou fatores de risco para LEB, como animais confinados e o uso ou não de IATF. A pesquisa concluiu que é crucial determinar a prevalência do BLV no rebanho e identificar os fatores de risco associados para desenvolver programas eficientes de controle e erradicação do BLV nos rebanhos. Além disso, a compra de animais com perfil sanitário desconhecido é outro fator de risco significativo que deve ser levado em consideração (NEKOU EI et al., 2015).

Tabela 1: Fatores de riscos para a transmissão de Leucose enzoótica bovina e sua publicações relacionadas, traduzido de KUCZEWSKI; ORSEL; BARKEMA; MASON ERSKINE; MEER, (2021)

| Fator de risco | Resumo dos achados | Referências |
|--|---|--|
| Transmissão horizontal | | |
| Contato entre animais positivos e negativos | Secreções nasais, saliva: BLV detectado inconsistentemente Aumento do risco de infecção por BLV se animais não infectados foram alojados ao lado de animais infectados em baias. | Kobayashi et al., 2015; Yuan et al., 2015 |

Tabela 1: Fatores de riscos para a transmissão de Leucose enzoótica bovina e suas publicações relacionadas, traduzido de KUCZEWSKI; ORSEL; BARKEMA; MASON ERSKINE; MEER, (2021)

| Fator de risco | Resumo dos achados | Referências |
|--|--|----------------|
| Vacinação, injeção, punção de veia | <p>Transmissão altamente eficiente por inoculação com sangue infectado: transmissão de 1 µL de sangue causa infecção (subcutânea, intradérmica, intramuscular, intravenosa)</p> <p>A infecciosidade depende do número de linfócitos no sangue; animais com linfocitose são infectantes em doses mais baixas de linfócitos do que animais com contagem normal de linfócitos</p> <p>Injeções intravenosas e punção venosa provavelmente apresentam maior risco do que injeções subcutâneas, intradérmicas e intramusculares</p> <p>Alto risco de transmissão material de descorna sem limpeza entre bezerras</p> | Ruggiero, 2019 |
| Descorna, cirurgias, tatuagem brincadeira | Sem estudos que revelem evidências | - |
| Palpação transretal | <p>Resultados controversos: risco de transmissão dependente das circunstâncias; transmissão experimental por inoculação de sangue ou luvas visivelmente contaminadas com sangue é possível; Animais com linfocitose podem ter maior risco de transmissão do que animais a leucêmicos; aumento da frequência e vigor das palpações aumentam o risco de transmissão. É possível transmissão experimental com sangue visível</p> | Ruggiero, 2019 |

Tabela 1: Fatores de riscos para a transmissão de Leucose enzoótica bovina e suas publicações relacionadas, traduzido de KUCZEWSKI; ORSEL; BARKEMA; MASON ERSKINE; MEER, (2021)

| Fator de risco | Resumo dos achados | Referências |
|--------------------------------|---|--|
| Insetos artrópodes | <p>Resultados controversos: transmissão dose-dependente do BLV via inoculação de partes de insetos; transmissão dependente do estado de linfocitose de animais BLV-positivos; quanto mais naturais as condições experimentais, menos transmissão pode ser comprovada</p> <p>Associação controversa entre estação (correlacionada com populações de insetos) e incidência</p> | <p>Choi et al., 2002; Asadpour and Jafari, 2012; Erskine et al., 2012b; Khamesipour et al., 2013; Mekata et al., 2018; Benitez et al., 2019a,b</p> |
| Transmissão vertical | | |
| Colostro | <p>Detecção de BLV no colostro e leite de vacas BLV positivas; transmissão possível para leite e colostro; Idade do bezerro pode ter efeito protetor Efeito protetor dos anticorpos do colostro</p> <p>Possível efeito protetor do colostro de mães BLV-positivas; A transmissão do BLV através do colostro e do leite é possível (0–100%).</p> | <p>Fukai et al., 1999; Meas et al., 2002; Mekata et al., 2015; Sajiki et al., 2017</p> |
| Intraútero e Peri parto | <p>0,5–18% dos bezerros de mães infectadas nascidas com BLV positivo, são positivos.</p> <p>Animais a leucêmicos têm pequeno risco de transmissão, animais com linfocitose têm risco aumentado de transmissão,</p> <p>A transmissão in útero de BLV é possível (0-40% dos bezerros para mães positivas infectadas)</p> <p>Animais com alta carga proviral têm maior risco de transmissão vertical do BLV.</p> | <p>Meas et al., 2002; Nagy et al., 2007; Kanno et al., 2014; Ruiz et al., 2018</p> |

2.6. Linfonodos e sua importância na Leucose Enzoótica Bovina:

A principal função dos linfonodos é facilitar as interações entre as células apresentadoras de antígenos e as células T e B sensíveis ao antígeno. Cada célula deve ser guiada para seus contatos apropriados com grande precisão. Uma mistura complexa de quimiocinas dirige essas células. Assim, as quimiocinas conduzem a migração de linfócitos e células do sistema imune inato para o linfonodo. Os linfonodos também contêm células linfóides inatas que estão localizadas perto de macrófagos sentinelas que revestem os seios linfáticos. Eles, portanto, são expostos a citocinas, como a IL-18, que são liberadas quando os macrófagos encontram invasores. Os linfócitos inatos, por sua vez, aumentam rapidamente a secreção de IFN- γ que ativa ainda mais os macrófagos e aumenta suas atividades antimicrobianas. Uma característica interessante dos órgãos linfóides secundários é o fato de que ambas as células B e T serem altamente ativas e móveis (TIZARD, 2019). A LEB em seus quadros clínicos leva a um aumento nos linfonodos de forma generalizada, a predileção do BLV por linfócitos B leva a os linfonodos terem relevância na doença devido este órgão possuir grande quantidade de linfócitos B em seu córtex (PEEK; DIVERS, 2018).



Figura 6 Vaca da raça holandesa diagnosticada com leucose enzoótica bovina, podemos observar o linfonodo cervical superficial aumentado quando palpado segundo a técnica descrita por DIRKSEN, (1993).

Para estabelecer um índice de diagnóstico para LEB, o estudo realizado por SOMURA et al., 2014 avaliou 149 bovinos após o abate, divididos em dois grupos. O primeiro grupo (n=102) era composto por bovinos positivos no ELISA para BLV, mas saudáveis, enquanto o segundo grupo (n=37) também era positivo no ELISA para BLV, mas diagnosticado com LEB por exame patológico. Foram examinadas as cópias provirais do BLV em sangue total, linfonodos e baço por PCR quantitativo em tempo real. Observou-se que o número de cópias de BLV nos espécimes do segundo grupo foi significativamente maior do que o do primeiro grupo ($p < 0,0001$), especialmente nos gânglios linfáticos. Mais de 70% dos linfonodos cervicais superficiais, ilíacos mediais e jejunais do segundo grupo apresentaram mais de 1.000 cópias/10 ng de DNA, enquanto os linfonodos do primeiro grupo não apresentaram. Esses achados sugerem que bovinos com mais de 1.000 cópias do BLV podem ser diagnosticados com quadro clínico de LEB. (SOMURA et al., 2014).

3. Material e Métodos:

3.1. Características do rebanho:

O experimento foi realizado em uma fazenda de gado leiteiro na zona rural da cidade de Coromandel MG, com o consentimento do proprietário da fazenda e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal **Protocolo CEUA: 136/2022** aprovado em 08/2022 de Minas Gerais (CEUA UFMG).

