

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

LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA: ISOLAMENTO DE AMOSTRAS  
BRASILEIRAS DO VÍRUS E OBTENÇÃO DE ANTÍGENO

Grazielle Cossenzo Florentino Galinari

Belo Horizonte

2015

Grazielle Cossenzo Florentino Galinari

LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA: ISOLAMENTO DE AMOSTRAS  
BRASILEIRAS DO VÍRUS E OBTENÇÃO DE ANTÍGENO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em  
Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG como  
requisito parcial para a obtenção do título de Mestre na área  
de concentração Medicina Veterinária Preventiva.  
Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG

2014

## Agradecimentos

A Deus, que guia meu caminho e renova minha fé diariamente.

Ao meu grande mestre professor Dr. Rômulo Cerqueira Leite, orientador dessa dissertação, pelos sábios ensinamentos e pelas críticas construtivas que fez durante a realização desse estudo, visando o meu crescimento pessoal e profissional. Pela oportunidade de realizar o sonho de fazer o mestrado e de trabalhar com microscopia eletrônica.

À minha mãe por auxiliar nos cuidados com o meu filhote, e que com muita sabedoria, esteve ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória, pois sempre reconheceu o valor da educação; um bem que levarei para a vida toda.

Ao meu marido Leandro, companheiro, amigo, pai excelente e incentivador constante dos meus estudos. Sempre tolerou a “minha falta de atenção”, nos momentos de crise, angústia, estresse. Obrigada por me apoiar sempre.

Ao meu amado filho, sempre carinhoso e compreensivo nos períodos de ausência.

Ao professor Jenner, pela orientação técnica, pelo acolhimento no laboratório de Retrovíruses.

Aos meus amigos de trabalho Agda, Eduardo e Graciela, pelo companheirismo, sempre solícitos a escutar os desabafos, ajudar em todas as situações, vocês são pessoas especiais.

Aos professores e colegas de trabalho do Departamento Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, agradeço pela convivência.

Aos membros do Retrolab, não citarei nomes para não ser injusta, agradeço por toda a ajuda, pela convivência, pelas festas, pelo conhecimento, pela amizade, pelo trabalho em grupo. Vocês são uma excelente equipe de trabalho.

A minha Dinha pelas orações e correções ortográficas e a todos os meus familiares e amigos pela convivência, incentivo carinho e amizade.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG, em especial a professora Elizabeth, por ter me aceitado na disciplina de microscopia eletrônica permitindo meu primeiro contato com este mundo fascinante. Ao funcionário, Kinulpe por todos os ensinamentos sobre biologia celular durante as seções de microscopia, que eram verdadeiras aulas. A Roberta, Natalia e Janine, pelo processamento das amostras, pelo profissionalismo e pelas dicas em processar os materiais.

Aos funcionários da Fazenda de Pedro Leopoldo, pela separação dos animais e ajuda na coleta de materiais.

Ao Daniel por permitir realizar a coleta nos animais da EPAMIG e por todo o apoio durante o experimento.

A Priscilla Gerber, que mesmo longe fisicamente, nossa amizade continua a mesma, agradeço o apoio e consultoria que ocorreram em várias partes durante este experimento.

A pesquisadora Dra. Daniele Spehner do instituto IGBMC da França por auxiliar na análise das micrografias eletrônicas e por ensinar a técnica de Flat embedding.

---

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	1
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	3
<b>2. BIBLIOGRAFIAS CONSULTADAS</b>	4
2.1 Etiologia	4
2.2 Epidemiologia	6
2.3 Transmissão	7
2.4 Patogenia e sinais clínicos	8
2.5 Diagnóstico	8
2.6 Controle	9
2.7 Importância Econômica	10
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	10
3.1 Amostras sorológicas	10
3.2 Testes de Imunodifusão em gel de Agar (IDGA) utilizando o antígeno A	11
3.3 ELISA gp51	12
3.4 Isolamento Viral	12
3.5 Extração de DNA e amplificação de PCR	14
3.6 Produção de antígeno para leucose bovina a partir da amostra isolada de campo	14
3.7 Eletroforese de proteína (SDS-PAGE)	15
3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	16
3.9 Análise Estatística	16
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	17
4.1 Isolamento Viral	17
4.2 PCR: Confirmação do Isolamento	21
4.3 Microscopia Eletrônica	21
4.4 Produção do antígeno para leucose bovina	27

---

---

4.5	Sensibilidade clínica dos diferentes métodos diagnósticos	29
4.6	Teste de ELISA	32
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	35
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	36
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	37

---

---

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados obtidos no Teste de IDGA utilizando os dois antígenos com as amostras das duas fazendas testadas.	30
Tabela 2 -	Resultados obtidos a partir do teste de IDGA utilizando os dois antígenos A e B com as amostra de soro de duas fazendas do estado de Minas Gerais.	30
Tabela 3 -	Resultados obtidos no Teste de IDGA utilizando os dois antígenos com as amostras das duas fazendas Y.	31

---

---

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação do genoma do BLV: Gag e Env: proteínas estruturais. Pol: função enzimática. Tax e Rex: regulação da transcrição e pós RH Rnase.	5
Figura 2 -	Partícula viral.	6
Figura 3 -	Desenho esquemático da placa utilizada para o exame de IDGA.	11
Figura 4 -	Célula Tb1lu inoculada com PBMC da fazenda X, aparecimento da massa celular com morfologia diferente da monocamada celular na segunda passagem celular após infecção. Aumento de 100X no microscópio óptico.	18
Figura 5 -	Efeito citopático que surgiu na décima passagem celular após inoculação do PBMC de um animal infectado com VLB em uma das amostras isoladas da fazenda X. Aumento de 100X no microscópio óptico.	18

---

---

Figura 6 -	A - Controle negativo do isolamento BLVna linhagem celular Tb1lu, aumento de 200X . B - Presença de vários sincícios na monocamada celular. Amostra do animal 41 da fazenda X, coloração May-Grunwald-Giemsa, aumento 200X.	19
Figura 7 -	Foto de um sincício de uma amostra isolada de campo sem coloração. Aumento de 200X.	20
Figura 8 -	Foto de um gel de agarose para a região TAX do vírus da Leucose bovina. Na primeira canaleta está o padrão de peso molecular, na segunda o controle positivo, na terceira amostra de PBMC de isolado de campo positivo pela técnica de IDGA, na quarta amostra o controle negativo da reação de PCR, na quinta amostra de PBMC de um animal negativo na técnica de IDGA, sexta não havia nenhuma amostra, sétima, oitava, nona, décima são todas amostras de campo, isoladas na linhagem celular Tb1lu amplificadas por PCR para região TAX.	21
Figura 9a -	Linhagem celular FLK infectada com BLV	23
Figura 9b -	FLK presença de partículas virais intra e extracelular.	24
Figura 9c -	FLK retículo endoplasmático e partículas de BLV.	24
Figura 9d -	FLK, citoesqueleto e partículas virais no meio extracelular.	25
Figura 10a-	Controle negativo linhagem celular Tb1lu.	25
Figura 10b-	Controle negativo linhagem celular Tb1lu.	26
Figura 10c-	Partículas virais de BLV isolados de campo na linhagem celular Tb1lu.	26
Figura 10d-	Micrografia de um sincício na amostra isolada de campo.	27
Figura 11-	Gel de poliacrilamida corado com azul de comassie. Na primeira canaleta esta o padrão de peso molecular, na segunda, amostra do antígeno A e na terceira e na quarta amostra o antígeno B.	27
Figura 12 -	Fotos da laminas contendo resultado de IDGA dos dois antígenos. Em A o antígeno utilizado foi o A para a realização do teste diagnóstico. Em B e C o antígeno utilizado foi o B e pode ser observada uma variação entre as linhas de precipitação.	28
Figura 13 -	Resultado em porcentagem da sorologia realizada a partir da técnica de IDGA para leucose bovina utilizando os antígenos A e B dos animais da fazenda X.	31
Figura 14-	Resultado em porcentagem da sorologia realizada a partir da técnica de IDGA para leucose bovina utilizando os B dos animais da fazenda antígenos A e Y.	32

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

BLV	- Bovine Leukaemia Virus (vírus da leucose bovina)
BVDV	- Bovine Viral Diarrhea Virus (vírus da diarreia bovina)
CN	- Controle Negativo
DMSO	- Dimetilsulfóxido
dNTPs	- Desoxirribonucleosídeos Trifosfatados
EDTA	- Ácido Etileno Diamino Tetra Acético Sal Dissódico
ELISA	- Ensaio Imunoenzimático
FBL	- Fetal Bovine Lung Cell (célula pulmão fetal bovino)
FLK	- Fetal Lamb Kidney Cells (células de rim de feto de ovelhas)
IDGA	- Imunodifusão em gel de Ágar
Kb	- Quilobase
LEB	- Leucose Enzoótica Bovina
LP	- Linfocitose Persistente
M	- Molaridade
MEM	- Meio Essencial Mínimo
MET	- Microscopia Eletrônica de Transmissão
OIE	- Organização Mundial de Saúde Animal
P. A.	- Para Análise
PBMC	- Peripheral Blood Mononuclear Cell (células sanguíneas periféricas mononucleares)
PBS	- Phosphate Buffered Saline (solução salina tamponada com fosfato)
PCR	- Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia pela polimerase)
PEG	- Polietilenoglicol
RIA	- Radioimunoensaio
SDS	- Duodecil Sulfato de Sódio
SFB	- Soro Fetal Bovino
STV	- Solução de Tripsina Versene
Taq	- Enzima DNA Polimerase extraída de <i>Thermus aquaticus</i>
Tb1 Lu	- Tadarida brasilienses lung
USDA	- United States Department of Agriculture

1

## RESUMO

2 O vírus da leucose bovina (BLV) apresenta distribuição mundial e acomete principalmente bovinos  
3 leiteiros, gerando perdas econômicas devido ao descarte precoce de animais, condenação de carcaça ao  
4 abate, redução das taxas de fertilidade e queda na produção de leite. Uma das técnicas de diagnóstico  
5 preconizadas pela OIE para o diagnóstico da LEB são imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e ensaio  
6 imunoenzimático (ELISA). No Brasil, o único teste comercial disponível é baseado no IDGA  
7 (Antígeno A) produzido a partir de uma linhagem celular de rim fetal de ovinos (FLK). Essa é  
8 persistentemente infectada pelo BLV e pelo vírus da diarréia viral bovina. Devido à necessidade de  
9 importação do teste de ELISA, os custos inviabilizam o uso desta técnica em grande escala no país. Os  
10 objetivos deste trabalho foram: 1. realizar o isolamento do BLV a partir de células mononucleares do  
11 sangue periférico de bovinos naturalmente infectados pelo BLV utilizando a linhagem celular Tb1lu,  
12 livre de BVDV; 2. produzir um antígeno B a partir dos isolados brasileiros de BLV; 3. comparar os  
13 resultados sorológicos obtidos utilizando as técnicas de IDGA e ELISA frente ao antígeno preparado a  
14 partir de uma amostra de BLV brasileira. Para isso, amostras de PBMC de sete animais positivos para  
15 BLV foram utilizadas no isolamento viral em células Tb1lu. Quatro amostras foram positivas no  
16 isolamento, posteriormente foi confirmado por PCR. Um isolado foi escolhido para produção do  
17 antígeno B. Cento e oitenta amostras de campo de duas propriedades positivas para o BLV foram  
18 utilizadas para avaliar os testes. Os antígenos A e B foram menos sensíveis quando comparados com a  
19 técnica de ELISA. Foi possível realizar o isolamento de amostras de campo de BLV em células Tb1lu  
20 e produzir um antígeno B para o teste de IDGA.

21 Palavras chaves: vírus da leucose bovina (BLV), isolamento viral, produção de antígeno, IDGA, ELISA.

## ABSTRACT

1

2 Bovine leukemia virus presents a worldwide distribution and commonly affects dairy cattle causing  
3 economical losses related to increased heifer replacement costs, loss of income from condemned  
4 carcasses of cull cows, reduced fertility and decreased milk production. Diagnostic techniques  
5 recommended by the World Organization for Animal Health (OIE) are agar gel immunodiffusion test  
6 (AGID) and the enzyme linked immunosorbant assay (ELISA). In Brazil there is a commercially  
7 available IDGA test (IDGA-Cm) is based on antigen produced by a fetal lamb kidney (FLK) cell line  
8 persistent infected with BLV and bovine viral diarrhoea virus. ELISA tests to BLV are not  
9 commercially available in Brazil, and the cost associated to import process prevents its use in large  
10 scale in the country. The aims of this study were to: 1. isolate BLV from peripheral blood  
11 mononuclear cells from naturally infected cows using the cell line Tb1lu, which is BVDV-free; 2.  
12 produce an antigen from Brazilian BLV isolates; 3. compare the IDGA developed in this study with  
13 the IDGA-Cm and the commercially available ELISA. Seven PBMC samples positive for BLV by  
14 reverse-transcriptase PCR were used for viral isolation attempt using Tb1lu cell. Four of seven  
15 samples were isolated as conformed by PCR and electron microscopy. One isolate was select for  
16 antigen production and development. One hundred and eighty samples from two field BLV positive.  
17 The antigens A and B were less sensitive compared to ELISA. BLV were successfully isolated from  
18 field samples using the Tb1lu cells, and used for the development of a *in-house* IDGA.

19 Keywords: leukemia bovine virus, agar gel immunodiffusion, viral isolation, antigen production.

2 A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma doença contagiosa que afeta bovinos. Ela é causada pelo  
3 vírus da família *Retroviridae*, sub-família *Oncovirinae* (ICTV, 2013), pertencente ao gênero  
4 *Deltaretrovírus* conhecido como *Bovine Leukemia Virus* (BLV).

5 O vírus da leucose enzoótica bovina apresenta distribuição mundial. No Brasil ela está presente em  
6 todo o território, com maior prevalência no gado leiteiro, devido ao tipo de manejo empregado,  
7 proporcionando o aparecimento dos sintomas da doença.

8 Uma característica da leucose é que ela pode apresentar longos períodos de incubação. Em  
9 aproximadamente 70% dos casos o animal apresenta a forma assintomática, considerada uma fonte  
10 importante de transmissão e manutenção do vírus. Cerca de 30% dos animais infectados podem  
11 apresentar linfocitose persistente (LP) com aumento dos linfócitos B circulantes no sangue.  
12 Aproximadamente 5 a 10% dos animais, geralmente adultos acima de três anos de idade, podem  
13 apresentar linfossarcomas com evolução fatal.

14 Os primeiros relatos do isolamento do vírus BLV ocorreram na década de 70 e desde então, ocorreram  
15 isolamentos do BLV em várias partes do mundo. No Brasil, até o presente momento, não foi  
16 encontrado artigos sobre isolamento do vírus BLV a partir de amostras de campo em linhagem celular.

17 Este trabalho teve como objetivo isolar o vírus da leucose bovina a partir do co-cultivo celular de  
18 bovinos naturalmente infectados, e produzir antígeno para exame de Imunodifusão em gel de Agar.

1

## 2 - BIBLIOGRAFIAS CONSULTADAS

### 2 2.1 Etiologia

3 O vírus da leucose bovina é um vírus oncogênico, linfotrópico, pertencente à família *Retroviridae*,  
4 subfamília *Oncoviridae*. Ele apresenta distribuição mundial; é o agente etiológico da leucose  
5 enzoótica bovina (LEB), que é uma proliferação neoplásica de células B (BURNY, et al, 1988;  
6 MORATORIO, et al, 2013). A infecção pelo BLV é caracterizada por longo período de latência e curto  
7 de viremia (JUNIOR, 2001D). A latência é uma estratégia viral de escape da resposta do sistema  
8 imune do hospedeiro e permitir o desenvolvimento de tumor (MORATORIO, et al, 2013).