O rebanho da fazenda é composto por 283 bovinos da raça holandesa distribuídos em três categorias sendo 158 vacas, 105 novilhas e 20 bezerras. As vacas são instaladas em compost barn e tem acesso a água à vontade, 2 vezes ao dia recebem dieta completa (TMR) contendo silagem de milho, caroço de algodão, milho moído, farelo de soja, casquinha de soja e núcleo mineral. As bezerras ficam instaladas em gaiolas suspensas e recebem 3,5 litros de leite 2 vezes ao dia até completarem 60 dias de vida e depois recebem 2 litros até 90 dias onde são desmamadas. Tem acesso a água à vontade e a concentrado de milho e soja e após 45 dias de vida é introduzido volumoso à vontade (silagem de milho). As novilhas de recria ficam em piquetes divididas por idade e recebem suplementação no cocho com silagem de milho e concentrado contendo milho moído, farelo de soja e núcleo mineral. Para fins de análise os animais foram divididos em 3 categorias, bezerras de 0 a 12 meses, novilhas de 12 meses até o primeiro parto e vacas depois do primeiro parto.

3.2. Coletas de sangue:

Foram coletadas duas amostras de sangue de cada bovino da fazenda, uma amostra em tubo formador de coágulo para retirada de soro e uma amostra de sangue total em tubo com EDTA. O sangue foi coletado via punção da veia coccígea. As bezerras foram contidas manualmente e o sangue foi coletado por punção da veia jugular. Todas as coletas foram realizadas com prévia antissepsia com álcool 70° e algodão em tubos tipo vacutainer, com agulhas estéreis individuais.

O sangue foi acondicionado em isopor com gelo e transferido para geladeira na fazenda. Este material foi encaminhado para o laboratório de Retrovíroses da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.3. Imunodifusão em gel de agar (IDGA):

No Retro-lab as amostras nos tubos formadores de coágulo foram centrifugadas e o soro resultante dividido em alíquotas armazenadas em tubos tipo eppendorfs de 1,5 ml armazenados congelados a -20° C. Os tubos com EDTA foram centrifugados e foram separadas os papas de leucócitos com o auxílio de uma pipeta e armazenadas em eppendorfs de 1,5 ml congeladas a -20° C.

Para a detecção do anticorpo anti-BLV , foi utilizada a técnica de IDGA, seguindo instruções do kit comercial do Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR).

3.4. Hemograma:

O hemograma foi realizado em analisador hematológico da marca MAXcelVET®, e o volume globular foi determinado pela técnica de microcentrifugação. A proteína total foi calculada via refratômetro óptico e o fibrinogênio foi calculado a partir da diferença entre a proteína total e a proteína final do microcapilar aquecido a 56° C por 15 minutos. A relação Linfócito Plaqueta (RLP) foi calculada de acordo com a razão e metodologia descrita em ZHAO *et al.*, 2020.

3.5. Análise estatística:

O software utilizado para todas as análises e construção de gráficos foi o “R”. A maior parte do estudo foi analisado de forma descritiva avaliando as porcentagens de prevalência de LEB nas categorias. E para a comparação entre os grupos positivos e negativos foi utilizado teste T student para avaliar possíveis diferenças entre os grupos. Os escores e a diferença entre os grupos de RLP foram avaliados com o teste de Wilcoxon com ajuste de Bonferroni. Todas as análises consideraram o p-valor como 0,05 de significância.

3.6. Escore de exame físico dos linfonodos palpáveis:

Foram palpados os linfonodos retro escapular e supra mamário de todos os animais por um médico veterinário treinado de acordo com a metodologia descrita por DIRKSEN (1993). Foram adotados escores de 0 a 3 para caracterizar o tamanho dos linfonodos sendo 0 o linfonodo de tamanho fisiológico, 1 o linfonodo aumentado até 2x, 2 o linfonodo aumentado de 2 a 5x e 3 quando o estava aumentado mais de 5x.

3.7. Inspeção da propriedade:

Foi necessário realizar uma visita à propriedade e observar de forma direta as condições e práticas adotadas pelos responsáveis pela gestão e operação na fazenda. Buscando entender os seguintes pontos:

- 1) Formação do rebanho:
 - a) Quantos animais fazem parte do rebanho?
 - b) Qual a raça dos animais?

- c) Há quantos anos os animais estão na propriedade?
- d) Qual a origem dos animais?

2) Compra de animais:

- a) Com que frequência a fazenda adquire novos animais?
- b) Qual a procedência dos animais?
- c) Quais os critérios adotados para a seleção dos animais?

3) Exposição de animais:

- a) A fazenda leva seus animais para exposições?
- b) Com que frequência?

4) Funcionários:

- a) Quantos funcionários a fazenda possui atualmente?
- b) Quais as funções de cada funcionário?
- c) Há treinamento ou capacitação dos funcionários para a realização de suas atividades?

5) Alojamento dos animais:

- a) Qual o sistema utilizado para o alojamento dos animais?
- b) Como é feita a limpeza e manutenção das instalações?

6) Assistência veterinária e zootécnica:

- a) A fazenda conta com assistência veterinária e zootécnica?
- b) Com que frequência ocorrem as visitas?
- c) Qual a finalidade das visitas?

7) Fatores de risco para transmissão do BLV:

- a) Quais os principais fatores de risco que afetam o rebanho?
- b) Como a fazenda tem lidado com esses riscos?
- c) Existe compartilhamento de seringas ou agulhas na fazenda?
- d) Existe compartilhamento de luvas?

8) Vacinação:

- a) O rebanho é vacinado?
- b) Quais as doenças contempladas no calendário vacinal?

9) Uso de medicamentos:

- a) A fazenda faz uso de medicamentos regularmente no rebanho?
- b) Quais os medicamentos utilizados e qual a finalidade?

10) Ordenha:

- a) A fazenda faz uso de ocitocina durante a ordenha?
- b) Como é feita a higiene do equipamento de ordenha?

11) Controle de parasitas:

- a) A fazenda adota algum controle de moscas e carrapatos?
- b) Qual a intensidade do problema com moscas e carrapatos na propriedade?

12) Reprodução:

- a) A reprodução na propriedade tem uso de monta natural?
- b) A fazenda faz uso de IATF?
- c) Quando ocorre o início da IATF nas novilhas?
- d) Há quanto tempo não se usa touro na fazenda?

- e) Foi feito algum tipo de teste de saúde e andrológico dos touros?
- f) Controle reprodutivo:
- g) Como é feito o controle reprodutivo na fazenda?
Quais os métodos adotados

4. Resultados:

4.1. Frequência de animais soropositivos para leucose enzoótica bovina pela técnica de IDGA e a distribuição por faixa etária

Foram coletadas 282 amostras de sangue e realizado o IDGA para LEB. A frequência de animais positivos foi de 65,93% (n=185) sendo 145 vacas, 26 novilhas e 14 bezerras (Figura 7). Quando é feita a segregação por categoria observamos uma maior frequência nas vacas (86,96%) seguido pelas novilhas (35,82%) e uma menor frequência nas bezerras (33,33%). Existe um aumento gradual da prevalência por categoria que pode ser observado na tabela 1 e na figura 7.

Figura 7 Número de bovinos positivos e negativos na sorologia para LEB por categoria animal em uma fazenda leiteira de alta produção no município de Coromandel (MG)

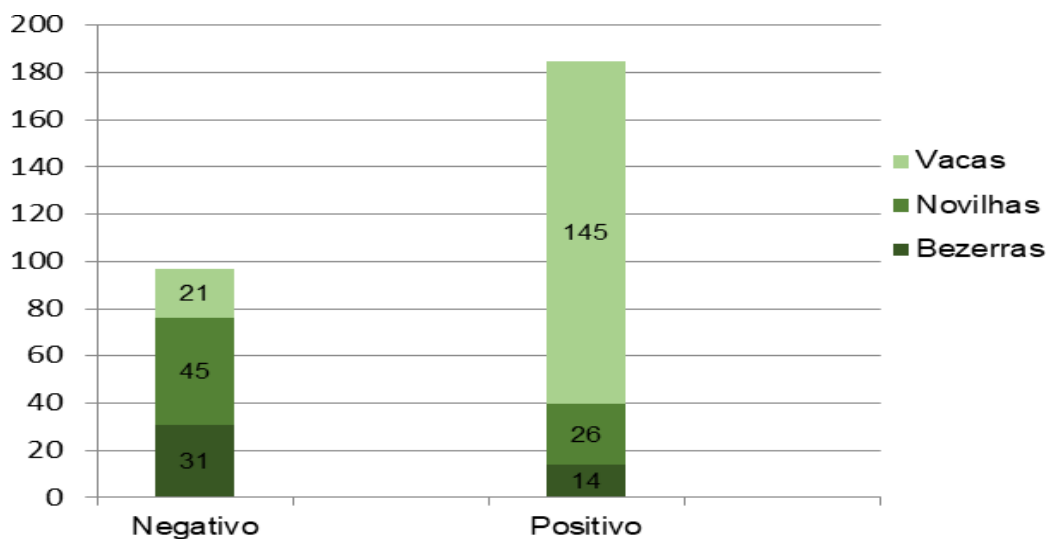
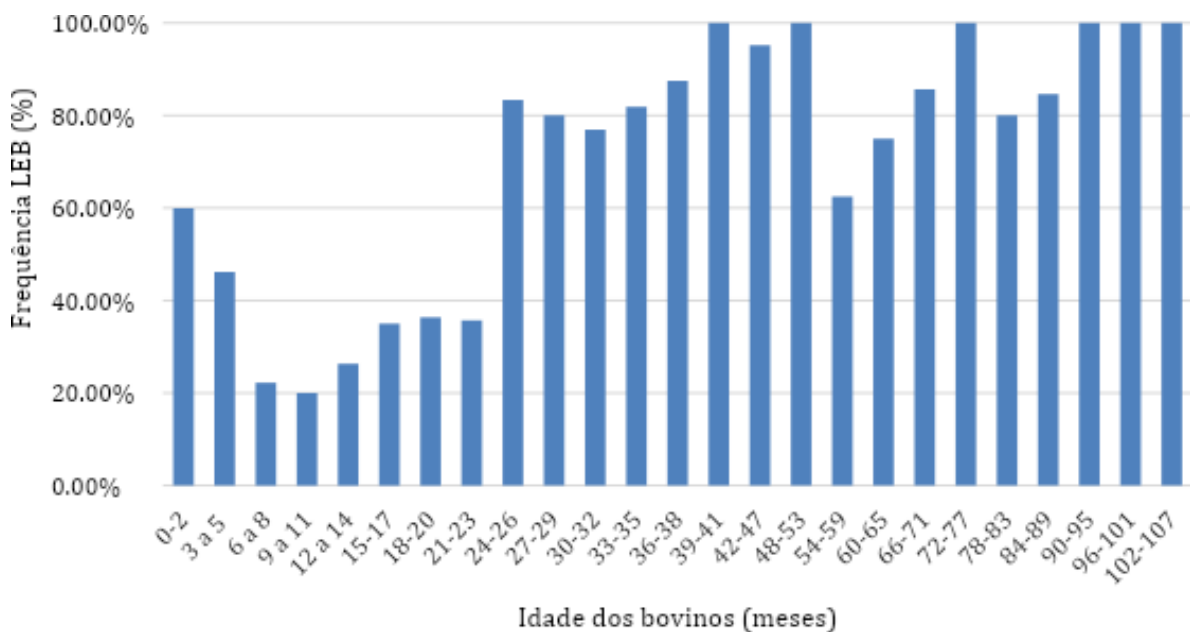


Figura 8 Frequência dos bovinos da raça holandês, com sorologia positiva (IDGA) para leucose enzoótica bovina, de acordo com a faixa etária, em uma fazenda comercial intensiva de produção de leite em Minas Gerais.



A frequência de animais com sorologia positiva para LEB é alta em bezerros de 0-2 meses (60%) e intermediária naqueles entre 3 a 5 meses de idade (46,15%). Esta frequência se mantém relativamente baixa nos bezerros entre 6 e 14 meses (variação de 20-26%) e apresenta pequena elevação a partir dos 15 meses e se mantém novamente estável até aos 23 meses (variação 35-36%). A partir de 24 meses a frequência de animais positivos para LEB se eleva, passando de 35,71% para 83,33% e se mantém alta nas vacas, chegando a 100% nos animais acima de 90 meses (Tabela 2).

A partir de 24 meses as prevalências aumentam drasticamente e se mantêm altas até os animais mais velhos. Uma observação interessante é o aumento de negativos de 2 a 12 meses, e após este marco fica clara a redução dos animais negativos. A média de idades dos animais positivos é maior quando comparada aos

animais negativos e a idade se mostra um fator importante para o animal ter ou não a doença na fazenda.

Tabela 2 Número de animais com sorologia positiva para Leucose Enzoótica bovina por faixa etária

| Idade em meses | Número de negativos (IDGA) | % | Número de Positivos (IDGA) | % | Total de animais |
|-----------------------|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|----------|-------------------------|
| 0-2 | 2 | 40,00% | 3 | 60,0% | 5 |
| 3-5 | 7 | 53,85% | 6 | 46,15% | 13 |
| 6-8 | 7 | 77,78% | 2 | 22,22% | 9 |
| 9-11 | 12 | 80,00% | 3 | 20,00% | 15 |
| 12-14 | 14 | 73,68% | 5 | 26,32% | 19 |
| 15-17 | 13 | 65,00% | 7 | 35,00% | 20 |
| 18-20 | 7 | 63,64% | 4 | 36,36% | 11 |
| 21-23 | 9 | 64,29% | 5 | 35,71% | 14 |
| 24-26 | 2 | 16,67% | 10 | 83,33% | 12 |
| 27-29 | 1 | 20,00% | 4 | 80,00% | 5 |
| 30-32 | 3 | 23,08% | 10 | 76,92% | 13 |
| 33-35 | 2 | 18,18% | 9 | 81,82% | 11 |
| 36-38 | 1 | 12,50% | 7 | 87,50% | 8 |
| 39-41 | | 0,00% | 9 | 100,00% | 9 |
| 42-47 | 1 | 4,76% | 20 | 95,24% | 21 |
| 48-53 | | 0,00% | 15 | 100,00% | 15 |
| 54-59 | 6 | 37,50% | 10 | 62,50% | 16 |
| 60-65 | 1 | 25,00% | 3 | 75,00% | 4 |

Tabela 2 Número de animais com sorologia positiva para Leucose Enzoótica bovina por faixa etária

| Idade em meses | Número de negativos (IDGA) | % | Número de Positivos (IDGA) | % | Total de animais |
|-----------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------------------------|---------------|-------------------------|
| 66-71 | 1 | 14,29% | 6 | 85,71% | 7 |
| 72-77 | | 0,00% | 19 | 100,00% | 19 |
| 78-83 | 1 | 20,00% | 4 | 80,00% | 5 |
| 84-89 | 2 | 15,38% | 11 | 84,62% | 13 |
| 90-95 | | 0,00% | 2 | 100,00% | 2 |
| 96-101 | | 0,00% | 2 | 100,00% | 2 |
| 102-107 | | 0,00% | 2 | 100,00% | 2 |
| Total | 92 | 34,07% | 178 | 65,93% | 270 |

4.2. Exame físico dos linfonodos palpáveis e sorologia para Leucose Enzoótica bovina.

Foram palpados os linfonodos cervicais superficiais (CS) e supramamários (MM) de todos os bovinos da fazenda. Quando comparamos os linfonodos dos animais positivos com os negativos para LEB, a média de escore dos linfonodos dos animais positivos foram mais altos, tanto nos linfonodos cervicais superficiais (CS) (escore médio= 2,416) ($p < 0,05$), quanto nos supramamários (MM) (escore médio= 1)($p < 0,05$) quando comparamos aos negativos (escore médio CS=0,83 e MM= 0,08) (tabela 3). Os escores de aumento de linfonodos, se mostraram significativamente

correlacionados aos animais positivos para LEB ($p < 0,001$) e quanto maior o score de aumento, maior a chance de o animal ser positivo para LEB.