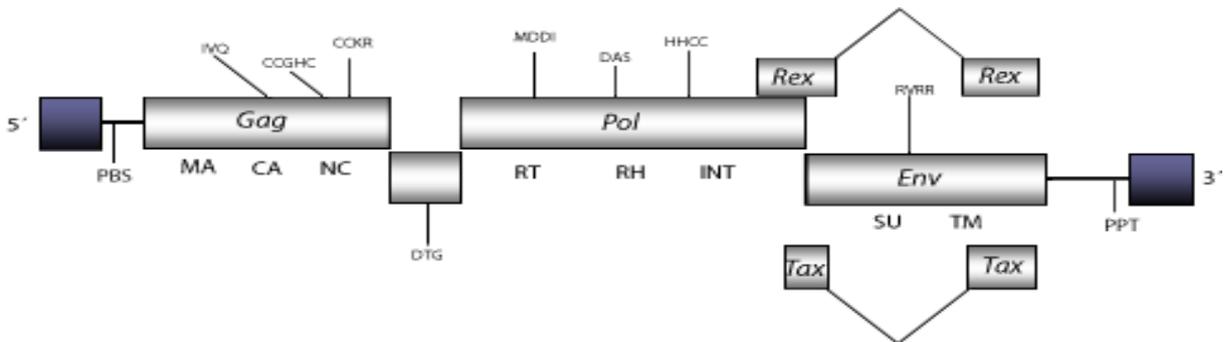
9 Desde o século XIX existem relatos de sinais clínicos associados com a leucose enzoótica bovina, que  
10 podem ser encontrados na literatura Alemã. Em 1871 Leisering descreveu a presença de nódulos  
11 amarelados no baço de uma vaca com leucocitose. Três anos depois, Bollinger descreveu os sintomas  
12 da leucemia bovina e também o estado clínico (RODRIGEZ et al., 2011, JUNIOR et al., 2001).  
13 Acredita-se que a Europa seja o berço da infecção e que a doença tenha origem na região Memel, na  
14 Prússia Oriental, hoje chamada de Lituânia. A disseminação da doença ocorreu através da introdução  
15 de raças de gado nos países que eram livres dessa doença (RODRIGUEZ et al., 2011; JUNIOR et al,  
16 2001). Após a segunda guerra mundial houve relatos de LEB em quase todos os países da Europa  
17 Oriental. A doença foi introduzida nos Estados Unidos da América no final do século XIX por animais  
18 importados da região do mar Báltico. Os rebanhos Canadenses também foram atingidos com a  
19 disseminação da infecção. No período pós - guerra, a importação de animais destas duas regiões  
20 disseminou o BLV para o restante do mundo (RODRIGUEZ, et al, 2011, JUNIOR, et al, 2001;  
21 JHONSON and KANEENE, 1992). No Brasil, o primeiro caso descrito foi em 1943 por Rangel e  
22 Machado que fizeram um levantamento de todos os blastomas (tumores) de animais domésticos e  
23 comparou a sua incidência no estado de Minas Gerais (RANGEL & MACHADO, 1943).

24 A maioria dos bovinos infectados (cerca de 70%) não apresenta nenhuma alteração no número total de  
25 linfócitos e nem alterações clínicas. Aproximadamente um terço dos animais infectados desenvolve  
26 linfocitose persistente, que é caracterizada pelo aumento do número de linfócitos B no sangue  
27 periférico. Os animais com linfocitose persistente ficam vários anos sem nenhuma alteração clínica,  
28 mas podem progredir para o desenvolvimento de tumores (RODRIGUEZ et al, 2011).

29 O genoma do BLV é composto por vários genes. Dentre esses, os genes *gag*, *env* e *pol* são necessários  
30 para a realização da síntese viral (GILLET et al, 2007). O gene *gag* é codificado pela proteína  
31 precursora Pr<sup>44</sup>. Este gene codifica três proteínas a MA (matriz), que liga o genoma viral RNA e  
32 interage com a bicamada lipídica da membrana viral. A proteína nucleocapsídeo (NC) realiza o  
33 empacotamento do RNA genômico. A proteína do capsídeo (CA) parece ser um importante marcador  
34 da resposta imune em animais com alto título de anticorpos, sendo a região onde se encontra a proteína  
35 p24 reconhecida especificamente por linfócitos T (GILLET et al., 2007). O gene *pol* é codificado pela  
36 proteína precursora Pr145, este gene codifica a transcriptase reversa (RT) presente em todos os  
37 retrovírus, porém a RT do BLV apresenta alta fidelidade quando comparada a de outros retrovírus,  
38 levando a menor taxa de erros durante a transcrição do genoma viral, além disso, esse gene ainda  
39 codifica as proteínas integrase (IN). Já o gene *env* é codificado pela proteína precursora pr72<sup>env</sup>, ela é  
40 clivada em duas subunidades a extracelular (SU) conhecida como gp51 e a transmembrana TM. O  
41 precursor Pr<sup>72</sup> é encontrado em apenas uma das células filhas da progênie. Esse mecanismo de  
42 ausência de antígenos virais em uma parte da progênie celular permite a persistência do vírus no

1 hospedeiro. A proteína gp51 é responsável pela infectividade do vírus através da sua ligação a um  
2 receptor celular específico, sendo muito utilizada em testes de diagnóstico (GILLET et al, 2007 .) A  
3 etapa inicial da infecção é a formação de sincícios *in vitro* são resultado da ligação da gp51 e gp30 na  
4 membrana celular (ALTANER et al, 1993; JUNIOR, et al, 2001, GILLET et al, 2007).

5 Além desses genes, o genoma do BLV possui uma região chamada X, composta por quatro genes,  
6 dentre eles os genes *tax* e *rex*, que estão envolvidos na regulação transcricional e pós-transcricional,  
7 respectivamente (KERKHOF, et al., 1998). A figura 1 mostra um desenho esquemático do genoma  
8 do BLV

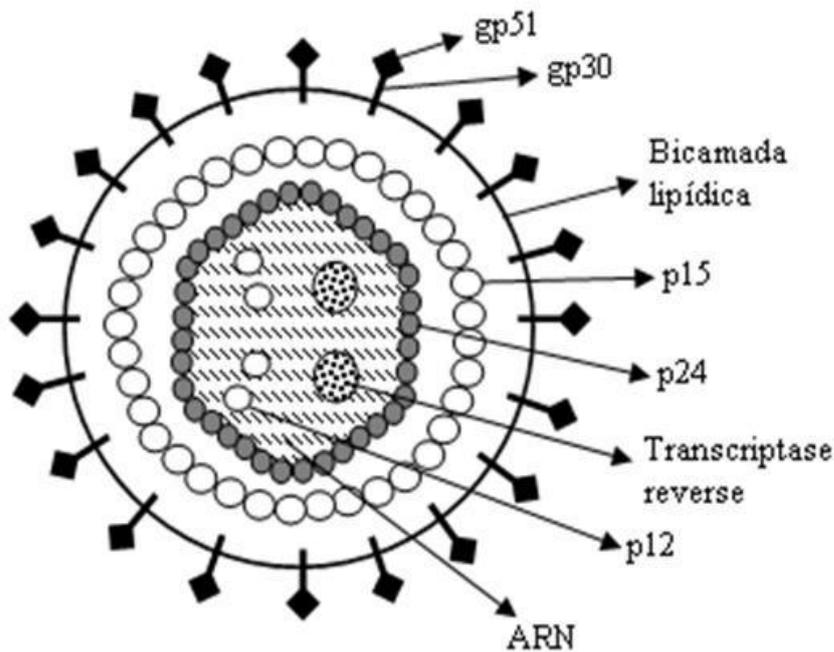


9  
10 Fonte: [HTTP://gydb.org/index.php/Element:BLV](http://gydb.org/index.php/Element:BLV).

11 Figura 1: Representação do genoma do BLV: Gag e Env: proteínas estruturais. Pol: função enzimática. Tax e  
12 Rex: regulação da transcrição e pós RH RNase.

13  
14 Morfologicamente, as partículas virais variam de 60 a 125 nm de tamanho, são formadas por um  
15 nucleóide eletrodens envolvido por um envelope viral (GILLET et al,2007). Em cultura de leucócitos  
16 a partícula viral pode ter de 90 a 120 nm de diâmetro, seu capsídeo é icosaédrico, com envelope  
17 lipoproteico e genoma de RNA de fita simples com polaridade positiva (JUNIOR et al, 2001;  
18 MURPHY et al, 1999).

19 Na década de 70 a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida foi utilizada para descobrir quais  
20 proteínas compunham o vírus, dentre elas a de maior concentração, que apresentava 24000 kDa, ficou  
21 conhecida como p24, e a gp51 que é uma glicoproteína (GILDEN et al, 1975). Nos retrovírus as  
22 glicoproteína do envelope são responsáveis pela modulação da adsorção do vírus na célula alvo,  
23 determinando seu tropismo e a especificidade viral. Em alguns vírus, elas são responsáveis pela  
24 indução de sincícios celulares (ALTANER et al, 1993; JUNIOR, et al, 2001). A figura 2 mostra  
25 esquematicamente como é uma partícula viral com as principais proteínas que o constituem.



1  
2 Figura 2: Partícula viral.

### 3 2.2 Epidemiologia

4 A leucose enzoótica bovina apresenta uma alta morbidade. Em rebanhos infectados, ela pode atingir  
5 uma prevalência de 60 a 90% nos animais (JUNIOR et al., 2001).

6 O vírus apresenta distribuição mundial, com prevalência alta na América do Sul e Norte, alguns países  
7 Asiáticos, no Oriente Médio e em toda a Europa, com exceção dos países que conseguiram erradicar a  
8 doença (RODRIGUEZ et al, 2011).

9 Na América do Sul existem poucos estudos atuais sobre a prevalência da BLV, e os valores  
10 encontrados variam muito entre regiões, por exemplo, na Argentina, a taxa de animais infectados no  
11 rebanho é de 84% (RODRIGUES et al., 2011). Nos Estados Unidos da América os dados foram  
12 coletados através do Monitoramento de Saúde Animal, levantamento feito em 2007 pelo  
13 Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) juntamente com o Sistema Nacional de  
14 Monitoramento em Saúde Animal (NAHMS) demonstrou que 83,9% dos rebanhos leiteiros dos  
15 Estados Unidos são positivos para BLV (Centro de Epidemiologia e saúde animal, outubro de 2007).  
16 Estudos recentes no Canadá mostraram que 89% dos rebanhos eram positivos para BLV  
17 (RODRIGUEZ, et al., 2011).

18 Na Ásia a situação epidemiológica é incerta; segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE),  
19 o vírus da leucose bovina está presente na Indonésia, China e Mongólia. Cerca de 5% dos animais de  
20 Camboja e Taiwan são positivos para LEB e a taxa de soroprevalência no Japão é de 68,1% no  
21 rebanho (RODRIGUEZ, et al., 2011).

1 Em alguns estados brasileiros foram realizados vários levantamentos sorológicos em rebanhos leiteiros  
2 com o objetivo de determinar a ocorrência de animais soropositivos para BLV. Os resultados variaram  
3 muito entre os estados, sendo: na Bahia 41%, Minas Gerais 38,7%, Rio de Janeiro 54,3%, Rio Grande  
4 do Sul 23,5%, São Paulo 52%, Tocantins 37% (CAMARGOS et al, 2002; FERNANDES, 2007;  
5 MATOS et al, 2005; MEGIAL et al, 2003; POLETTO et al, 2004; ROMERO & ROWE, 1981,  
6 RAJÃO, 2008).

7 Em 1990, Flores e colaboradores realizaram um levantamento sorológico no estado do Rio Grande do  
8 Sul, utilizando a técnica de IDGA para diagnóstico de LEB. Eles encontraram 20,7% de animais  
9 reagentes e 43,7% das propriedades apresentavam animais positivos. Em 1996 também no estado do  
10 Rio Grande do Sul, Moraes avaliou pela técnica de IDGA 39.799 amostras de soro bovino de corte e  
11 leite, provenientes de 4200 propriedades e 172 municípios. Foram encontrados 9,2% de amostras  
12 positivas (3.645), com prevalência de 12% de animais e 29% de rebanhos positivos para o estado  
13 (JUNIOR et al, 2001).

### 14 **2.3 Transmissão**

15 O vírus da leucose bovina pode ser transmitido tanto por via vertical quanto horizontal, sendo que a  
16 transmissão horizontal é a principal forma. Ela é baseada na transferência de células infectadas de um  
17 animal infectado para outro susceptível (GILLET et al., 2007; DIGIACOMO et al., 1985)

18 O vírus livre é muito instável, mas dentro de células como macrófagos, monócitos e células B, dentre  
19 outras presentes no sangue ou leite, permanece estável e utiliza esta forma como veículo de  
20 transmissão natural. Animais na fase de linfocitose persistente podem apresentar um grande número de  
21 células infectadas, sendo esta a fase de transmissão mais eficiente. Em rebanhos positivos, a forma  
22 iatrogênica, a palpação retal, e o uso de luvas contaminadas, são as formas de transmissão mais  
23 comuns (RODRIGUES et al., 2011). Piper e colaboradores (1975) verificaram que a transmissão  
24 horizontal para leucose bovina ocorre e pode ser utilizada como uma medida de controle para erradicar  
25 a doença separando os animais infectados dos não infectados.

26 A transmissão via insetos hematófagos, dentre eles os tabanídeos, principalmente a mosca do cavalo  
27 (*Tabanus fuscicostatus*) podem agir como vetores em regiões com grandes densidades populacionais  
28 destes insetos. A transmissão depende do número de picadas, da quantidade de sangue retida no  
29 aparelho bucal do inseto após a alimentação, da susceptibilidade dos hospedeiros e dos hábitos  
30 alimentares do vetor, em criações nas quais há pouco espaço entre animais os insetos hematófagos  
31 podem atuar como via de transmissão para BLV (RODRIGUEZ et al., 2011; JUNIOR et al., 2001).

32 A transmissão vertical pode ocorrer por via uterina ou oral através da ingestão de colostro e leite  
33 contendo linfócitos contaminados com BLV. O risco de infecção no rebanho leiteiro aumenta durante  
34 o período periparturiente (DITTRICH, 2004).

## 1    **2.4 Patogênese e Sinais Clínicos**

2    O período de viremia pós-infecção é considerado curto, já o período de latência é longo antes do  
3    aparecimento dos sinais clínicos. Após 10 a 12 dias as partículas virais estão presentes na corrente  
4    sanguínea e estimulam uma resposta imune humoral com produção de anticorpos específicos para as  
5    proteínas p24 e gp51 (JUNIOR et al., 2001; PORTETELLE et al., 1978).

6    Cerca de 30% dos animais infectados podem apresentar linfocitose persistente, e de 2 a 5% podem  
7    desenvolver linfossarcoma (DOMENECH et al., 2000; JUNIOR et al., 2001).

8    Os sinais clínicos dependem da localização dos linfossarcomas. A linfadenomegalia pode ser comum,  
9    mas esta hiperplasia pode ocorrer em linfonodos viscerais. Com frequência ocorre invasão do sistema  
10   digestório, sendo comum no abomaso, gerando obstruções e úlceras levando a anorexia, timpanismo  
11   recorrente e perda de peso. A neoplasia na bainha da medula espinhal gera perturbações neurológicas  
12   como paralisia de membros posteriores, e linfossarcomas no miocárdio resultam em falência cardíaca  
13   nos bovinos (JUNIOR et al., 2001; JOHNSON; KANEENE, 1991a).

14   Os linfossarcomas podem ser encontrados em outros órgãos como rins, útero e na periferia do nervo  
15   óptico causando exoftalmia. Quando presentes na cavidade abdominal eles podem ser identificados  
16   por palpação retal, porém quando se desenvolvem em linfonodos ou outro órgão existe uma  
17   dificuldade para realizar o diagnóstico. Os linfossarcomas são encontrados com maior frequência em  
18   animais entre três a oito anos de idade, onde geralmente a doença é fatal (JUNIOR et al., 2001).

## 19   **2.5 Diagnóstico**

20   O diagnóstico clínico pode ser realizado por patologia clínica, pela observação do aumento persistente  
21   do número de linfócitos B (linfocitose persistente) e por sorologia, para a identificação de anticorpos  
22   específicos contra os antígenos do BLV.