A presença de linfonodos aumentados foi diferente entre as categorias analisadas. Apenas 17,5% das bezerras e 28,3% das novilhas ($p > 0,05$), apresentaram aumentos dos linfonodos cervicais superficiais. As vacas apresentaram uma maior frequência de alterações desses linfonodos (51,5%) do que as categorias anteriores ($p < 0,05$).

A frequência de aumento de linfonodos mamários (MM) das bezerras ($n=2$, 9,52%) e novilhas ($n=3$, 19,4%) também é semelhante ($p < 0,05$), porém a frequência nas vacas ($n=42$, 26,71%) é semelhante à das novilhas e diferente das bezerras ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação entre escores de tamanho de linfonodos cervicais superficiais (CS) e mamários (MM) entre bovinos positivos e negativos para Leucose Enzoótica Bovina pelo teste de IDGA em um rebanho holandês, confinado em compost barn.

| Característica | Média de animais Negativos (IDGA) | Média de animais Positivos (IDGA) |
|------------------------------------|--|--|
| IDADE em meses | 46,083 ^a | 59,227 ^b |
| Escore de palpação de linfonodo MM | 0,83 ^a | 2,416 ^b |
| Escore de palpação de linfonodo CS | 0,08 ^a | 1 ^b |

4.3. Índices zootécnicos das vacas e suas relações com a sorologia para Leucose Enzoótica bovina.

Os índices zootécnicos das vacas avaliadas foram produção de leite em 305 dias e intervalo entre partos. O número de animais negativos do grupo avaliado era de 12 vacas enquanto dos positivos era de 116, o que pode ter diminuído o poder de

comparação das análises realizadas. A produção de leite média das vacas negativas foi de 10.351 kg e 10.297 kg de leite para os positivos, uma diferença de apenas 54 kg de leite. Assim, não houve diferença estatística entre as produções ($p < 0,05$).

Foi avaliada também a produção de leite do grupo positivo no IDGA para LEB, comparando aos animais com linfonodos aumentados ou não. As vacas com leucose e com linfonodos mamários ou cervicais superficiais aumentados produziram menos leite do que aquelas com linfonodos normais (MM -87kg, CS: -202kg), porém esta diferença não foi significativa estatisticamente ($p > 0,05$) (tabela 4).

As médias para intervalos entre partos, foram de 403 dias para as vacas negativas e de 386 dias para os positivos e não houve diferença estatística ($p > 0,05$) (tabela 4).

Tabela 4 Características de produção média das vacas comparando animais positivos e negativos para LEB, e com linfonodos aumentados ou não em um rebanho holandês confinado em compost barn.

| | Vacas Negativas | Vacas Positivas | Total |
|--|------------------------|------------------------|--------------------|
| IDGA para LEB | 12 | 116 | 128 |
| Prevalência de LEB | 8,98% | 91,02% | 100,00% |
| Média de intervalo entre partos (meses) | 403 ^a | 386 ^a | 387 |
| Produção de leite média em 305d (kg) | 10351 ^a | 10297 ^a | 10302 |
| | Normal | Aumentado | Total |
| Produção de leite vs Aumentos de linfonodos CS | 10338,99 ^a | 10136,45 ^a | 10297 ^a |

Letras diferentes nas linhas representam diferenças estatísticas entre as médias utilizando teste t de student ($p < 0,05$).

4.4. Análises Clínicas:

A maioria dos resultados do hemograma dos 24 animais testados estão dentro dos parâmetros de normalidade, com exceção das contagens de leucócitos (positivos 16730 cel/ μ L, negativos 13302 cel/ μ L) e a de linfócitos (positivos 10,78 cel/ μ L, negativos 7869 cel/ μ L) de ambos os grupos que se encontram aumentadas (tab).

Comparando os grupos, diversos parâmetros diferem entre os animais positivos e negativos para LEB, podendo estar ou não dentro dos parâmetros para bovinos. O hematócrito, CHCM, RDW-sd, leucócitos, linfócitos e plaquetas diferiram dos grupos positivos para LEB e negativos, sendo somente o hematócrito mais baixo nos animais negativos, nos outros encontrou-se um aumento (tabela5). Os valores de proteína total, fibrinogênio, VCM, RDW-CV, contagem de hemácias, neutrófilos, eosinófilos e monócitos não apresentaram diferenças entre os grupos (tabela 5).

Tabela 5: Análises Clínicas de vacas testadas via IDGA para Leucose enzoótica bovina:

| Característica | Média de animais Negativos (IDGA) | Média de animais Positivos (IDGA) | Parâmetros |
|-----------------------|--|--|-------------------|
| Eritrograma | | | |
| Proteína total(g/dL) | 7,933 ^a | 8,555 ^a | 7,0 a 8,5 |
| Fibrinogênio (mg/dL) | 0,308 ^a | 0,7 ^a | 300-700 |
| Hematócrito (%) | 32 ^a | 29,416 ^b | 24 a 46 |

Tabela 5: Análises Clínicas de vacas testadas via IDGA para Leucose enzoótica bovina:

| Característica | Média de animais Negativos (IDGA) | Média de animais Positivos (IDGA) | Parâmetros |
|-------------------------------------|--|--|-------------------|
| Contagem de Hemácias(x106/ μ L) | 5,765 ^a | 5,807 ^a | 5 a 10 |
| Hemoglobina (g/dL) | 9,206 ^a | 9,469 ^a | 8 a 15 |
| VCM (μ 3) | 50,658 ^a | 49,758 ^a | 40 a 60 |
| CHCM (%) | 29,008 ^a | 31,825 ^b | 30 a 36 |
| RDW-CV | 18,096 ^a | 17,341 ^a | 16-24 |
| RDW-SD | 26,983 ⁱ | 28,608 ^j | |
| Leucograma | | | |
| Leucócitos (cel/ μ L) | 13,302 ^a | 16,733 ^b | 4000 a 12000 |
| Neutrófilos (cel/ μ L) | 4,605 ^a | 5,079 ^a | 600 a 4000 |
| Linfócitos (cel/ μ L) | 7,869 ^a | 10,78 ^b | 2500 a 7500 |
| Monócitos (cel/ μ L) | 0,52 ^a | 0,572 ^a | 25 a 840 |
| Eosinófilos (cel/ μ L) | 0,309 ^a | 0,317 ^a | 0 a 2400 |
| Plaquetograma | | | |
| Plaquetas 10 ³ / μ L | 185,416 ^a | 243,916 ^b | 100 - 800 |

Letras diferentes nas linhas representam diferenças estatísticas entre as médias utilizando teste t de student ($p < 0,05$).

A RLP calculada se mostrou diferente entre os animais positivos (39,88) e negativos (33,30) ($p < 0,001$), sendo maior para os animais positivos. Esta diferença também pode ser observada quando comparamos os animais com ou sem aumento de linfonodos, tanto os bovinos com aumento de MM quanto os com aumento de CS possuem maiores RLP ($p < 0,05$).