23   Segundo da OIE as técnicas utilizadas para a detecção do agente são: isolamento viral a partir do co  
24   cultivo com PBMC em células de pulmão fetal bovino (FBL) durante três a quatro dias, onde  
25   apareceram sincícios, ou pelo cultivo do PBMC durante três dias, para a detecção dos antígenos p24 e  
26   gp51 no sobrenadante da cultura através das técnicas de imunodifusão em Agar - gel (IDGA), ensaio  
27   imunoenzimático (ELISA) e radioimunoensaio (RIA). Outro método utilizado é a detecção de ácidos  
28   nucléicos através da técnica de PCR (prova alternativa para o comercio internacional) que detecta o  
29   provirus da leucose bovina. Os iniciadores das regiões do gene *gag*, *env* e *pol* são descritos na  
30   literatura e podem ser usados no diagnóstico. Além disso, eles recomendam o uso da PCR para  
31   confirmar resultado da sorologia quando: forem analisados animais jovens com a presença de  
32   anticorpos colostrais; em caso de tumor para diferenciar entre linfoma esporádico e infeccioso; casos  
33   com resultado duvidoso no teste de ELISA; novas infecções antes que possam ser produzidos  
34   anticorpos contra o vírus; análise de animais em centro de análises de descendência e em bovinos  
35   utilizados na produção de vacinas. As amostras recomendadas para a utilização da técnica de PCR são  
36   PBMC ou capa leucocitária (OIE, 2008).

37   Existem ainda outros exames como o histopatológico que revela uma distribuição característica de  
38   tumores de acordo com a idade dos animais infectados por BLV (JUNIOR et al., 2001). O teste de

1 indução de formação de sincício é uma técnica utilizada em cultura de células co-cultivadas com  
2 linfócitos de animais infectados com BLV. Esta técnica se baseia na habilidade da gp51, presente no  
3 envelope viral, de induzir a fusão celular, e não sofre interferência dos anticorpos colostrais. Por isso,  
4 é um teste útil na identificação de bezerros recém nascidos infectados pela via vertical (JUNIOR et al.,  
5 2001; FERRER & DIGILO, 1976).

6 Os anticorpos contra o BLV só podem ser detectados por provas sorológicas entre a terceira e a  
7 décima sexta semana e após a infecção. A presença de anticorpos maternos pode durar de seis a sete  
8 meses no sangue circulante do bezerro. Pelos testes sorológicos não é possível distinguir entre uma  
9 infecção recente de uma já pré-existente independente da idade do bovino infectado (OIE, 2008).

10 A OIE preconiza duas técnicas sorológicas o IDGA e ELISA para identificar a presença de anticorpos  
11 contra BLV. No Brasil, teste de IDGA continua sendo o teste ouro, devido a sua praticidade, baixo  
12 custo e a boa especificidade.

## 13 **2.6 Controle**

14 O conhecimento da patogênese é usado como instrumento para desenvolvimento de estratégias de  
15 prevenção contra a infecção de BLV (RODRIGUEZ et al., 2011).

16 Várias formas podem ser utilizadas para erradicar ou minimizar a transmissão do vírus dentro de um  
17 rebanho. Todas iniciam a partir de um levantamento sorológico para identificar os animais positivos e  
18 negativos. Em um programa de eliminação do animal é necessário mais de um método para identificar  
19 com certeza se um animal é positivo, como IDGA, PCR, dentre outros. O IDGA é um método  
20 eficiente, requer pouco investimento e o rebanho pode ficar livre do vírus da leucose bovina quando há  
21 segregação ou eliminação dos animais positivos. Porém para que um programa de erradicação  
22 funcione é necessária uma política de compensação, devido à perda do animal positivo, e por isso é  
23 impraticável em rebanhos médios e grandes; além disso, necessita de vigilância constante. Esta  
24 técnica de eliminar os animais positivos do rebanho funcionou com sucesso na Europa Ocidental, onde  
25 os rebanhos são pequenos. A Dinamarca foi o primeiro país a realizar um programa de controle que  
26 erradicasse a doença. Este iniciou em 1959, a doença tornou-se de comunicação obrigatória, e todos os  
27 animais diagnosticados como positivos foram eliminados do plantel. Os proprietários receberam  
28 indenizações. A política de erradicação continuou até 1982 (JUNIOR, et al., 2001; DIGIACOMO,  
29 1992). Porém esta pratica é aplicável apenas em rebanhos pequenos e com baixos índices de  
30 prevalência (RODRIGUEZ et al., 2011).

31 Outra forma de controle é realizar a separação dos animais infectados dos demais com distância  
32 mínima de 200m, o que não requer abate dos animais, porém necessita de estrutura física para separar  
33 os animais infectados dos não infectados. Isto gera um aumento do custo de produção, e a propriedade  
34 corre o risco de introdução de novos animais soropositivos no rebanho se o controle não for eficiente.  
35 A separação dos animais diminui o risco de transmissão iatrogênica, ou por vetores mecânicos. O uso  
36 de colostro livre de BLV, também é uma medida importante, prevenindo a transmissão vertical da  
37 infecção. Embora essas medidas gerem resultados lentos e em longo prazo, elas são satisfatórias,  
38 reduzindo a incidência da doença por bloquear a transmissão, evitando novas contaminações  
39 (RODRIGUEZ et al., 2011; JUNIO et al., 2001, DIGIACOMO, 1992b; JOHNSON; KANEENE,  
40 1991c).

1 A adoção de medidas de biossegurança e controle para evitar o contato do agente com o animal é uma  
2 boa opção para controlar o vírus da leucose bovina. O custo é baixo, sem necessidade de eliminação  
3 do animal, porém é um trabalho árduo, requer a cooperação de todos os funcionários envolvidos para  
4 seguir as regras de manejo determinadas, bem como o seu treinamento, e necessita de um longo  
5 período para conseguir os resultados (RODRIGUEZ et al, 2011).

6 A vacinação para doenças causadas por retrovírus ainda vem sendo um desafio para muitos  
7 pesquisadores. Em relação à leucose enzoótica bovina, não existem vacinas disponíveis.

## 8 **2.7 Importância econômica**

9 A infecção por BLV pode gerar perdas econômicas de várias maneiras, como perdas na exportação  
10 para mercados que exigem animais livres de infecção e custos com diagnóstico. Também ocorre o  
11 descarte prematuro ou morte de animais que apresentam alto potencial genético devido à ocorrência de  
12 linfossarcoma, e a condenação de carcaça em frigorífico com serviço de inspeção sanitária  
13 (DIACOMO 1992b).

14 Em um rebanho leiteiro infectado por BLV foi observado que a medida que o número de lactações  
15 aumenta e a idade do animal a prevalência do BLV também aumentava, o teste de ELISA foi realizado  
16 em amostras de leite de vários rebanhos (ERSKINE et al, 2012)

17 A infecção por BLV pode gerar um comprometimento do sistema imune que às vezes pode ocasionar  
18 em uma redução na produção, além do aparecimento de infecções secundárias devido à  
19 imunossupressão, levando a um descarte precoce de animais. Rebanhos infectados por BLV podem  
20 apresentar uma produção de leite menor com maior taxa de descarte de animais quando comparados a  
21 rebanhos livres de infecção por este vírus (TRAININ et al, 1996; RAJÃO, 2008).

## 22 **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

### 23 **3.1 Amostras sorológicas**

24 Amostras de sangue periférico foram coletadas de 180 bovinos de duas propriedades experimentais em  
25 Minas Gerais. Destas amostras, 73 são de animais da Fazenda Experimental X e 107 de animais da  
26 fazenda Experimental Y.

27 As amostras de soro bovino foram coletadas por punção venosa da veia caudal, com tubo de sete ml  
28 sistema de vácuo (*Vaccutainer - fabricante*) sem anticoagulante. As amostras foram colocadas em  
29 estantes para diminuir o atrito em caixa de isopor sendo encaminhadas sob refrigeração 8°C para o  
30 Laboratório de Retrovírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de  
31 Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As amostras foram centrifugadas a  
32 2359 g por 10 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada. Os soros foram aliquotados e identificados.  
33 Uma parte foi utilizada para realização do exame de Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA) e a outra  
34 foi armazenada a - 20°C para uso posterior.

### 1 3.2 Teste de Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA) com antígeno comercial - A

2 Todas as amostras sorológicas foram submetidas ao teste de IDGA (MILLER et al., 1981) para  
3 diagnóstico de leucose bovina, com o antígeno comercial TECPAR, que será chamado de antígeno A  
4 que apresenta a proteína gp 51 neste trabalho. Para isto, foram utilizadas placas de petri com diâmetro  
5 de 90 X 15 mm contendo 20 ml de Ágar Noble<sup>1</sup> diluído em tampão como descrito pelo fabricante.  
6 Após a solidificação do Ágar, em cada placa de petri foram feitas sete rosetas com o auxílio de um  
7 perfurador padrão com sete furadores de três mm de diâmetro, sendo um central e seis periféricos,  
8 distanciados três mm entre si. O antígeno e o soro padrão comercial utilizados, foram hidratados com  
9 um ml da solução diluente fornecida no kit e usados somente após a completa diluição dos mesmos  
10 conforme instruções. Foram pipetados 25 µl de todos os componentes: soro padrão, antígeno e  
11 amostras. Na figura 3, é apresentado um desenho esquemático de disposição das rosetas na placa de  
12 petri. O poço vermelho representa o local onde o antígeno foi adicionado. Os poços em verde  
13 representam o soro padrão e os poços em azul representam as amostras a serem testadas, três por  
14 placa.

15

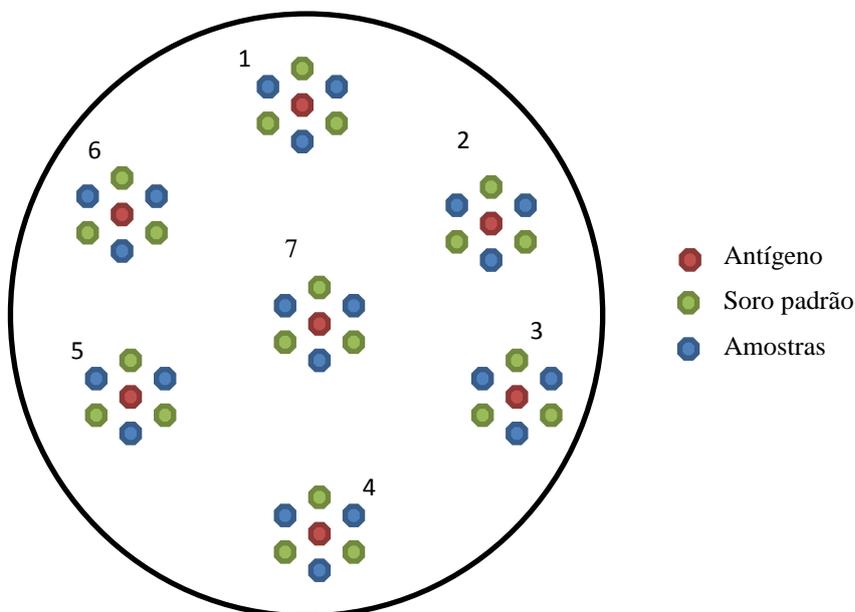


Figura3: Desenho esquemático da placa utilizada para o exame de IDGA.

<sup>1</sup> Agar Noble marca Difco.

1 As placas foram incubadas em uma câmara úmida com azida sódica a 1% para evitar a desidratação e  
2 o aparecimento de fungos, pelo período de 72 horas à temperatura ambiente. A leitura no foco de luz  
3 foi feita 48 e 72 horas após a realização do teste. A fim de evitar erros na análise dos resultados, a  
4 leitura foi realizada por três pessoas. As amostras que apresentaram resultados inconclusivos foram  
5 repetidas.

### 6 **3.3 ELISA**

7 Todas as amostras sorológicas foram testadas no ELISA comercial da marca IDEXX (QUAL  
8 DELES), para detecção de anticorpos anti – gp51 do vírus BLV, conforme instruções do fabricante. A  
9 leitura foi realizada no leitor de ELISA<sup>2</sup>no comprimento de 450nm. Os resultados obtidos foram  
10 digitados no programa EXCEL e calculados a partir da seguinte fórmula: S/N (%) = 100 X  
11 Absorbância da amostra/ média da absorbância do controle negativo, seguindo as recomendações do  
12 fabricante. Para validar o teste, a média da absorbância do controle negativo deve ser maior ou igual a  
13 0,600 A S/CN.

### 14 **3.4 Isolamento viral**

15 Para o isolamento viral, foram escolhidos animais dos dois rebanhos com resultado positivo no teste  
16 de IDGA e que apresentavam critérios importantes relacionados com a doença, como idade e  
17 aparecimento de lesões características.

18 Foram selecionados cinco animais da fazenda X, e dois da fazenda Y, que apresentavam anticorpos  
19 contra o vírus da leucemia bovina. Dois animais da fazenda X que eram negativos na sorologia pelo  
20 exame de IDGA, foram usados como controle negativo do isolamento.

21 A linhagem celular utilizada no isolamento viral foi a Tb1lu (linhagem epitelial de pulmão de morcego  
22 da espécie *Tadarida brasilienses*) ATCC, CCL-88, pois esta linhagem é susceptível ao vírus da  
23 Leucemia bovina (GRAVES & FERRER, 1976). A célula foi mantida aderida em garrafa plástica com  
24 área de 75 cm<sup>2</sup>. O meio utilizado foi o Meio Essencial Mínimo de Eagle<sup>3</sup>suplementado com 10% de  
25 soro fetal bovino (SFB), 1% (8 µg/ml) de antibiótico (penicilina / estreptomomicina) e 0,5%  
26 (2,5µg/ml)de anfotericina B para propagação celular. As garrafas foram incubadas a 37°C e atmosfera  
27 a 5% de CO<sub>2</sub><sup>4</sup>.

28 No dia anterior à inoculação, foram preparadas placas de seis poços com a linhagem celular Tb1lu. A  
29 concentração celular utilizada por placa foi de 60.000 células por cm<sup>2</sup> distribuídos em meio MEM com  
30 10% de SFB e suplementos. Cada poço da placa recebeu três ml da suspensão celular. As placas foram  
31 incubadas em estufa a 37°C e atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> pelo período de 24 horas.

32 De cada animal selecionado para o isolamento viral, foram coletados cinco tubos com sangue total de  
33 4,5 ml por animal pelo sistema de vácuo (*vaccuntainer*) com o anticoagulante EDTA. As amostras

---

<sup>2</sup> Marca Thermoplate.

<sup>3</sup> MEM Gibco.

<sup>4</sup> Thermo Scientific, series II Water Jacket CO2 Incubator.

1 foram encaminhadas para o laboratório de Retrovíruses do Departamento de Medicina Veterinária  
2 Preventiva, sendo centrifugadas a 624 g por dez minutos a 4°C, para a separação dos glóbulos brancos,  
3 hemácias e plasma.

4 A técnica utilizada para extração de leucócitos foi a de ficoll (KENYON & PIPER, 1977), com  
5 algumas modificações foram realizadas. Foi utilizada apenas a camada leucocitária, também chamada  
6 de papa de leucócito (PL) que foi coletada com o auxílio de uma pipeta monocal de um ml e  
7 transferida para um tubo cônico de plástico de 15 ml, sendo um por amostra. A PL foi diluída com  
8 meio MEM na proporção de 1:1 volume/volume. Em outro tubo foi adicionado ficoll em volume igual  
9 ao da diluição obtida de cada amostra. A diluição da PL foi adicionada lentamente sobre a camada de  
10 ficoll. Todas as amostras foram centrifugadas a 624 g por 30 minutos a 4°C. A camada de leucócitos  
11 formada foi recolhida; transferida para outro tubo e adicionado o mesmo volume de meio MEM. Estas  
12 amostras foram homogeneizadas e centrifugadas na velocidade de 624 g por dez minutos a 4 °C.  
13 Depois o sobrenadante foi retirado de cada tubo e o precipitado celular formado foi novamente  
14 ressuspensionado em um novo meio MEM com volume final de dois ml por amostra, este procedimento  
15 foi repetido duas vezes. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspensionado em dois  
16 ml de meio MEM com 5 % de SFB.

17 Para a contagem de células viáveis em cada amostra, a diluição utilizada foi de 1:10 com azul de  
18 tripan, conforme descrito anteriormente.

19 A confluência da monocamada celular de Tb1lu foi de 80 a 90%, no momento da inoculação. Foi  
20 realizado um co-cultivo celular, e todos os inóculos de PL testados foram ajustados para a  
21 concentração de um milhão de células por ml, sendo inoculados 500µl por poço. Cada amostra foi  
22 feita em duplicata e passou pelo período de adsorção de uma hora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

23 As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C pelo período de sete dias, sendo realizadas  
24 observações diárias para avaliar a confluência celular, presença de toxicidade da amostra e/ou  
25 presença de efeitos citopáticos, especialmente sincícios. O acompanhamento de efeito citopático nas  
26 amostras foi realizado até a quinta passagem celular. Após a realização do co-cultivo, a passagem das  
27 células inoculadas foi realizada a cada 72 horas. As amostras que apresentaram efeito viral diferente  
28 do esperado, ou a ausência de efeito citopático foram descartadas do experimento. Apenas as amostras  
29 que apresentaram somente sincícios foram selecionadas e foi realizado um congelamento de cada  
30 isolado. Para isto, foi realizada a passagem da célula infectada com as amostras isoladas de campo  
31 como descritas anteriormente, porém na etapa da tripsina, esta foi retirada por completo da  
32 monocamada celular. Quando as células soltaram da monocamada celular, elas foram ressuspensionadas  
33 em 5 ml de meio MEM e homogeneizadas cinco vezes para que ocorresse a perfeita individualização  
34 das células. A concentração da suspensão celular foi ajustada para 2,0 x 10<sup>6</sup> utilizando o soro fetal  
35 bovino a 10%. Após o ajuste, foi acrescentado DMSO estéril<sup>5</sup>. A suspensão celular foi distribuída em  
36 criotubos previamente identificados pelo número do inóculo, e estocadas no freezer -80°C por 24  
37 horas. Posteriormente transferidas para o nitrogênio líquido.

---

<sup>5</sup> Marca Sigma.

### 1 3.5 Extração de DNA e amplificação de PCR

2 A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para confirmar o isolamento do BLV em  
3 células Tb11u e a ausência de partículas virais nas duas amostras de animais negativos. Foi utilizado o  
4 kit comercial de extração QIamp<sup>®</sup> DNA BloodMini kit (QIAGEN )- sangue, e kit comercial de  
5 extração QIamp<sup>®</sup> DNAMini kit (250) da QIAGEN – tecido e célula, de acordo com as instruções do  
6 fabricante.

7 Foi utilizada a região do gene *tax* do vírus BLV. Todos os *primers* foram desenhados e selecionados  
8 através do programa *Primer3web version 4.0.0*. A escolha da região *tax* foi por esta ser bem  
9 caracterizada e conservada em termos de variabilidade genética no vírus. Ela está relacionada com a  
10 expressão e replicação do BLV, além de participar da infectividade viral e patogenicidade do vírus (WU, et  
11 al; 2003).

12 As sequências dos *primers* utilizados para a região TAX foram: *forward*: CGA GAC CCA CCG TAT  
13 CAA CT e *reverse*: TTC GGA CCA GGT TAG CGT AG. A Taq utilizada foi a Gotaq Green Master  
14 Mix<sup>8</sup>. A reação do MIX para cada amostra tinha o volume final de 25 µl, dos quais era composta por:  
15 13,5 µl de água, 2,5 µl de Taq Buffer 10X, 1,0 µl de MgCl<sub>2</sub>(25mM), 2 µl de cada primer TAX (10  
16 pmoles/µl), 0,2 µl de Gotaq, 0,5 µl de dNTP (10 mM) e 150 ng/µl de DNA. As amostras foram  
17 encaminhadas para o termociclador (Applied Biosystems, veriti 96 well) para a amplificação do  
18 material genético desejado. A PCR consistiu de: 95°C por cinco minutos, 35 ciclos compostos pelas  
19 etapas de 95°C por 30 segundos para desnaturação, 50°C por 30 segundos para anelamento, 72°C por  
20 30 segundos para extensão, e para extensão final a 72°C por sete minutos.

21 Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% com 0,001% de  
22 brometo de etídio para visualização dos produtos. As bandas do gel foram visualizadas através de um  
23 transluminador com exposição à luz ultravioleta, fotografada no sistema de fotodocumentação de géis<sup>6</sup>  
24 e analisado por comparação a um marcador de peso molecular de 100pb<sup>9</sup>. O amplificado esperado da  
25 região TAX era de 697pb.

### 26 3.6 Produção do Antígeno para Leucose Bovina a partir da amostra isolada de campo

27 O protocolo utilizado para a produção do antígeno foi o do laboratório de Retrovirose da Escola de  
28 Veterinária DMVP/UFGM. Para testar o funcionamento do protocolo a produção de antígeno inicial  
29 foi realizada com a linhagem FLK.

30 Para a produção do antígeno para Leucose bovina foi escolhida a amostra isolada de um animal da  
31 Fazenda X, devido ao grande número de sincícios que esta amostra apresentava na monocamada  
32 celular. A linhagem celular infectada pelo vírus de campo isolado foi repicada em várias garrafas  
33 plásticas de tamanho A175 cm<sup>2</sup> e em garrafas de vidro de área 300 cm<sup>2</sup>, sendo realizados em etapas  
34 diferentes. Todas as garrafas com a monocamada celular infectada foram congeladas a -20°C e  
35 descongeladas a temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido três vezes para rompimento da  
36 membrana celular e consequente liberação de partículas virais para o sobrenadante. O mesmo  
37 procedimento foi realizado para produção de um antígeno apenas com a linhagem celular para  
38 comparar possível reação cruzada de anticorpos contra proteínas presentes na linhagem celular.

---

<sup>6</sup> L-PIX da Loccus Biotecnologia.

1 Foram recolhidos 200 ml da suspensão celular das garrafas inoculadas em um béquer de 1 litro para  
2 que a amostra ficasse homogênea, depois foram fracionados em tubos e centrifugados a 2359 g por 30  
3 minutos a 4°C para clarificação. Após este procedimento, o sobrenadante foi recolhido em um béquer.  
4 Para cada ml do sobrenadante coletado, foi adicionado 0,314 gramas de sulfato de amônio PA. O  
5 sulfato de amônio foi adicionado aos poucos ao sobrenadante, que se encontrava sob agitação por  
6 barra magnética em uma câmara frigorífica a 4°C. O material ficou sob agitação por duas horas para  
7 que houvesse a precipitação das proteínas presentes na solução. Após esta etapa, o material foi  
8 centrifugado novamente a 4°C por 4754 g por 30 minutos.

9 Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado formado no fundo do tubo foi  
10 ressuspenso em um a dois ml de água destilada, variando de acordo com o volume de precipitado  
11 obtido. A suspensão foi transferida para uma membrana de diálise da marca Millipore com 20 mm de  
12 diâmetro previamente tratada segundo as recomendações do fabricante. Este modelo de membrana  
13 retém proteínas a partir de 12.000 kDA. A membrana foi presa nas extremidades e colocada em um  
14 recipiente contendo tampão salina fosfato 1 X (PBS 1X). O volume utilizado de PBS 1X foi de seis  
15 litros, sendo que este foi trocado após dez horas. A membrana ficou neste recipiente sobre agitação  
16 lenta em um agitador magnético por 18 horas a 4°C.

17 Após o procedimento de diálise, a membrana foi retirada do aparato e colocada em um cuba plástica  
18 contendo polietileno glicol 6000 (PEG 6000) da marca SIGMA-ALDRICH (EUA), para que ocorresse  
19 a concentração do antígeno formado. A membrana permaneceu no PEG por um período de uma hora e  
20 30 minutos a duas horas variando de acordo com o volume presente dentro da membrana, para que o  
21 volume final fosse reduzido oito vezes o inicial. O antígeno foi recolhido da membrana e foi  
22 adicionado 10 µl de inibidor de protease (marca SIGMA) para cada ml de antígeno, para que este não  
23 fosse degradado.

24 Para testar o antígeno produzido, foi realizado um gel de Agar Noble na concentração de 0,8% em  
25 tampão fosfato pH 7,2. Esta mistura foi aquecida em microondas até dissolução completa do Agar no  
26 tampão, evitando a fervura. Foram pipetados 20 ml do Agar na placa de petri. Após endurecimento do  
27 gel, este foi furado com o perfurador com roseta especial para leucose como descrito anteriormente, no  
28 preparo do teste comercial. O antígeno foi testado em varias diluições na base dois pela técnica de  
29 IDGA 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64. A partir da posição 1 foi pipetado 25µl do antígeno bruto e  
30 demais diluições na ordem crescente, no poço central foi adicionado um soro sabidamente positivo  
31 para Leucose. A placa foi incubada em câmara úmida por 72 horas, sendo observada diariamente  
32 contra um foco de luz. O objetivo destas diluições era saber qual seria a diluição trabalho. Após  
33 escolhida a diluição, o antígeno produzido com a amostra isolada de campo do vírus da Leucose  
34 Bovina foi testado contra 20 soros de campo previamente coletadas e testadas pelo antígeno A, sendo  
35 10 positivas e 10 negativas.

### 36 **3.7 Eletroforese de Proteína (SDS-PAGE)**

37 Todos os antígenos produzidos e o antígeno comercial foram testados em gel de poliacrilamida, para  
38 avaliar quais eram as proteínas presentes no antígeno.

39 A concentração de cada amostra de antígeno foi mensurada pelo método de Bradford (BRADFORD,  
40 1976) para quantificar a concentração das proteínas. Os valores encontrados foram diluídos para obter  
41 a concentração final de 10µg/µl.

1 Após a diluição, as amostras foram preparadas para serem aplicadas em gel de poliacrilamida. Para  
2 isto, foi pipetado em um microtubo de 600µl: 30µl de PBS 1X, 10µl da amostra na concentração de  
3 10µg/µl, e 20µl do tampão de corrida da amostra para proteínas desnaturadas na concentração de 2X.  
4 Este tampão foi preparado com 3 ml da solução de Tris HCl 0,5M pH 6,8 (6 gramas de Tris para  
5 100ml de água destilada), 2,4 ml de Glicerol, 4,8 ml de SDS 10%, 0,6 ml de azul de bromofenol a  
6 0,2% e 1,2 ml de beta-mercaptoetanol. Os microtubos foram aquecidos em ebulição por 10 minutos.

7 O gel utilizado para a corrida foi o Amersham™ ECL™ Gel 4% gel de empilhamento e 12% gel de  
8 corrida. Em cada poço do gel foi pipetado dez microlitros de cada amostra, numa canaleta foram  
9 pipetados cinco microlitros do padrão de peso molecular BanchMark com faixa de 10 a 220 kDA. A  
10 corrida foi realizada segundo as instruções do fabricante e o gel foi corado pela coloração de  
11 Coomassie Bleu 0,2%, preparado a partir de 1,25g de Coomassie blue R250, 225ml de metanol, 45ml  
12 de ácido acético glacial e 225ml de água destilada. O gel foi corado por trinta minutos nesta solução  
13 sob agitação. Posteriormente foram realizadas várias lavagens do gel com a solução descorante  
14 composta por: 45 ml de etanol, 90 ml de ácido acético glacial e 850 ml de água, até obter total  
15 descoloração.

### 16 **3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

17 Neste trabalho foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão para avaliar a presença  
18 e as características morfológicas do vírus da leucose bovina na amostra isolada utilizada na produção  
19 do antígeno. A técnica de Flat embedding ou inclusão plana (JORGE e CASTRO, 2000) foi escolhida  
20 para ser utilizada pela possibilidade de inclusão em resina apenas da parte de interesse, que neste  
21 trabalho era a presença de sincícios na monocamada celular da amostra viral selecionada para a  
22 produção do antígeno. A linhagem celular Tb1lu foi utilizada como controle negativo e a linhagem  
23 celular FLK persistentemente infectada como controle positivo (DITRICH, 2004; TROIANO et al,  
24 2012).

25 As células Tb1lu infectadas pela amostra utilizada na produção do antígeno, a linhagem celular FLK e  
26 Tb1lu não infectada foram crescidas em placas de petri de vidro de 15 cm de diâmetro na concentração  
27 de 60.000 células por cm<sup>2</sup>, em meio MEM com 10 % SFB, 1% de P/S e 0,5% de anfotericina B. As  
28 placas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C e 5%CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, as placas foram fixadas  
29 com três ml da solução de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1M. As placas ficaram armazenadas a  
30 4°C por 24 horas. Após este período, o fixador foi retirado e adicionaram-se três ml de tampão  
31 cacodilato, que ficou na monocamada celular até a entrega das amostras no Centro Microscopia  
32 Eletrônica da UFMG para serem preparadas por técnicas específicas até o procedimento de leitura.

### 33 **3.9 Análise Estatística**

34 Para analisar se há diferença na sensibilidade clínica dos diferentes diagnóstico foi utilizado o teste de  
35 McNemar's. O índice kappa foi usado para determinar a concordância entre os resultados  
36 positivos/negativos entre as técnicas utilizadas. A força de concordância foi descrita < 0,2  
37 concordância pequena, 0,2 a 0,4 concordância favorável, 0,4 a 0,6 concordância moderada, 0,6 a 0,8  
38 concordância considerável (alta), > 0,8 concordância perfeita (LANDES and KOCK, 1977).O  
39 programa utilizado foi o GraphPadh.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

1

### 2 **4.1 Isolamento viral**

3 A técnica de isolamento é um método direto utilizado para o diagnóstico em virologia, sendo  
4 considerada a mais específica. A principal vantagem desta técnica é a possibilidade confirmar a  
5 presença do agente na célula, além de poder usar o vírus isolado em futuras caracterizações e testes de  
6 diagnósticos (PEREIRA E COSTA, 2008).

7 Das sete amostras positivas na sorologia escolhidas para realizar o isolamento viral a partir do PBMC,  
8 apenas quatro apresentaram sincícios, sendo três amostras da fazenda X e uma da fazenda Y.

9 As duas amostras negativas testadas não apresentaram efeito citopático característicos do vírus da  
10 leucose bovina, que é promovido pela presença de algumas proteínas virais como a gp51. O  
11 isolamento do vírus desses animais funcionou como controle negativo deste experimento, pois  
12 demonstrou que a presença dos sincícios observados na monocamada celular do isolamento com  
13 animais positivos na sorologia indicavam a presença do vírus da leucose bovina.

14 As alterações morfológicas na monocamada celular variaram de acordo com o inoculo de cada animal  
15 testado. Estas alterações foram observadas a partir da segunda passagem celular após a inoculação das  
16 células periféricas mononucleares. Nas amostras que apresentaram sincício as células ficaram mais  
17 aglomeradas, com formação de uma “massa celular” parecida com tumor bem demarcada ao longo da  
18 monocamada celular, como pode ser observado na figura 4. Essa alteração morfológica ocorre na  
19 presença de vírus oncogênicos como o da leucose bovina (KNIPE & HOWLEY,2007).

20 O surgimento de sincícios foi observado a partir da quarta passagem celular em todas as amostras  
21 testadas. Nos primeiros sincícios que apareceram na monocamada, foi contado o número de núcleos de  
22 cada sincício e somente eram considerados como efeito citopático aqueles que apresentavam mais de  
23 cinco núcleos. Os sincícios aumentaram em número e tamanho à medida que novas passagens  
24 celulares foram realizadas. Todas as amostras isoladas foram repicadas a cada 72 horas e através da  
25 visualização diária ao microscópio óptico, foi observado o aumento do número de sincícios em  
26 quantidade e tamanho, até ficarem constantes. Esse resultado já era esperado, conforme os relatos de  
27 Graves e Ferrer (1976), que realizaram isolamento do vírus da leucose bovina a partir de células  
28 periféricas mononucleares de uma vaca com linfocitose. Eles testaram o isolamento do vírus em várias  
29 linhagens celulares, inclusive a Tb11u, a mesma utilizada neste experimento. Esses autores verificaram  
30 um aumento progressivo do número de sincícios nas quatro primeiras semanas. Na sexta semana  
31 houve diminuição do número de sincícios, permanecendo constante até a vigésima segunda semana.  
32 Ainda neste trabalho, Graves e Ferrer (1976) concluíram que os sincícios e células infectadas  
33 apareciam primeiro nas passagens celulares e só posteriormente era possível detectar partículas virais  
34 em outras técnicas como a de PCR.