4.5. Inspeção da propriedade: sobre aspectos gerais de manejos gerais do rebanho e de aspectos de saúde :

Na tabela 6 podemos observar todas as observações feitas na fazenda, sobre a saúde geral dos animais e fatores de risco para transmissão da doença:

Tabela 6: Inspeção em visita técnica em fazenda leiteira de gado holandês confinados em compost barn sobre leucose enzoótica bovina e seus fatores de risco.

| Perguntas | Resp. Objetivas | Respostas |
|---|-----------------|--|
| 1. Gerais | | |
| Como foi formado o rebanho? | Na | O rebanho foi formado a partir de um rebanho original de animais mestiços zebuínos, a inseminação começou em 1995 e desde então não se compra animais de leite |
| Compra animais? | N | na |
| Desde quando não se compram vacas? | Na | Nunca se comprou animais de produção, às vezes compra-se um pequeno rebanho de corte |
| leva seus animais para exposição? | N | na |
| Quantos funcionários a fazenda possui hoje? | Na | 5 funcionários, o proprietário também está sempre em funções operacionais da fazenda |
| Qual o sistema que os animais estão alojados? | Na | Vacas: Compost barn / Novilhas e bezerras: piquetes / Bezerras: até 15 dias casinhas de madeira ao lado do compost barn. |
| Tem assistência veterinária e zootécnica? | S | Ambas |
| Qual frequência e finalidade destas visitas? | na | Veterinária: 21 em 21 dias; zootécnica: 2 em 2 meses |
| Fatores de risco: | | |
| O seu rebanho é vacinado? | sim | Na |

Quais doenças estão no seu
calendário vacinal?

na

Clostridioses; Febre Aftosa; Leptospirose; IBR;
BVD; respiratório intranasal de bezerros;
Rotavírus e Coronavírus, pré-parto.

Tabela 6: Inspeção em visita técnica em fazenda leiteira de gado holandês confinados em compost barn sobre leucose enzoótica bovina e seus fatores de risco.

| Perguntas | Resp. Objetivas | Respostas |
|---|-----------------|--|
| Faz o uso de algum medicamento regularmente no seu rebanho? | sim | Somatotropina Bovina e Hormônios para IATF |
| Faz uso de ocitocina durante a ordenha? | não | Na |
| Existe compartilhamento de seringas na fazenda? | sim | Na |
| Existe o compartilhamento de agulhas na fazenda? | sim | Na |
| Existe algum controle de moscas e carrapatos? | sim | Na |
| De 0 a 10 qual a intensidade do problema com as moscas? | 6 | Na |
| De 0 a 10 qual a intensidade do problema com carrapatos? | 8 | Na |
| A reprodução na propriedade, tem uso de monta natural? | não | Na |
| Faz IATF? | sim | Na |
| Quando acontece o início da IATF nas novilhas? | na | Aos 13 meses de idade |
| Se sim, há quanto tempo não se usa touro? | na | 5 a 6 anos |
| Foi feito algum tipo de teste de saúde e andrológico nestes touros? | não | Na |
| Como acontece o controle reprodutivo? | na | Com ultrassonografia intra retal, de 21 em 21 dias |

Tabela 6: Inspeção em visita técnica em fazenda leiteira de gado holandês confinados em compost barn sobre leucose enzoótica bovina e seus fatores de risco.

| Perguntas | Resp. Objetivas | Respostas |
|--|-----------------|--|
| Existe o compartilhamento de luvas? | sim | Na |
| Como é o aleitamento das bezerras? | na | Leite limpo na primeira semana. Caso houver leite de vacas com mastite é dado às bezerras a partir de 1 semana de vida. |
| Como é o processo de colostragem das bezerras? | na | O colostro da mãe é ordenhado e dado ao bezerro. Caso não haja colostro é dado um do banco de colostro que é feito com o colostro excedente. |
| É feito descorna nas bezerras qual o procedimento? | sim | Na |
| É realizado algum tipo de procedimento cirúrgico na propriedade? | na sim | Casqueamento. |
| O material cirúrgico é estéril | não | Rinetas são lavadas com água e sabão. |

Perguntas gerais sobre saúde:

| | | |
|---|-----|--|
| Qual a doença mais prevalente no seu rebanho adulto hoje? | na | Doenças Respiratórias |
| Qual é a doença mais prevalente no seu rebanho jovem hoje? | na | Doenças Respiratórias |
| Existe algum tipo de monitoramento de doenças na propriedade? | sim | Acompanhamento visual sem critérios nem frequência determinada |
| Você já fez exames de brucelose e tuberculose no rebanho? | não | Na |
| Quando foi o último e qual a frequência que você costuma fazer? | na | 2005 |

Tabela 6: Inspeção em visita técnica em fazenda leiteira de gado holandês confinados em compost barn sobre leucose enzoótica bovina e seus fatores de risco.

| Perguntas | Resp. Objetivas | Respostas |
|---|-----------------|--|
| Como é feito o diagnóstico das doenças hoje na sua propriedade? | na | Acompanhamento visual sem critérios nem frequência determinada |

Na = não se aplica

5. Discussão

5.1. Frequência de animais soropositivos para leucose enzoótica bovina pela técnica de IDGA e a distribuição por faixa etária

No presente estudo encontrou-se uma prevalência de bovinos positivos total de 65,93% (tabela 2), maior do que a prevalência encontrada por Macedo (2013), no triângulo mineiro (19%) e no Tocantins (10,8 %) por Ramalho (2020), utilizando a mesma técnica de diagnóstico da LEB (IDGA). Podemos comparar também com prevalências de estados da região norte de Rondônia e Acre, onde foi encontrado uma prevalência de animais positivos de 23% e 9,7% respectivamente (GUTIÉRREZ, SILVINA ELENA *et al.*, 2020). Diferente destes trabalhos nos quais avaliaram fazendas extensivas em sistema a pasto ou piquetes, o presente estudo avaliou uma fazenda de animais confinados em compost barn. A fazenda avaliada desafia as vacas de maneira intensa: Os animais ficam mais próximos comparado a sistemas extensivos a pasto e ficam agrupados em uma densidade de 10 m² de cama por vaca o que é usual para o tipo de sistema; As dietas são ricas em amido e baixa em fibra, aumentando os riscos de acidosis ruminal subclínica; O desafio metabólico enfrentado pelos animais é grande pois eles realizam uma grande produção de lactose, gordura e proteína do leite; A rotina de IATF é intensa e os animais são avaliados logo após o parto para doenças uterinas e após 50 dias de período de espera voluntário entram para reprodução, e são palpadas a cada 21 dias. Estes

fatores influenciam tanto na transmissão quanto na resposta imune das vacas e associados a ausência de um programa de biossegurança culminam nesta prevalência maior comparada a literatura (KOBAYASHI *et al.*, 2010).

As prevalências de leucose variam muito de acordo com o país e região do estudo realizado, sendo que 21 nações já erradicaram a doença de seus rebanhos. Contrastando com essas nações existem países onde 90% dos rebanhos são positivos e possuem prevalências dentro do rebanho que variam de 20 a 90% (BARTLETT *et al.*, 2020).

A prevalência encontrada é alta e traz impactos importantes para a fazenda. Sabe-se que animais positivos têm maiores chances de morrer, maiores chances de adoecer e reduzem a produção de leite. Utilizando a metodologia de Kuczewski *et al.* (2019) e realizando a conversão da moeda de dólar para reais (US\$1,00 para cada R\$5,28) as vacas positivas deixam de faturar cerca de R\$328,93 por ano. Como o rebanho estudado possuía 145 vacas, existe uma redução anual de faturamento exclusivamente por animais positivos para LEB de R\$47.694,85 (KUCZEWSKI *et al.*, 2019).