35 Ao realizar a PCR das amostras nas passagens iniciais após o surgimento do sincício, não foi possível  
36 detectar banda em todas as amostras testadas. Porém, à medida que o número de passagem celular foi  
37 aumentando foi possível detectar a presença do DNA proviral em todas as amostras testada. Estes  
38 resultados sugerem que seja estabelecido um número mínimo de passagens celulares das amostras  
39 inoculadas para a realização de outras técnicas para detectar a presença de partículas virais ou a  
40 presença de DNA proviral.

1 Das três amostras da fazenda X, uma foi descartada devido ao aparecimento de outro efeito citopático  
2 viral, que surgiu na décima passagem celular, este efeito viral era semelhante ao do *Herpesvírus*  
3 *Bovino* tipo I que causa a doença Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR). O efeito citopático observado  
4 foi a formação de estruturas semelhantes a “cachos de uva” na monocamada celular, com destruição  
5 da mesma (ROCHA, 1999). Este efeito não era compatível com infecção por Retrovírus, como pode  
6 ser observado na figura 5. Mesmo após visualização deste efeito citopático, foi realizado mais um  
7 repique celular, porém houve destruição de toda a monocamada celular pela presença do outro vírus.  
8 Infelizmente a possibilidade do aparecimento de outro vírus já era esperada, pois os animais da  
9 fazenda X escolhidos para a realização do isolamento viral apresentavam idades superiores a cinco  
10 anos de idade, além disso, sabe-se através do histórico da fazenda, que existem animais infectados  
11 com o *Herpesvirus Bovino* tipo 1 e o vírus *Bovine Viral Diarrhea Virus*. Frangoloso e colaboradores  
12 (2008) realizaram um estudo da prevalência de animais de gado leiteiro de uma região Rio Grande do  
13 Sul para Leucose bovina, Diarréia viral bovina, Rinotraqueíte bovina e Neosporose bovina. Eles  
14 avaliaram 26 propriedades, em 10 delas eles encontraram animais positivos para BLV e BVDV e  
15 BoHV, ou seja é possível que ocorra co-infecção entre esses vírus em rebanho leiteiro.

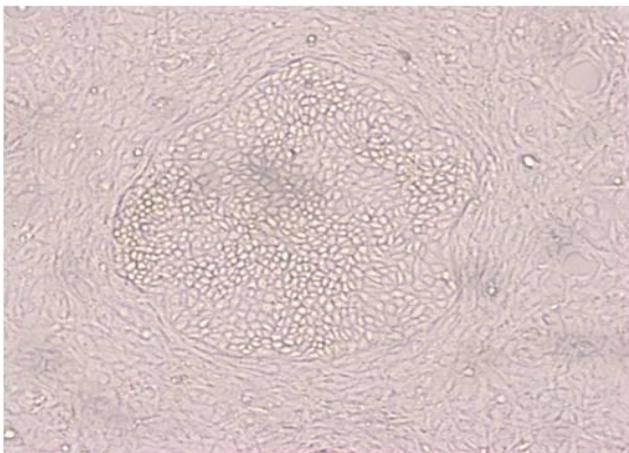


Figura 4: Célula Tb1lu inoculada com PBMC da fazenda X, aparecimento da massa celular com morfologia diferente da monocamada celular na segunda passagem celular após infecção. Aumento de 100X no microscópio óptico.

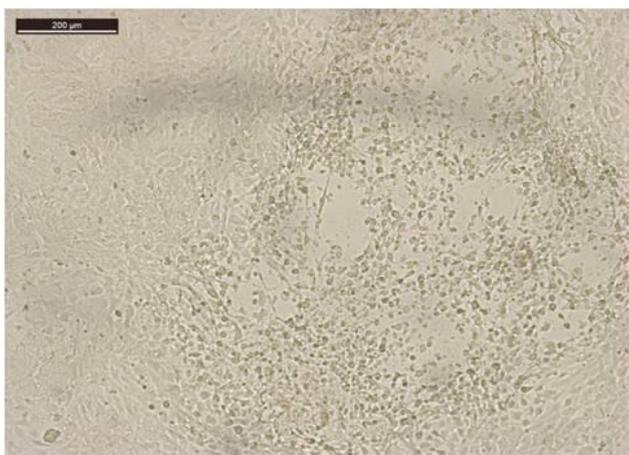


Figura 5: Efeito citopático que surgiu na décima passagem celular após inoculação do PBMC de um animal infectado com VLB em uma das amostras isoladas da fazenda X. Aumento de 100X no

1 A figura 6a mostra o controle negativo utilizado no experimento, a monocamada da linhagem celular  
2 Tb1lu corada pela coloração de May-Grunwald-Giemsa no aumento de 200X. Nesta figura, pode-se  
3 observar que a morfologia da célula é epitelial e que não há presença de sincícios na monocamada.

4 A figura 6b representa uma das amostras na qual foi possível realizar o isolamento viral na décima  
5 passagem celular pós-inoculação. Esta foi corada pela coloração de May-Grunwald-Giemsa, para  
6 evidenciar a presença dos sincícios na monocamada celular. Nela pode ser visualizada a presença de  
7 10 sincícios com vários núcleos em apenas um campo. Nos sincícios maiores, os núcleos estão  
8 corados em roxo e o citoplasma em azul claro. Além disso, podem ser observados pequenos  
9 agrupamentos de três núcleos em vários pontos da monocamada celular, e, se comparado com o  
10 controle negativo presente na figura 4a, a morfologia celular está alterada, pois as células se encontram  
11 mais arredondadas e desorganizadas, com presença vacúolos citoplasmáticos (CALAFAT and  
12 RESSANG, 1977). Essas alterações só foram observadas após a coloração da monocamada celular.

13 Na figura 7 pode ser vista a amostra positiva escolhida para a produção do antígeno na quinta  
14 passagem celular após a infecção por co-cultivo com PBMC para isolamento viral a partir de um  
15 animal de campo. A seta em vermelho indica a presença de um sincício sem coloração, no aumento de  
16 200X. Isto sugere que, para avaliar as alterações morfológicas do BLV na monocamada celular, a  
17 melhor opção é, após coloração da mesma, que evidencia estruturas celulares como o núcleo e  
18 citoplasma; facilitam a contagem dos núcleos e visualização dos sincícios presentes. A amostra em  
19 apreço foi escolhida para a produção do antígeno. Apesar de estar representada apenas uma amostra do  
20 isolamento viral, todas as outras apresentaram as mesmas características em termos de efeito  
21 citopático. Esta amostra continuou a ser repicada a cada 72 horas para a produção de antígeno, e  
22 sempre foi observada a presença de sincícios durante todo o período de multiplicação celular.

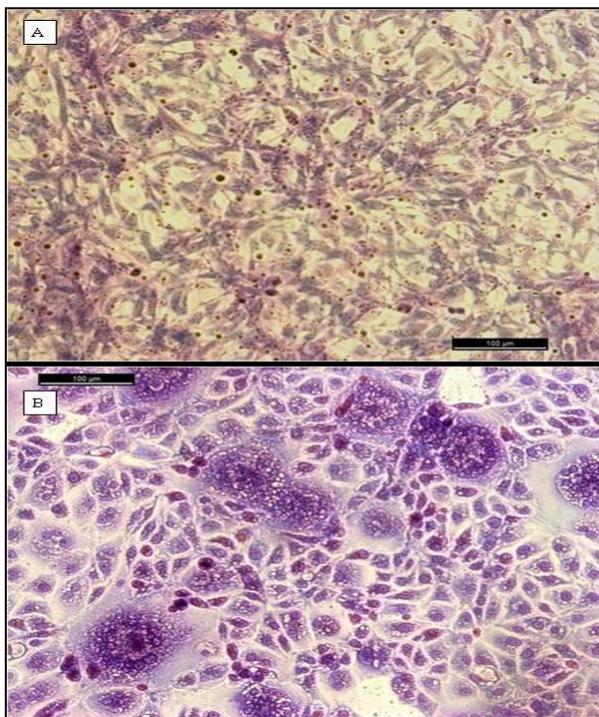


Figura 6: A - Controle negativo do isolamento BLVna linhagem celular Tb1lu, aumento de 200X . B - Presença de vários sincícios na monocamada celular. Amostra do animal 41 da fazenda X, coloração



10 Figura 7: Foto de um sincício de uma amostra isolada de campo sem coloração. Aumento de 200X.

11 A amostra da fazenda Y apresentou sincício a partir da terceira passagem celular, sendo que na oitava  
12 passagem era possível ver pelo menos um sincício por campo. Porém, na décima passagem o número  
13 de sincícios começou a diminuir e as células não apresentavam um bom crescimento. Mesmo com o  
14 aumento do soro fetal bovino para 15% não foi possível prosseguir com o repique, e foi descartada a  
15 possibilidade de produzir o antígeno com esta amostra.

16 Várias podem ser as hipóteses que levaram a este resultado. Um fator que pode ter levado à  
17 diminuição do número de sincícios seria devido ao fato de apenas uma subpopulação de células, serem  
18 capazes de realizar a transcrição viral em cultura de célula. Graver e Ferrer (1976) observaram este  
19 fato em células de ovino e caprino infectadas por BLV, além disso, eles acreditam que possa existir  
20 um inibidor viral nessas culturas como interferon quando é utilizado o co-cultivo de células linfóides  
21 de bovino. Mas na linhagem Tb1lu eles observaram um aumento progressivo no número de partículas  
22 virais, o que aconteceu com todas as amostras isoladas de campo neste trabalho. Outra hipótese seria  
23 devido à variação do número de partículas virais presentes nos linfócitos circulantes e a sua  
24 capacidade de realizar a transcrição viral. Wu e colaboradores (2003) analisaram a transcrição *in vivo*  
25 dos vírus da leucose bovina e da imunodeficiência bovina, e não encontraram nenhum RNA viral nem  
26 proteína viral do BLV em linfócito isolados de PBMC por técnicas sorológicas. Porém ao analisar por  
27 RT-PCR, para a região TAX/REX eles detectaram uma baixa frequência de RNA viral, 1/2000 a  
28 1/50000 em células leucocitárias de animais infectados por BLV. Esses dados demonstraram que BLV  
29 infecta todas as subpopulações de PBMC, porém os vírus só conseguem realizar a transcrição em  
30 células B. Além desses fatores, os animais da fazenda X apresentavam idade acima de cinco anos e o  
31 animal da fazenda Z apresentou linfocitose persistente aos três anos de idade, o que não é uma  
32 característica comum da doença.

33 Devido a esses fatores apresentados, foram realizadas as técnicas de microscopia eletrônica, para  
34 estimar a quantidade de partículas virais presentes, bem como a sua morfologia e PCR da região TAX  
35 para confirmar se realmente o efeito citopático observado era referente ao isolamento do vírus da  
36 leucose bovina.

## 1 4.2 PCR: confirmação do isolamento

2 Todas as amostras que apresentaram sincício no isolamento viral, apresentaram bandas na altura de  
3 697 pb, indicando que houve amplificação do fragmento desejado. O controle negativo da reação, que  
4 era água ultra pura e o controle positivo (célula FLK infectada) funcionaram conforme esperado. A  
5 figura 8 mostra um gel de agarose com as amostras isoladas de campo.



6

7 Figura 8: Foto de um gel de agarose para a região TAX do vírus da Leucose bovina. Na primeira canaleta está o  
8 padrão de peso molecular, na segunda o controle positivo, na terceira amostra de PBMC de isolado de campo  
9 positivo pela técnica de IDGA, na quarta amostra o controle negativo da reação de PCR, na quinta amostra de  
10 PBMC de um animal negativo na técnica de IDGA, sexta não havia nenhuma amostra, sétima, oitava, nona,  
11 décima são todas amostras de campo, isoladas na linhagem celular Tb1lu amplificados por PCR para região  
12 TAX.

13 Os resultados obtidos na PCR corroboraram com os encontrados no isolamento viral, ou seja, o  
14 controle negativo (PBMC de um animal negativo na sorologia), o controle positivo (linhagem celular  
15 FLK) e amostras isoladas de campo, apresentaram os mesmos resultados independente das técnicas  
16 utilizadas, servindo como confirmação dos resultados que já eram esperados.

## 17 4.3 Microscopia Eletrônica

18 As formas mais utilizadas para visualização de partículas virais são a microscopia eletrônica de  
19 transmissão, que permite a visualização de organelas internas do objeto em estudo, e a microscopia  
20 eletrônica de varredura, que permite a visualização da parte externa do objeto estudado em três  
21 dimensões (PEREIRA E COSTA, 2008).

22 A célula Tb1lu infectada pelo vírus de campo foi fixada na sétima passagem celular. Já as linhagens  
23 FLK infectada por BLV e Tb1lu que era o controle negativo, nas passagens 64 e 72 respectivamente.  
24 O tempo para realizar a fixação de todas as linhagens testadas foi de 24 horas após repique celular.

1 Este tempo foi determinado, pois, nos trabalhos de Kettmann e colaboradores (1994) e Lhames e  
2 colaboradores (2001) eles detectaram que nas células cultivadas *in vitro*, a presença de proteínas e  
3 partículas virais são detectadas inicialmente entre três a seis horas após passagem da célula. Porém, as  
4 partículas virais estão presentes em maior quantidade entre 24 e 48 horas após a adesão da célula na  
5 superfície utilizada para crescimento da monocamada. Por isso, foi utilizado o tempo de 24 horas para  
6 a realização da fixação das amostras.

7 Tanto na linhagem celular Tb1lu infectada com o BLV e na linhagem FLK foram observadas  
8 alterações no citoesqueleto. Este se apresentava mais desorganizado quando comparado ao controle  
9 negativo, sendo esta uma característica da presença de infecção viral. Outras alterações foram  
10 observadas nas células infectadas com vírus, como: cisternas aumentadas dos retículos  
11 endoplasmáticos e presença de grande quantidade de ribossomos no citoplasma, ambos são indícios de  
12 intensa síntese de proteínas, além da presença de partículas virais.

13 A maioria das partículas virais foi visualizada extracelularmente. A linhagem FLK, controle positivo,  
14 corresponde às figuras 9. Na figura 9a pode ser visto um grupo de partículas extracelular, juntamente  
15 com restos celulares e citoesqueleto, isto já era esperado, pois Calafat e Ressang (1977) encontraram  
16 nas linhagens celulares estudadas agrupamentos de partículas virais de BLV no espaço extracelular.  
17 Esses autores também observaram vesículas citoplasmáticas contendo no seu interior partículas virais.  
18 Nas amostras visualizadas neste experimento não foi possível identificar nenhuma vesícula intracelular  
19 com partículas virais. Foi observada uma grande variação no número de partículas por campo, que  
20 pode ser devido ao plano de corte realizado durante o preparo da amostra. Porém Lhames e  
21 colaboradores (2001) encontraram várias partículas virais próximos a restos celulares como foi  
22 encontrado neste trabalho, e a justificativa seria que quando as partículas virais são liberadas da célula,  
23 ocorre uma degeneração da estrutura celular e não encontraram partículas virais dentro de vacúolos  
24 citoplasmáticos.

25 A figura 9b apresenta um pequeno grupamento de quatro partículas virais de tamanhos diferentes no  
26 meio extracelular próxima a áreas sugestivas de brotamento viral, pois a membrana celular  
27 apresentava-se descontínua. E partículas virais no citoplasma celular com morfologias semelhantes a  
28 das partículas externas, além da presença de organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e  
29 ribossomos. Estas alterações também foram encontradas por Ressang e Calafat (1977).

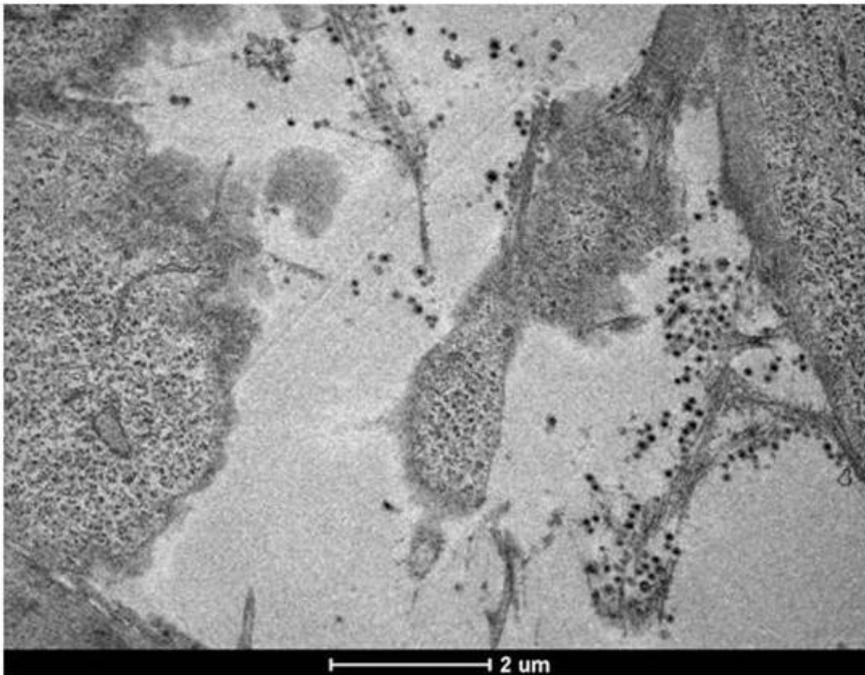
30 A linhagem celular FLK apresentou maior número de partículas virais imaturas, quando comparada à  
31 amostra isolada de campo como pode ser observado na figura 9c, durante a seção de microscopia  
32 eletrônica, vários campos semelhantes a este foram visualizados. Calafat e Ressang (1997) observaram  
33 maior número de partículas virais em cultivo rápido de células leucocitárias do que em linhagens  
34 contínuas. Algumas áreas da membrana plasmática celular apresentaram-se descontínuas, sendo estas  
35 áreas sugestivas de brotamento viral, como pode ser visto em todas as figuras. Foram encontradas  
36 partículas virais de tamanhos e formas variáveis, como podem ser visualizadas na figura 9a. Outros  
37 trabalhos mostram que existe uma grande variação no tamanho (de 75 a 150nm) e forma, e que estas  
38 alterações morfológicas podem estar relacionadas coma fase em que o vírus se encontra, pois ao sair  
39 da célula as partículas virais são imaturas, e estas podem apresentar núcleo esférico grande  
40 (CALAFAT & RESSANG, 1977; LLAMES et al, 2001).

41 As figuras 10a e 10b são micrografias do controle negativo da linhagem celular Tb1lu, as  
42 setas indicam organelas como mitocôndria, reticulo endoplasmático, complexo de golgi e  
43 membrana nuclear. Em nenhuma micrografia do controle negativo foi visualizada partícula  
44 viral. Este foi o único controle negativo possível, pois não foram encontradas amostras da  
45 linhagem FLK livre de BLV.

1 A figura 10b mostra a linhagem Tblu infectada com o vírus isolado de campo. Nela pode-se observar  
2 a presença de poucas partículas virais no meio extracelular, este resultado condiz com outros  
3 isolamentos de BLV em culturas celulares (CALAFAT & RESSANG, 1977). Foram realizadas duas  
4 seções de microscopia eletrônica, sendo cada uma de três horas para a procura de partículas virais na  
5 amostra isolada de campo, e somente neste campo observaram-se estas partículas virais características  
6 saindo da membrana celular.

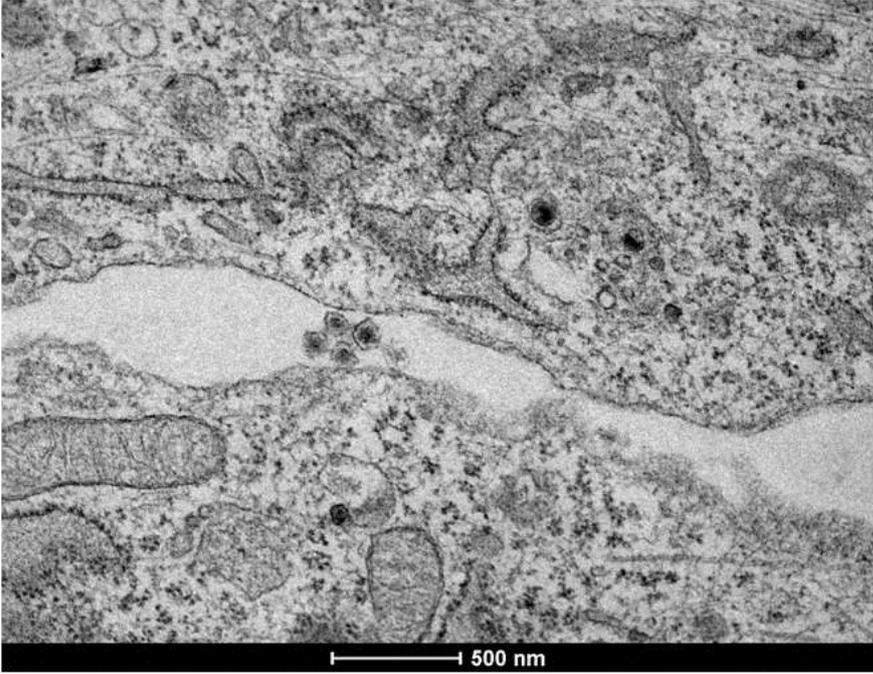
7 Graves e Ferrer (1976) relataram que em todas as linhagens testadas não foi observada a presença de  
8 partículas virais na primeira e segunda passagem da monocamada celular pós cocultivo. E mesmo após  
9 a formação de sincícios nas monocamadas testadas, a presença de vírus ainda não era detectada. Eles  
10 encontraram partículas virais ligadas a superfície celular, assim como visualizou-se na amostra  
11 controle e isolada deste experimento na figura 10b.

12 Na figura 10d, foi possível visualizar dois núcleos distintos que faziam parte de um sincício, estes  
13 estão separados por uma pequena porção de citoplasma contendo organelas como mitocôndrias,  
14 complexo de golgi e retículo endoplasmático, além de outras estruturas não identificadas semelhantes  
15 a vesículas ou vacúolos.



16

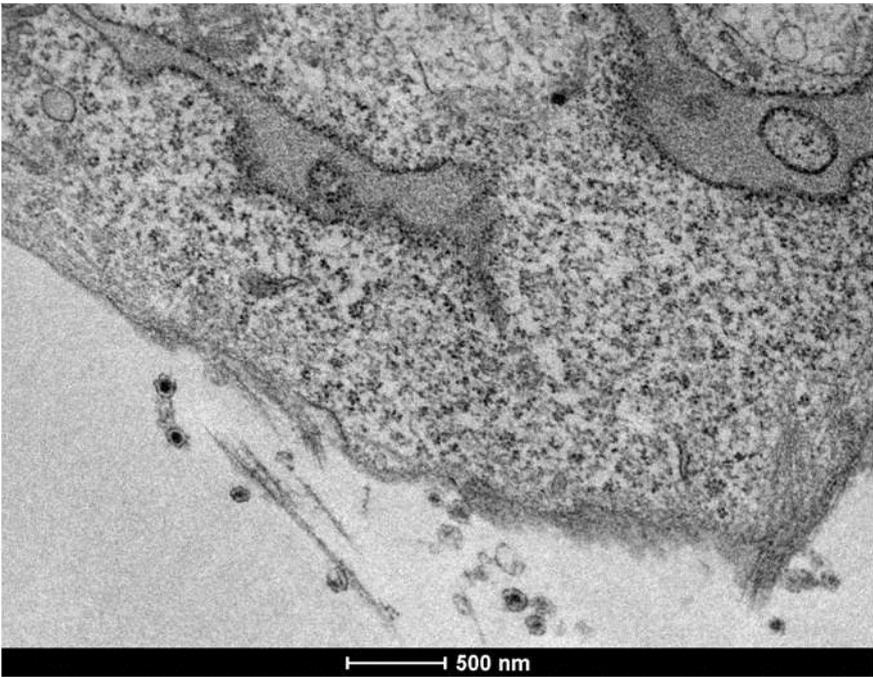
17 Figura9a: Linhagem celular FLK infectada com BLV



1

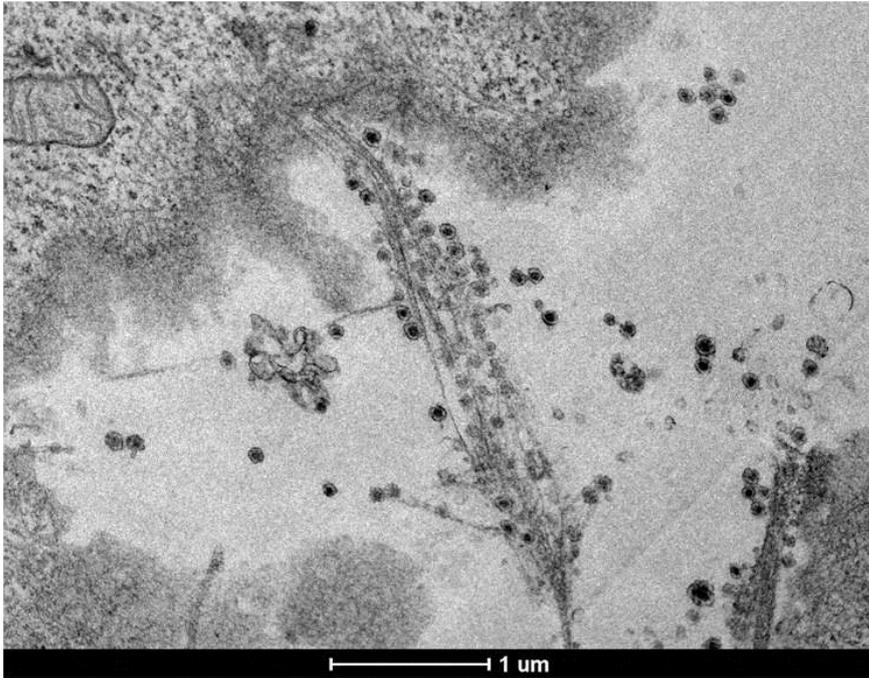
2 Figura 9b: FLK presença de partículas virais intra e extracelular.

3



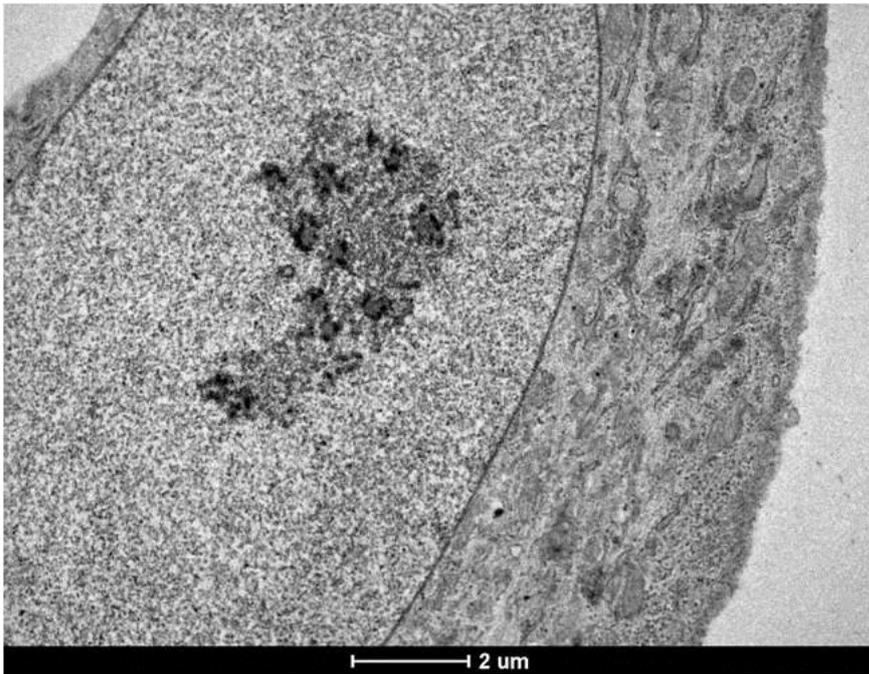
4

5 Figura9c: FLK retículo endoplasmático e partículas de BLV.



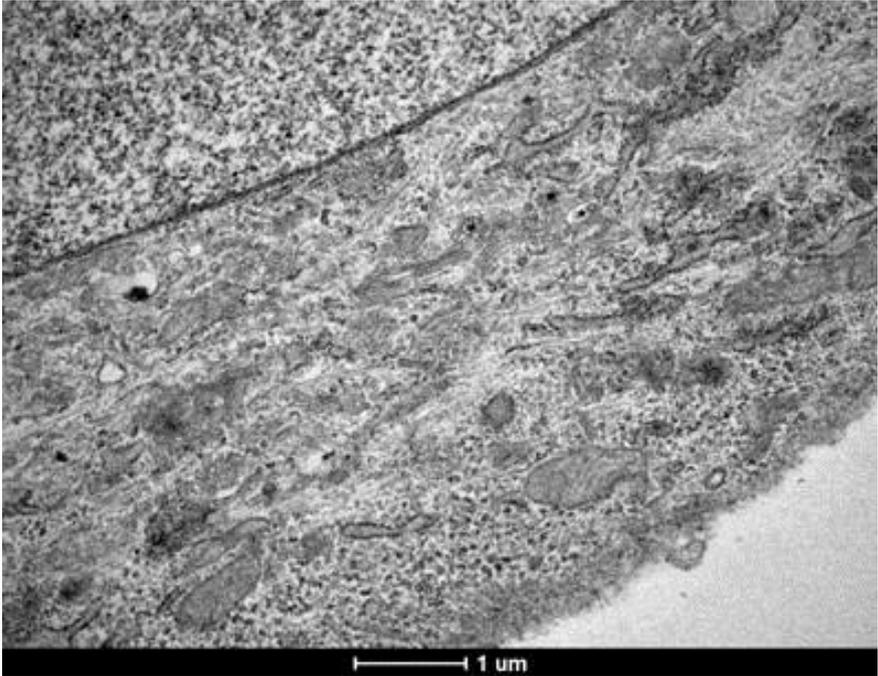
1

2 Figura9d: FLK, citoesqueleto e partículas virais no meio extracelular.



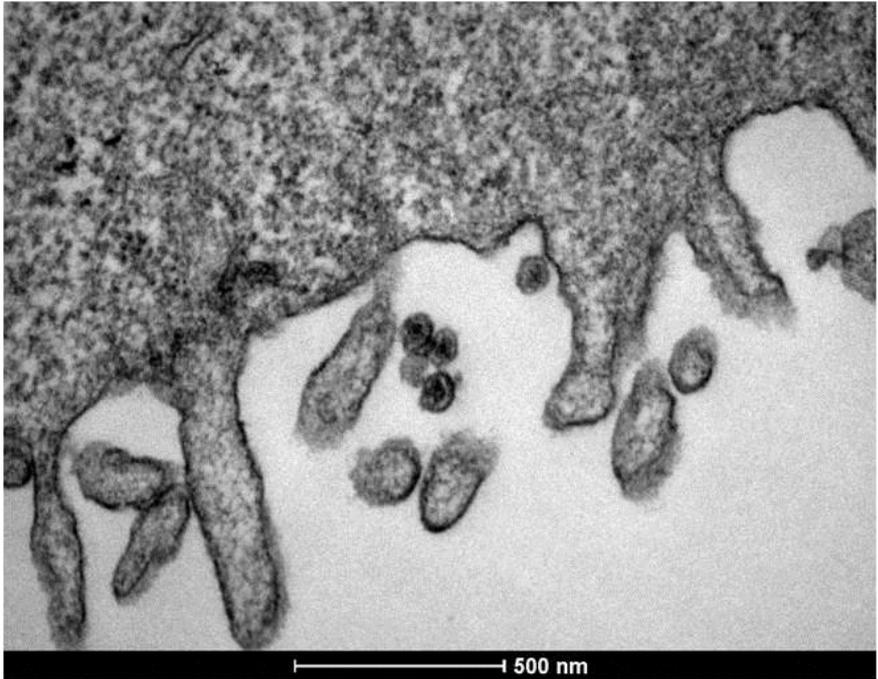
3

4 Figura10a: Controle negativo linhagem celular Tb1lu.



1

2 Figura10b: Controle negativo linhagem celular Tb1lu.



3

4 Figura10c: partículas virais de BLV isolados de campo na linhagem celular Tb1lu.



1

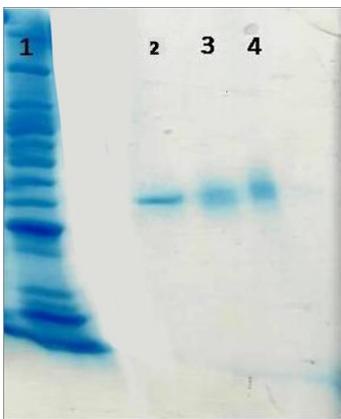
2 Figura10d: Micrografia de um sincício na amostra isolada de campo.