Quanto maior o tempo de exposição a fatores de risco, maiores as chances de contrair uma doença, a chance aumenta ainda mais caso os fatores de risco tenham uma frequência constante. A avaliação das prevalências por categoria mostra um aumento gradual, sendo a maior porcentagem nas vacas 86,96% comparada às novilhas 35,82% e uma menor nas bezerras 33,33% (tabela 2). A fazenda possui fatores de risco importantes para transmissão da Leucose que podem ser observados na inspeção da fazenda, como o compartilhamento de agulhas na IATF e nas vacinações, o compartilhamento de luvas de palpação transretal, presença de moscas hematófagas, proximidade entre animais positivos e com Linfocitose e animais negativos. Todos estes fatores possibilitam, a transmissão intra rebanho e a manutenção da doença na fazenda. (RUIZ *et al.*, 2018)

Os animais mais jovens possuem uma prevalência alta, de sorologia positiva de 0 a 2 meses (60%). A fazenda em questão possui um bom manejo de colostro, com avaliação da eficiência de colostragem e da qualidade do colostro ofertado. Observa-se esta alta prevalência de positivos nos recém-nascidos pois parte das bezerras possuem imunoglobulinas oriundas do colostro de forma passiva. O IDGA é um teste que avalia de forma qualitativa a presença ou não de Imunoglobulinas reativas para LEB, não distinguindo se esta imunoglobulina é oriunda de imunidade passiva ou ativa. Nos animais de 3 a 5 meses a prevalência de positivos é intermediária e, possivelmente, ainda reflete a presença de anticorpos colostrais em bezerros bem colostrados. As vacas positivas e com alta carga proviral são capazes de produzir um colostro com a presença do BLV, porém rico em e imunoglobulinas para o vírus levando a uma baixa transmissão. Já as vacas positivas para LEB, mas com uma baixa carga proviral produzem um colostro com o BLV porém com uma baixa concentração de imunoglobulinas, sendo estas as transmissoras via colostro pois não entregam ao bezerro proteção passiva para o vírus. (GUTIÉRREZ, GERÓNIMO *et al.*, 2015).

É possível observar que logo após o término do tempo de meia-vida das imunoglobulinas colostrais, as categorias de 6 a 8 meses mantêm uma prevalência média de 20% até que os animais alcancem 12 meses. Esse fato pode ser suportado pela literatura que afirma que cerca de 20% da transmissão dentro de um rebanho ocorre verticalmente, via colostro, transplacentária ou mesmo no momento do parto (MEAS *et al.*, 2002) (KANNO *et al.*, 2014). Em bezerros de 6 a 8 meses, não é mais possível detectar animais que receberam imunoglobulinas colostrais via IDGA, e como a prevalência se mantém, é possível deduzir que esses animais já nasceram positivos ou se contaminaram via colostro. Nos animais de 0 a 12 meses, os únicos fatores de risco envolvendo a transmissão presentes na fazenda eram moscas hematófagas, contato com contemporâneos positivos e compartilhamento de agulhas durante as vacinações. Podemos supor que a transmissão dentro deste grupo é pequena porque os animais possuíam uma baixa carga proviral (KOBAYASHI *et al.*, 2010).

Na Figura 8 podemos observar que logo após os 12 meses começa um aumento nas prevalências que se exacerba aos 24 meses. Estes dois momentos coincidem com o início da IATF nos animais após 12 meses e com a entrada para o compost barn após o primeiro parto o que pode explicar estes aumentos. A IATF foi reportada por DIEGO *et al.* (2016) na Colômbia, como fator de risco importante para a transmissão de LEB. Quando perguntado sobre o compartilhamento de agulhas e luva de palpação, o proprietário reportou que nunca existiu na fazenda nenhum tipo de cuidado especial sobre o tema. Assim, este é um fator importante para a transmissão de LEB na fazenda e possivelmente para outras doenças que não foram avaliadas no estudo (KUCZEWSKI; ORSEL; BARKEMA; MASON; ERSKINE; MEER, 2021).

O compartilhamento de agulhas e luvas acontecia principalmente entre os animais do mesmo grupo de idades, entre as novilhas e entre as vacas e isso pode explicar o primeiro e o segundo salto, de 12 a 24 meses. O contato das agulhas com animais positivos é menor nas novilhas (20 %) comparado aos animais adultos que chega a ter 100% de prevalência de acordo com a idade. A possibilidade de se infectar no rebanho é alta dado que todos os animais acima de 90 meses são positivos, quanto mais velho o animal maior a chance de ele se tornar positivo (figura 8). A média de idades dos animais positivos é maior quando comparada aos negativos e a idade se mostra um fator importante para o animal ter ou não a doença na fazenda ($p < 0,05$). Existem na fazenda vacas LEB positivas com Linfocitose e aumento de linfonodos, estes animais são importantes transmissores para a doença na fazenda, pois possuem alta carga proviral e devem ser priorizadas para possíveis descartes voluntários.

5.2. Índices zootécnicos das vacas e suas relações com a sorologia para Leucose Enzoótica Bovina.

Uma das dificuldades enfrentadas ao avaliarmos os índices zootécnicos é a pequena quantidade de animais negativos (12 vacas), comparado aos positivos (116

animais). A produção de leite média das vacas negativas foi de 10.351 kg e 10.297 kg de leite para os positivos, uma diferença de apenas 54 kg de leite, não houve diferença estatística entre as produções ($p < 0,05$). Diferente do que foi encontrado por YANG *et al.* (2016) que verificou que os animais positivos produziram 4,1 kg de leite a menos por dia no início da lactação e 3,9 kg de leite a menos no meio da lactação por dia. Em outro estudo, no Canadá, os animais positivos produziram -2.554 litros de leite a menos na sua vida produtiva (NEKOU EI *et al.*, 2016).

O desempenho reprodutivo foi avaliado pelo intervalo entre partos e não houve diferença entre as médias (403 dias para os negativos e 386 dias para os positivos) ($p < 0,05$) (tabela 4). Em um estudo realizado por Puentes *et al.* (2017), em um rebanho de novilhas com prevalência de 73,6% BLV, houve redução de 27% na taxa de concepção do rebanho no período de monta ($p = 0,005$) e foi observado impacto de animais soropositivos no desempenho (PUENTES *et al.*, 2017).

É importante destacar que a avaliação de índices reprodutivos deve ser feita com um número grande de animais, bem como para produção de leite, pois são influenciados por um grupo muito grande de fatores como condições de alojamento, temperatura ambiental, nutrição, outras enfermidades, época do ano etc.

5.3. Exame físico dos linfonodos palpáveis e sorologia para Leucose

Enzoótica bovina:

Os animais positivos para LEB apresentaram escores de aumento de linfonodos maiores do que os animais negativos. Os linfonodos desempenham uma função crucial no sistema imunológico, facilitando as interações entre células apresentadoras de antígenos e células T e B sensíveis ao antígeno. Eles também desempenham um papel efetor importante em animais adultos. (TIZARD, 2019) Quando ativados por reconhecimento de antígenos, os linfócitos presentes nos linfonodos modulam uma resposta inflamatória que leva ao aumento do tamanho do órgão. No caso da LEB, o aumento dos linfonodos ocorre por dois motivos: o primeiro envolve a resposta inflamatória decorrente da resposta ao vírus, e o segundo se deve à proliferação de células linfóides com características neoplásicas. Tanto MM

($p < 0,05$) quanto Cs ($p < 0,001$) foram características relacionadas aos animais positivos, ou seja, quanto maior o escore de linfonodo, maior a chance de apresentar LEB(SOMURA et al., 2014).

"Podemos categorizar os animais positivos para LEB da fazenda em 4 grupos: animais portadores; positivos com linfocitose; positivos com linfocitose e linfossarcoma; e animais com linfossarcoma sem linfocitose. Alguns dos animais com grandes aumentos de linfonodos podem já estar sofrendo de casos crônicos de linfossarcoma. A literatura relata que de 3 a 5% dos animais positivos desenvolvem essa condição. Considerando o rebanho de 145 vacas positivas, estamos lidando com cerca de 4 a 7 animais com linfossarcoma."(NIETO FARIAS *et al.*, 2018).

Animais com LEB clínica em casos crônicos regularmente possuem aumento de linfonodos (MARESCA *et al.*, 2015). Encontrar aumento de linfonodos em animais com LEB subclínica não é rotineiro. No entanto, em bovinos saudáveis abatidos, já foi possível demonstrar que há linfonodos com alterações características de LEB que possuem 1.000 cópias/10 ng de DNA proviral. Esse número é maior do que em linfonodos de animais positivos no ELISA para LEB, mas sem as alterações anatomopatológicas. Possivelmente existem bovinos no presente estudo que possuem positividade no IDGA, mas sem reatividade de linfonodos. Possivelmente, esses indivíduos possuem uma menor severidade da LEB e, conseqüentemente, menor carga proviral de BLV nos linfonodos. (SOMURA *et al.*, 2014).

5.4. Análises Clínicas em relação a sorologia para Leucose Enzoótica bovina:

A maior parte dos trabalhos sobre LEB são focados no leucograma quando realizada alguma análise clínica. O presente estudo realizou um hemograma completo de 12 vacas negativas e 12 positivas para LEB. O hematócrito dos animais positivos foi menor comparado ao negativo. Mesmo os animais com LEB não apresentando anemia diante do limite mínimo do hematócrito de 25% é possível observar que existe impacto da doença na quantidade de hemácias e os animais

possuem uma anisocitose maior mostrada pelo RDW-sd ($p < 0,05$). Assim, estas vacas apresentam uma maior resposta da medula óssea na tentativa de aumentar o número de hemácias circulantes. A LEB é uma doença crônica e os impactos dela acontecem ao longo de um grande período. Existem diversos relatos de casos clínicos de leucose enzoótica bovino associado a linfossarcoma no qual os animais se encontravam em anemia severa, estes casos representam o paciente terminal com LEB (THOMPSON; JOHNSTONE; HILBINK, 1993) (MAEZAWA *et al.*, 2018).

O presente estudo conflitua com o apresentado por YANG *et al.* (2016), no qual não se obteve diferença no hematócrito dos animais positivos e negativos. Esta diferença pode ser devido a utilização de técnicas diferentes de hematócrito pois no presente estudo foi realizada à técnica do microhematócrito e no trabalho de Yang (2016) o hematócrito foi calculado pela máquina de hemograma. Possivelmente existe um impacto nas hemácias do animal positivo e que se exacerba nos quadros clínicos crônicos. Porém na fase inicial da doença os animais ainda em boas condições são capazes de repor as hemácias perdidas.

Os animais positivos para LEB tiveram maiores contagem de linfócitos (10780 cel/ μ L), comparado aos negativos (7869 cel/ μ L). A linfocitose é reportada como importante na doença desde os seus primeiros relatos (PEEK; DIVERS, 2018). Existem trabalhos mais atuais mostrando uma relação entre a linfocitose persistente e a capacidade de transmissão de LEB do indivíduo. A linfocitose persistente tem uma alta correlação com a carga proviral dos animais, ou seja, animais com linfocitose persistente são indivíduos de escolha para descarte. Os animais com linfocitose persistente, porém sem aumento de linfonodos são animais chave na transmissão da doença, pois possuem altas cargas virais circulantes o que facilita a transmissão do vírus (RUGGIERO *et al.*, 2019).

A contagem de plaquetas dos animais LEB positivos é maior ($p > 0,05$) comparado aos animais LEB negativos, diferente do encontrado por YANG *et al.*, 2016 que não se obteve diferença entre os grupos. Dado o número maior de plaquetas nos animais positivos foi calculada a RLP que se mostrou diferente entre os animais positivos (39,88) e negativos (33,30) ($p < 0,001$), sendo maior para os

animais positivos. A RLP é utilizada em Linfomas humanos como preditor de prognóstico, quanto maior o número pior o prognóstico, os animais negativos para LEB possuíram uma RLP menor que os positivos mostrando que existe uma relação deste parâmetro e a LEB (ZHAO *et al.*, 2020).

Buscando entender se existia uma inter-relação entre os animais com RLP mais altos e a intensidade da LEB, cruzaram-se os dados de RLP e os animais com aumento de linfonodos, tanto aumentos de MM quanto de CS possuem maiores RLP ($p < 0,05$). Os RLPs apresentam diferenças entre os escores de aumento de Cs, sendo os animais com escore 3 aqueles com maior RLP. Em bovinos, a RLP já foi relatada como fator de predição para mastite clínica e subclínica em vacas pós-parto (GUAN *et al.*, 2020). Torna-se necessário continuar os estudos sobre a RLP nos quadros de LEB, pois é possível que a RLP seja um parâmetro relevante para escolha de quais animais descartar, bem como para avaliar a severidade da LEB no animal. A comparação entre a RLP e a carga proviral de animais positivos para LEB em um rebanho pode ser um caminho para entender a aplicabilidade deste parâmetro.

6. Considerações finais:

A prevalência de leucose enzoótica bovina na fazenda é de 65,93%, o que é considerado alto. A presença de vários fatores de risco, como o compartilhamento de agulhas e luvas na IATF, é essencial para a manutenção da doença no rebanho, e o controle da LEB na propriedade deve focar nestes pontos. É essencial realizar um estudo semelhante a este em uma propriedade antes do início de um programa de controle de LEB, buscando entender onde se deve focar os esforços. Para erradicar a doença na fazenda, será necessário um longo projeto de controle, levando em consideração dois pontos: a alta prevalência de LEB na propriedade e o tempo necessário para repor animais negativos ao plantel, utilizando exclusivamente animais da recria.

A palpação de linfonodos mostrou-se uma prática viável para identificação de animais positivos para LEB em um rebanho com a doença. E houve uma relação perceptível entre os animais com RLP alto e linfonodos de maiores escores, o que pode significar piores prognósticos nesses animais.

Existe um impacto da LEB no hematócrito das vacas, e são necessários mais estudos para entender a origem da redução do hematócrito em animais LEB positivos. A RLP é um parâmetro relevante na LEB, e mais estudos devem ser realizados para entender se animais com LEB e RLP alta possuem prognóstico pior em comparação aos LEB positivos e RLP baixas, para que este parâmetro possa ser utilizado a campo.

7. Conclusões:

A fazenda avaliada apresenta uma alta frequência de animais com sorologia positiva para Leucose Enzoótica Bovina (LEB), especialmente entre as vacas, onde a maioria dos animais são positivos. A frequência de bezerras positivas para LEB é relativamente baixa, e essa categoria deve ser tratada como uma possibilidade de redução da LEB no rebanho a médio prazo.

Existem alguns fatores de proteção na fazenda, como a ausência de aplicação de ocitocina e a não compra externa de animais. No entanto, há vários fatores de risco, como o compartilhamento de agulhas em vacinações e a aplicação de hormônios, o uso comum de luvas de palpação e a utilização de colostro sem pasteurização.

Algumas alterações foram observadas nas vacas avaliadas no trabalho, como o aumento de linfonodos, a linfocitose e a alteração na relação linfócitos/plaquetas, que são indicadores de danos causados pelo vírus da leucose e de alta carga proviral. Isso favorece a ação desses animais como eficientes transmissores da doença.

Embora a fazenda utilize várias ferramentas de produção intensiva, como estabulação dos animais, melhoramento genético e nutrição adequada, não há um programa de biossegurança a ser seguido.

Medidas de controle dos fatores de risco para LEB devem ser implementadas neste rebanho para minimizar o impacto da doença a médio prazo e garantir a diminuição de sua prevalência.