### 3 **4.4 Produção do Antígeno para Leucose Bovina**

4 A produção do antígeno B foi realizada a partir do vírus BLV isolado da amostra de campo da fazenda  
5 X neste trabalho.

6 O antígeno produzido foi comparado ao antígeno comercial em SDS-PAGE. O teste foi empregado  
7 para verificar a presença da proteína viral gp51 nos antígenos produzidos com o isolado de campo,  
8 antígeno B e o antígeno A.

9 A figura 11 mostra a foto do gel de poliacrilamida corado com azul de comassie.



10

Figura 11: Gel de poliacrilamida corado com azul de comassie. Na primeira canaleta esta o padrão de peso molecular, na segunda, amostra do antígeno A e na terceira e na quarta amostra o antígeno B.

1 Na Figura 11 observa-se que todos os antígenos testados apresentaram linhas na altura de 50 kDA,  
2 quando comparadas ao marcador de peso molecular. Porém no antígeno A linha formada é mais  
3 intensa e isso pode ser explicado pelo fato do mesmo ser purificado (DITRICH, 2004). Já o antígeno B  
4 formou uma linha na mesma altura que a sua duplicata e o antígeno A, porém quando comparada com  
5 a do antígeno A esta era mais difusa. Esse resultado comprova que no antígeno B produzido a partir da  
6 amostra isolada de campo apresenta as mesmas proteínas presentes no antígeno A, mas esta técnica  
7 mostra que o tipo de purificação modifica o padrão da linha formada, como pode ser observado na  
8 figura 12.

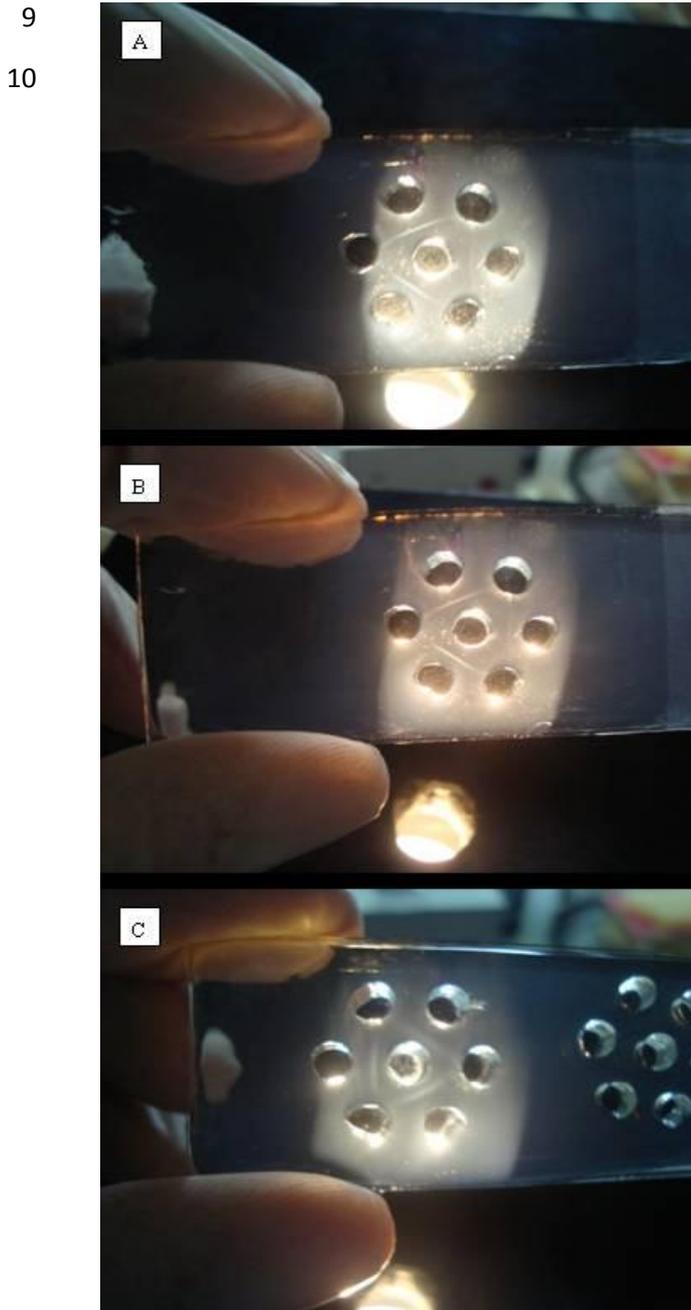


Figura 12: Fotos da lamina contendo resultado de IDGA dos dois antígenos. Em A o antígeno utilizado foi o A para a realização do teste diagnóstico. Em B e C o antígeno utilizado foi o B e pode ser observada uma variação entre as linhas de precipitação.

1 Na figura 12 A é possível visualizar as linhas de precipitação formadas a partir do antígeno A, que se  
2 apresentam evidentes. Já na figura 12B e C são linhas de precipitação formadas a partir do antígeno B,  
3 nestas fotos pode ser observado que houve uma variação no padrão da linha, que dependendo da  
4 amostra testada ficava menos intensa, o que dificultava a leitura, e com isso levava a realizar repetição  
5 da amostra para garantir confiabilidade.

6 Após a produção e caracterização do antígeno B, este foi testado pela técnica de IDGA para avaliar a  
7 sua sensibilidade e especificidade frente ao antígeno A e ao teste de ELISA. Para isto, foi utilizado o  
8 soro controle positivo do kit comercial, além de um soro positivo e um negativo previamente testado  
9 pelo antígeno A pela técnica de IDGA. O resultado demonstrou que houve linha de identidade no soro  
10 positivo e no controle positivo.

11 O antígeno B foi crescido em garrafas com áreas e volumes distintos. As garrafas de cultivo celular  
12 com área de 300cm<sup>2</sup> não foram eficientes para a produção do antígeno, pois o volume necessário para  
13 a manutenção da monocamada celular era de 100 ml de meio MEM. Já a produção do antígeno a partir  
14 de garrafas com área de 175cm<sup>2</sup>, com volume de meio MEM de 30ml para manutenção da  
15 monocamada celular foi possível a visualização da linha de precipitação após todo o processo de  
16 produção do antígeno. Uma possível explicação seria devido à concentração maior entre suspensão  
17 celular em relação ao meio quando se comparou o volume das duas garrafas testadas. Ditrich (2004)  
18 produziu o antígeno A em seu experimento a partir de garrafas A 150 com 20 ml de meio de cultura,  
19 que se assemelha aos valores de área e volume do antígeno produzido a partir da amostra isolada de  
20 campo que funcionou. Esses dados corroboram para confirmar que a relação superfície volume  
21 influencia na quantidade de proteína viral formada na constituição do antígeno. Além disso, como foi  
22 observada pela microscopia eletrônica, a amostra isolada de campo apresenta uma quantidade menor  
23 de partículas virais, sendo assim, quanto menos diluído for o sobrenadante maior a probabilidade de  
24 conseguir uma quantidade de partícula viral suficiente para que haja linha de precipitação no antígeno.

25 O teste de IDGA também foi empregado para avaliar qual diluição do antígeno seria utilizada para a  
26 realização dos demais exames, sendo que este foi utilizado sem diluição com as amostras de soro  
27 previamente coletadas e já testadas no antígeno comercial, dos animais das fazendas X e Y.

#### 28 **4.5 Sensibilidade Clínica dos diferentes métodos diagnósticos**

29 Todas as amostras sorológicas analisadas com os dois antígenos foram processadas nas mesmas  
30 condições ambientais. A leitura foi realizada por três leitores com experiência em leitura de IDGA e  
31 anotada individualmente na folha de resultados, que continham as rosetas identificadas de acordo com  
32 o número do animal testado. Os resultados de cada leitor foram comparados e analisados. As amostras  
33 com resultados divergentes foram novamente avaliadas em grupo e discutidas para se chegar a um  
34 consenso.

35 Ao comparar os resultados obtidos com os antígenos A e B, foi observada uma pequena variação entre  
36 os mesmos. Das 180 amostras testadas, 91 foram negativas (50,6%) e 89 foram positivas (49,4%) para  
37 o antígeno B (produzido a partir da amostra isolada de campo). Ao utilizar o antígeno A para as  
38 mesmas amostras testadas foram encontrados 95 amostras negativas (52,8%) e 85 positivas (47,2%).  
39 Os resultados obtidos na análise estatística foram calculados a partir de um intervalo de confiança de  
40 95%, este valor foi de 0,5884 para Kappa, que é considerado um valor moderado segundo Landis e  
41 Kock (1977), com  $p = 0,7423$ . Esses valores corroboram com os descritos acima, pois mostram que a

1 pequena variação encontrada entre os resultados não apresentou diferença estatística, como pode ser  
2 observado na tabela 1, embora com tendência ao antígeno B ser melhor.

3 Tabela1: Resultados obtidos no Teste de IDGA utilizando os dois antígenos com as amostras das duas fazendas  
4 testadas.

<b>IDGA antígeno A</b>			<b>Total</b>
<b>IDGA Antígeno B</b>	Positivo	Negativo	
Positivo	69	19	88
Negativo	16	76	92
Total	85	95	180

5 Kappa = 0,6108 (moderada) p < 0,005

6

7 Os resultados obtidos com o antígeno B demonstraram maior número de animais positivos na fazenda  
8 X, na qual foi isolado como pode ser observado na tabela 2.

9 Tabela 2: Resultados obtidos no Teste de IDGA utilizando os dois antígenos com as amostras das duas fazendas  
10 X.

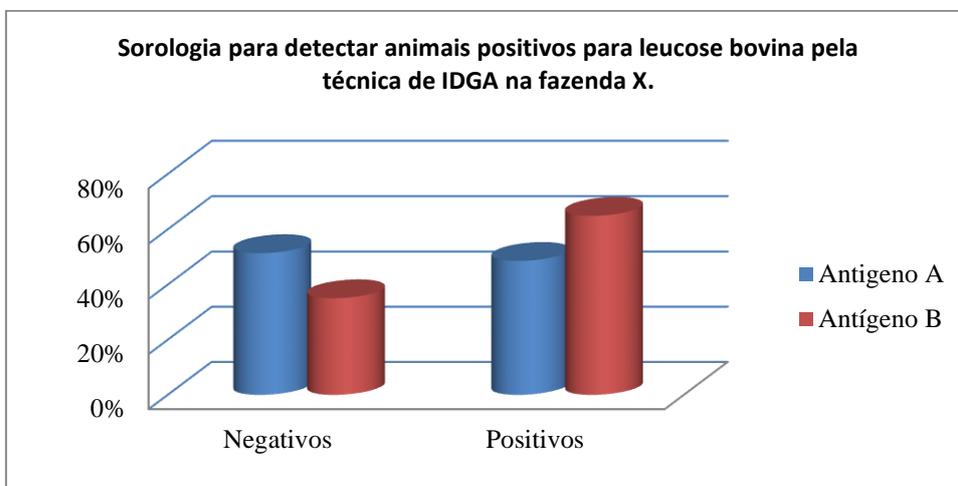
<b>IDGA Antígeno B</b>			<b>Total</b>
<b>Antígeno A</b>	Positivo	Negativo	
Positivo	35	4	39
Negativo	13	23	36
Total	48	27	75

11 Kappa = 0,5548 moderado p < 0,005

12

13 A figura 13 mostra em porcentagem os animais positivos e negativos na fazenda X. 64% dos animais  
14 foram positivos no antígeno B (colunas em vermelho), enquanto que 50,67% foram positivos no  
15 antígeno A (colunas em azul), demonstrando uma variação de 13,3% entre os resultados. Ao realizar a  
16 análise estatística verificou-se que o Kappa foi de 0,545 que significa uma relação moderada, porém o  
17 resultado de  $p = 0,0153$  resulta em uma diferença estatística. Estes valores mostram que o antígeno B  
18 conseguiu detectar maior número de amostras sorológicas no local onde foi isolado.

1 Figura 13: Resultado em porcentagem da sorologia realizada a partir da técnica de IDGA para leucose bovina  
 2 utilizando os antígenos A e B dos animais da fazenda X.



3

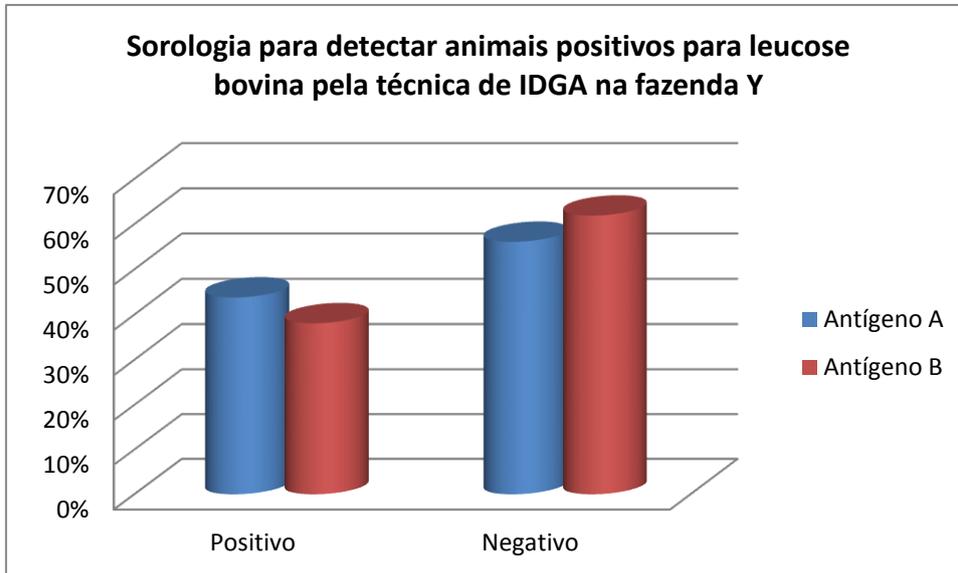
4 Na fazenda Y, a quantidade de resultados positivos e negativos obtidos entre os dois antígenos foram  
 5 semelhantes, como pode ser observado na tabela3.

6 Tabela 3: Resultados obtidos no Teste de IDGA utilizando os dois antígenos com as amostras das duas fazendas  
 7 Y.

IDGA Antígeno B			Total
Antígeno A	Positivo	Negativo	
Positivo	34	12	46
Negativo	6	53	59
Total	40	65	105

8 Ao analisar a figura 14, o gráfico com as amostras sorológicas da Fazenda Y, observa-se que 46% dos  
 9 animais foram positivos utilizando o antígeno A (colunas em azul), enquanto 41% foram positivos  
 10 para o antígeno B, houve apenas uma variação de 5%. O resultado obtidos no teste kappa foi de 0,647  
 11 que é considerado bom, e o  $p = 0,2386$ . Este resultado mostra que não houve diferença estatística nos  
 12 resultados encontrados.

1 Figura 14: Resultado em porcentagem da sorologia realizada a partir da técnica de IDGA para leucose bovina  
2 utilizando os B dos animais da fazenda antígenos A e Y.