8. Referências:

1. BARTLETT, Paul C *et al.* Current Developments in the Epidemiology and Control of Enzootic Bovine Leukosis as Caused by Bovine Leukemia Virus. 2020.
2. BUEHRING, Gertrude Case *et al.* Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2015.
3. DE ALMEIDA, Ítalo Câmara *et al.* Seroprevalence and influence of bovine leukemia virus on the incidence of mastitis in dairy herds. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 49, n. January, p. 1–8, 2021.
4. DIEGO, Ortiz Ortega *et al.* Seroprevalence and risk factors associated with bovine leukemia virus in Colombia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, v. 8, n. 5, p. 35–43, 2016.
5. DIRKSEN, Gerril. *rosemberger :exame Clínico dos bovinos*. [S.l.]: Guanabara Koogan, 1993.
6. Dissertação de Mestrado Matheus Piovesan Porto Alegre 2021. 2021.
7. FRIE, Meredith C. *et al.* MicroRNAs encoded by Bovine leukemia virus (BLV) are associated with reduced expression of B cell transcriptional regulators in dairy cattle naturally infected with BLV. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 4, n. JAN, p. 1–16, 2018.
8. FRIE, Meredith C. *et al.* Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Veterinary Immunology and*

- Immunopathology*, v. 182, p. 125–135, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.013>>.
9. GAO, Andrew; KOUZNETSOVA, Valentina L.; TSIGELNY, Igor F. Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, v. 149, p. 104417, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104417>>.
10. GUAN, Ruo Wei *et al.* Prognostic potential of pre-partum blood biochemical and immune variables for postpartum mastitis risk in dairy cows. *BMC Veterinary Research*, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2020.
11. GUTIÉRREZ, Gerónimo *et al.* Characterization of colostrum from dams of BLV endemic dairy herds. *Veterinary Microbiology*, v. 177, n. 3–4, p. 366–369, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.001>>.
12. GUTIÉRREZ, Gerónimo *et al.* Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection. *BMC Veterinary Research*, v. 10, 2014.
13. GUTIÉRREZ, Silvina Elena *et al.* Leucosis bovina: una visión actualizada Bovine Leukosis : an updated review. *Rev Inv Vet Perú*, v. 31, n. 3, p. 1–28, 2020. Disponível em: <<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/16913/15476>>.
14. JULIARENA, Marcela A *et al.* Hot topic : Bovine leukemia virus (BLV) -infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. p. 4586–4589, 2016.

15. KANNO, Toru *et al.* Effect of freezing treatment on colostrum to prevent the transmission of bovine leukemia virus. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 76, n. 2, p. 255–257, 2014.
16. KHAN, Zanib *et al.* Molecular investigation of possible relationships concerning bovine leukemia virus and breast cancer. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-08181-5>>.
17. KOBAYASHI, Sota *et al.* Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *BMC Veterinary Research*, v. 6, p. 1–6, 2010.
18. KUCZEWSKI, Alessa *et al.* Economic evaluation of 4 bovine leukemia virus control strategies for Alberta dairy farms. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 3, p. 2578–2592, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-15341>>.
19. KUCZEWSKI, Alessa; ORSEL, Karin; BARKEMA, Herman W; MASON, Steve; ERSKINE, Ron; MEER, Frank Van Der. Invited review: Bovine leukemia virus — Transmission , control , and eradication. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 6, p. 6358–6375, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-18925>>.
20. KUCZEWSKI, Alessa; ORSEL, Karin; BARKEMA, Herman W.; MASON, Steve; ERSKINE, Ron; VAN DER MEER, Frank. Invited review: Bovine leukemia virus—Transmission, control, and eradication. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 6, p. 6358–6375, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-18925>>.
21. MACÊDO, DEISE MARIA RITO. *INQUÉRITO SOROLÓGICO E EPIDEMIOLÓGICO DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA EM*

MICRORREGIÕES DO TRIÂNGULO MINEIRO–MG, BRASIL. 2013. 68 f. UNIVERSIDADE DE UBERABA, 2013.

22. MAEZAWA, Masaki *et al.* A clinical case of enzootic bovine leukosis in a 13-month-old holstein heifer. *Japanese Journal of Veterinary Research*, v. 66, n. 3, p. 209–213, 2018.
23. MARESCA, C. *et al.* Enzootic bovine leukosis: Report of eradication and surveillance measures in Italy over an 8-year period (2005-2012). *Preventive Veterinary Medicine*, v. 119, n. 3–4, p. 222–226, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.02.024>>.
24. MAXIE, Grant. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals: Sixth Edition*. [S.l.: s.n.], 2015. v. 2.
25. MEAS, Sothy *et al.* Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Veterinary Microbiology*, v. 84, n. 3, p. 275–282, 2002.
26. NEKOU EI, Omid *et al.* Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 119, n. 3–4, p. 105–113, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.02.025>>.
27. NEKOU EI, Omid *et al.* Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 133, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.09.011>>.
28. NIETO FARIAS, María Victoria *et al.* Lymphocyte proliferation and apoptosis of lymphocyte subpopulations in bovine leukemia virus-infected dairy cows with high and low proviral load. *Veterinary*

- Immunology and Immunopathology*, v. 206, n. March, p. 41–48, 2018.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.10.012>>.
29. OLAYA-GALÁN, N. N. *et al.* Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. *Epidemiology and Infection*, v. 145, n. 15, p. 3125–3130, 2017.
30. PEEK, Simon F.; DIVERS, Thomas J. *Rebhun's diseases of dairy cattle: Third edition*. [S.l.: s.n.], 2018.
31. PEREIRA, Admilson Luiz Modesto *et al.* SOROPREVALÊNCIA DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA – REVISÃO DE LITERATURA. *revista científica eletrônica de medicina veterinária.*, 2013.
32. PLUTA, Aneta; JAWORSKI, Juan P. and HTLV. p. 1–31, 2020.
33. PUENTES, Rodrigo *et al.* Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Veterinary Research*, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-016-0749-x>>.
34. PUENTES, Rodrigo *et al.* Horizontal Transmission Dynamics of Bovine Leukemia Virus (Blv) and Negative Effect on Reproductive Performance in Naturally Infected Holstein Heifers. *Science And Animal Health*, v. 4, n. 3, p. 294, 2017.
35. RAMALHO, Gisele. *ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO PARA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA NO ESTADO DA PARAÍBA*. 2020. 147–154 f. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnc.2020.125798>><<https://doi.org/10.1016/j.smr.2020.02.002>><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/810049>><<http://doi.wiley.com/10.1002/anie.197505391>><<http://www.scienc>

edirect.com/science/article/pii/B9780857090409500205%0Ahttp:>.

36. RUGGIERO, V. J. *et al.* Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 10, p. 9165–9175, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-16186>>.

37. RUIZ, Vanesa *et al.* Bovine Leukemia Virus Infection in Neonatal Calves . Risk Factors and Control Measures. v. 5, n. October, p. 1–7, 2018.

38. SIEFKES, D. The origin of HIV-1, the AIDS virus. *Medical Hypotheses*, v. 41, n. 4, p. 289–299, 1993.

39. SOMURA, Yoshiko *et al.* Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection. *Archives of Virology*, v. 159, n. 10, p. 2693–2697, 2014.

40. THOMPSON, K. G.; JOHNSTONE, A. C.; HILBINK, F. Enzootic bovine leukosis in New Zealand - A case report and update. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 41, n. 4, p. 190–194, 1993.

41. TIZARD, Ian (Org.). *Veterinary Immunology*. 10^a ed. [S.l.]: Elsevier, 2019.

42. TOSTES, Raimundo Alberto. Situação da Leucose Bovino no Brasil: uma revisão. *Colloquium Agrariae*, v. 1, n. 1, p. 42–50, 25 jun. 2005. Disponível em: <<http://journal.unoeste.br/index.php/ca/article/view/85/548>>.

43. YANG, Y. *et al.* Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 5, p. 3688–3697, 2016.

44. ZHAO, Yanchun *et al.* The prognostic value of platelet-lymphocyte ratio and neutrophil-lymphocyte ratio in the treatment response and survival of patients with peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*, v. 61, n. 3, p. 623–630, 2020.