3

4 Esse resultado sugere que pode existir uma variação na detecção de anticorpos anti-BLV. Uma  
5 hipótese para explicar estes resultados seria o fato do vírus estar circulante nesta propriedade e com  
6 isso, apresentaria maior afinidade pelos anticorpos dos animais presentes nesta fazenda na qual o vírus  
7 foi isolado. E este ainda pode apresentar alterações em sua composição genética, que alterariam a  
8 especificidade entre a relação antígeno anticorpo. Porém são necessários mais estudos para confirmar  
9 estas hipóteses.

10 Outra hipótese seria a de que o vírus isolado possa apresentar diferenças genéticas que mudariam o  
11 seu padrão, alterando a afinidade e/ou o reconhecimento do antígeno pelos anticorpos presentes no  
12 soro.

#### 13 4.6 Teste de ELISA gp51

14 O teste de ELISA da marca IDEXX baseia-se na incubação dos anticorpos específicos contra BLV que  
15 formam um imuno-complexo com o antígeno. O conjugado utilizado foi anticorpo monoclonal anti-  
16 gp51. Quando o imuno-complexo (anticorpo presente no soro testado mais o antígeno fixado na placa)  
17 é formado, o conjugado anti gp51 não é capaz de se ligar ao antígeno fixado. Com isso, o grau de  
18 coloração observado é inversamente proporcional a quantidade de anticorpo anti gp51 específico de  
19 BLV encontrado na amostra.

1 Todas as amostras sorológicas coletadas foram analisadas pela técnica de ELISA para auxiliar na  
2 interpretação dos resultados encontrados nos exames de IDGA realizados com os dois antígenos  
3 testados.

4 Das 180 amostras, 117 foram positivas e 63 negativas, o que corresponde a 65% e 35%  
5 respectivamente.

6 Os resultados obtidos através da técnica de ELISA para gp51 foram comparados com os resultados  
7 obtidos com os antígenos A e B.

8 Na análise dos resultados da sorologia das duas fazendas para os testes ELISA x IDGA antígeno A,  
9 houve uma concordância considerada moderada pelo índice Kappa de 0,414 com  $p = 0,0001$ , esses  
10 valores indicam que houve diferença estatística. Ao analisar os resultados da fazenda X, foi  
11 encontrado o valor de Kappa de 0,622, que significa uma correlação boa entre os resultados  
12 positivos/negativos e  $p = 0,0162$ . Na fazenda Y, foi encontrado um valor de kappa de 0,262  
13 considerada pequena e  $p = 0,0027$ . Nas duas fazendas houve diferença estatística ente os resultados  
14 apresentados.

15 Já em relação ao antígeno B desenvolvido com a amostra isolada de campo, o resultado obtido ao  
16 analisar as duas fazendas juntas foi de Kappa de 0,209 que é considerado favorável, para  $p = 0,0090$   
17 indicando diferença estatística. Ao analisar os resultados da Fazenda X, o valor de Kappa foi 0,437  
18 considerado moderado,  $p = 0,6464$  sem diferença estatística. Já na fazenda Y, o valor de Kappa foi  
19 0,067 considerado pequeno, ou seja, houve uma baixa relação entre os resultados positivos e  
20 negativos, e  $p = 0,0005$ , indicando diferença estatística, na fazenda onde o vírus foi isolado foi  
21 possível identificar um número maior de animais positivos. Estes dados sugerem que pode haver uma  
22 diferença genética entre as espécies do vírus da leucose bovina.

23 Os valores encontrados ao comparar técnicas diferentes já eram esperados, pois a técnica de ELISA  
24 apresenta alta sensibilidade e especificidade, enquanto a técnica de IDGA apresenta menor  
25 sensibilidade (CAMARGOS, 2007). Ditrich, 2004, encontrou em seu trabalho uma relação de 86% de  
26 concordância entre as técnicas de IDGA e ELISA utilizando reagentes produzidos a partir da linhagem  
27 celular FLK.

28 Mattos e colaboradores (2005) realizaram um levantamento sorológico para leucose bovina. Eles  
29 usaram o antígeno A para os testes de IDGA e ELISA, e um antígeno importado para IDGA. Os  
30 resultados obtidos mostraram que a técnica de ELISA era a mais sensível. Eles obtiveram uma  
31 concordância de 86,2% para ELISA e IDGA com antígenos preparados pela TECPAR, 82,7% entre o  
32 antígeno da TECPAR e importado e 81,8% entre o antígeno importado e ELISA. Estes dados  
33 apresentaram resultados bem semelhantes ao comparar as técnicas utilizadas, o que não ocorre neste  
34 trabalho a partir dos reagentes testados.

35 Camargos e colaboradores (2007) compararam vários testes diagnósticos para BLV e comprovaram  
36 que a sensibilidade e especificidade do teste de ELISA são de 100%, enquanto que na técnica de IDGA  
37 a sensibilidade foi de 93,4% e especificidade de 100%. Estes dados demonstram que a sensibilidade da  
38 técnica de ELISA superior a da IDGA. Neste trabalho foi possível confirmar estes dados a partir dos  
39 resultados encontrados. Os resultados do antígeno A apresentaram maior correlação entre  
40 positivos/negativos quando comparados ao do antígeno B.

41 Uma hipótese seria o fato do antígeno A e o antígeno do kit de ELISA serem produzidos a partir da  
42 mesma linhagem celular, e por serem testes comerciais apresentam um maior grau de pureza como foi  
43 visto no trabalho de Mattos e colaboradores (2005). Enquanto o antígeno B foi produzido a partir de

- 1 uma amostra de campo em uma linhagem totalmente diferente da qual é produzidos os demais
- 2 reagentes aos quais foi comparado.

## 5 – CONCLUSÕES

1

2 Foi realizado o Primeiro isolamento de campo do vírus da Leucemia Bovina no Brasil e na  
3 América do Sul.

4 A utilização da linhagem celular Tb1lu propiciou o isolamento do vírus da leucose bovina a partir do  
5 co-cultivo de leucócitos de animais infectados. Porém como as amostras são de campo, corre o risco  
6 de outros vírus, bem como outros parasitas sanguíneos surgirem durante o processo de isolamento  
7 viral.

8 As imagens da microscopia eletrônica auxiliaram na interpretação dos resultados obtidos, pois através  
9 delas foi possível visualizar que a amostra isolada apresenta uma quantidade de partícula viral  
10 infinitamente menor do que a da linhagem FLK– BLV, sugerindo que são necessários mais estudos  
11 para aperfeiçoar a produção de partículas virais em amostras isoladas de campo e como conseqüência  
12 obter um antígeno com maior concentração de proteínas

13 A produção de um antígeno para o teste de IDGA a partir da amostra isolada de campo mostrou  
14 resultados promissores.

15 Os resultados obtidos pela técnica de eletroforese de proteína mostraram que a proteína produzida para  
16 o antígeno B é a mesma do antígeno A, ou seja, a gp51.

1

## 6 – PERSPECTIVAS FUTURAS

- 2 Continuar os estudos com os vírus isolados no Brasil.
- 3 Testar outras técnicas para produção de Antígeno.
- 4 Caracterização antigênica pela técnica de Western Blot.
- 5 Desenvolver outros métodos sorológicos a partir dos isolados brasileiros.
- 6 Realizar de um estudo de análise filogenética das amostras isoladas.

## 7 – REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1
- 2 BRADFORD, M.M. A rapid a sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein  
3 utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254 (1976).
- 4 BURNY, A., CLEUTHER, Y., KETTMANN, R>, MAMMERICKS, G., PORTELLE, D., van den  
5 BROEKE, A., WILLEMS, L., and THOMAS, E., Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived  
6 from the study of an infectious cancer. *Veterinary Microbiology*, 17 (1998): 197 – 218
- 7 CALAFAT, J.; and RESSANG, A. A.. Morphogenesis of Bovine Leukemia Virus. *Viology* 80, 42 –  
8 53 (1977).
- 9 CAMARGOS, M. F.; FELIZANE, F.; GIUSEPPE, A. de; LESSA, L. M.; REIS, J. K. P.; LEITE, R.  
10 C.. Evalutionof diagnostictesttobovineleukemia vírus. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*.  
11 2007, 62, 169-172.
- 12 CAMARGOS, M. F.; MELO, C. B.; LEITE, R.C. et al. Frequência de soropositividade para aLeucose  
13 Enzoótica Bovina em rebanhos de Minas Gerais. *Cien. Vet. Trop.*, v. 5, p. 20-26,2002.
- 14 DITTRICH, T. R. C. Produção de reagentes para o diagnóstico da infecção pelo vírus da leucose  
15 bovina. Tese do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do  
16 Paraná. Curitiba 2004.
- 17 DIGIACOMO, R. F., DARLINGTON, R. L and EVERMANN, J.F.. Natural Transmission of bovine  
18 leukemia virus in Dairy Calves by Dehorning. *Can. J. Comp. Med.*, 1985; 49, p. 340 – 342.
- 19 ERSKINE, R. J., BARTLETT, P.C., BRYEM, T. M., RENDER, C. L., FEBVAY, C., and  
20 HOUSEMAN J.. Using Herd Profile to Determine Age-Specific Prevalence of Bovine Leukemia  
21 Virus in Michigan Dairy Herds. *Veterinary Medicine International*. Vol.2012.  
22 doi:10.115/2012/350374
- 23 FERNANDES, C. H. C. Leucose Enzoótica dos bovinos: soroprevalência, fatores de risco e níveis  
24 séricos de lisozima em bovinos leiteiros do Estado do Tocantins, Brasil. 2007. 89 f. Tese (Doutorado  
25 em Ciência Veterinária) - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de  
26 Pernambuco,Recife.
- 27 FRANDOLOSO, R., ANZILIEIRO, D., SPAGNOLO, J., KUSE, N., FIORI, K., SCORTEGAGNA,  
28 G. T., BARCELLOS, L.J. G., KRUTZ, L. C.. Prevalência de Leucose Enzoótica Bovina, Diarréia  
29 Viral Bovina, Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina e Neosporose Bovina, em 26 propriedades leiteiras da  
30 região Nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Ciência Animal Brasileira*, V. 9, n°4, 2008.
- 31 GILLET, N., FLORINS, A., BOXUS, M., BURTEAU, C., NIGRO, A, VANDERMEERS,F.,  
32 BALON, H., BOUZAR, A., DEFOICHE,J., BURNY,A., REICHERT,M., KETTMANN, R.,

- 1 WILLEMS,L.. Mechanisms of Leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for  
2 novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 2007, 4:18; p. 1 of 32.
- 3 GRAVES, D. C., and FERRER, J. F. In vitro Transmission and Propagation of the Bovine Leukemia  
4 Virus in Monolayer Cell Cultures. *Cancer Research* 35, 4152 – 4159, November 1976.
- 5 HOUSE, C., HOUSE, J. A., and GLOVER, F. L. Antibodies to the glycoprotein antigen of bovine  
6 leukemia virus in the cattle population of five states. *Cornell Vet.*,v. 67, p.510-522.
- 7 JHONSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Veterinary*  
8 *Bulletin*, v.62, n. 4, p. 287 – 312, 1992.
- 9 JORGE, T. C. A.; CASTRO, S. L de. Doença de chagas: Manual para experimento animal (on line).  
10 Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ, 2000 368 páginas. Antropologia Saúde. Collection ISBN 85-  
11 85675=6-753. Site <http://books.scielo.org>.
- 12 KENYON, S. J. and PIPER, C., E.. Cellular Basis of PERSistet Lymphocytosis in Cattle Infected with  
13 Bovine Leukemia Vírus. *Infection and Immunity*. June 1977, p. 891 – 897. American Society for  
14 Microbiology vol.16 n°3.
- 15 KNIPE, d. M. ; HOWLEY, P. M. *Fields Virology*, 5<sup>th</sup> Edition, 2007.
- 16 LEISERING, A. Hypertrophy der Malpighischen Körperchen der milz. *Vet. Wes. Kg.*, v.16, p. 15 – 16,  
17 1871.
- 18 LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data *Biometrics*  
19 33: 159 – 174, 1977.
- 20 MEGID, J.; NOZAKI, C. N.; KURODA, T. F. et al. Ocorrência de leucose enzoótica bovina na  
21 microrregião da Serra de Botucatu, São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, p. 645-646, 2003.
- 22 MORATORIO, G., FISHER, S., BIACHI, S., TOMÉ, L., RAMA, G., OBAL, G., CARRIÓN,F.,  
23 PRITSCH, O., CRISTINA, J.. A detailed molecular analysis of complete Bovine Leukemia Virus  
24 genomes isolated from B – cell lymphosarcomas. *Veterinary research*, 2013, 44:19.
- 25 MATOS, P. F.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência  
26 de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre os resultados do teste de  
27 ELISA e da imunodifusão em gel de ágar .*Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 42, p. 171-179, 2005.
- 28 PEREIRA, J. M. A. e COSTA, Q. S.. *Manual de Virologia Prática*. 3º edição. Lisboa, 2008.
- 29 PIPER, C. E. ABT, D. A.; FERRER, J. F.. Seroepidemiological Evidence for Horizontal Transmission  
30 of Bovine C-type Virus. *Cancer Research*, 1975, vol.35.

- 1 RODRÍGUEZ, S., M.; FLORINS, A.; GILLET, N.; BROGNIEZ, A. DE; SÁNCHEZ-ALCARAZ, M.  
2 T.; BOXUS, M.; BOULANGER, F.; GUTIÉRREZ, G.; TRONO, K.; ALVAREZ, I.; VAGNONI, L.;  
3 WILLEMS, L.. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLV.  
4 *Viruses* 2011, 3. Doi: 10.3390/v30072010.
- 5 RAJÃO, D. de S. Efeito da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina na produção de leite e  
6 reprodução de rebanhos leiteiros. Dissertação apresentada ao Departamento de Medicina Veterinária  
7 Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG 2008.
- 8 RANGEL, N.M. and MACHADO, A. V.. Contribuição a oncologia comparada em Minas Gerais.  
9 *Arquivos Escola Superior Veterinária – vo. 1* 1943.
- 10 ROCHA, M. A. Diagnóstico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR). *Revista Brasileira de*  
11 *Reprodução Animal*. C.23, p 535-539, 1999.
- 12 TROIANO, D.C., SOCCOL-THOMASZ, V., AGOTTANI, J. V. B, BRODZINSKI, J., PENHA, T. R.,  
13 OZAKI, S. C.. Production, Characterization, and use of monoclonal antibodies against gp51 protein to  
14 diagnose Bovine Leukemia Virus infection. *BioResearch Open Access*. Vol. 2, Nº 1, February 2013.  
15 DOI: 10.1089/biores.2012.0295.
- 16 AHPIS. Info Sheet. Veterinary Services. Centers of Epidemiology and Animal Health, October 2008.
- 17 WU, D.; MURAKAMI, K.; MOROOKA, A.; JIN, H.; INOSHIMA, Y.; SENTSU, H. In vivo of  
18 bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus. *Virus Research*, 97 (2003) p. 81-87. Doi  
19 10.1016/so168-1702(03)00222-3
- 20 LAMAS DIAS, NATANAEL, FONSECA JÚNIOR, ANTÔNIO AUGUSTO, SOBREIRA  
21 RODRIGUES, DANIEL, FERNANDES CAMARGOS, MARCELO. PCR em tempo real para  
22 diagnóstico da leucose enzoótica bovina. *Ciência Rural*
- 23 Sites
- 24 [www.atcc.org/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Cell\\_Lines/Animal/Alphanumeric/CCL-](http://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines/Animal/Alphanumeric/CCL-88.aspx#85786B46AA23451B94BC5D45200673F7)  
25 [88.aspx#85786B46AA23451B94BC5D45200673F7](http://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines/Animal/Alphanumeric/CCL-88.aspx#85786B46AA23451B94BC5D45200673F7)
- 26 <http://graphpad.com/quickcalcs/kappa1>
- 27 <http://graphpad.com/quickcalcs/mcNemar1>
- 28 [http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07\\_is\\_BLV.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_BLV.pdf).