

12
Universidade Federal de Minas Gerais
Conselho de Pós-Graduação
Escola de Veterinária



LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA. I - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE
DIAGNÓSTICO. II - EVOLUÇÃO SOROLÓGICA DE BEZERROS. III -
INTERFERÊNCIA COM A VACINA ANTI-FEBRE AFTOSA

Celina Maria Modena

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



000072338205

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

103.0/50

Belo Horizonte
Minas Gerais
1981

Celina Maria Modena

T 636.089 69
M 650 2
1981

LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA. I - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE
DIAGNÓSTICO. II - EVOLUÇÃO SOROLÓGICA DE BEZERROS. III -
INTERFERÊNCIA COM A VACINA ANTI-FEBRE AFTOSA

Tese apresentada ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

BeLo Horizonte
Minas Gerais
1981

M689 1

Módena, Celina Maria, 1951

Leucose enzoótica bovina. I - Comparação entre métodos de diagnóstico. II - Evolução sorológica em bezerros. III - Interferência com a vacina anti-febre aftosa. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1981.

93p. ilust.

Bibliografia

Tese, Mestre em Medicina Veterinária.

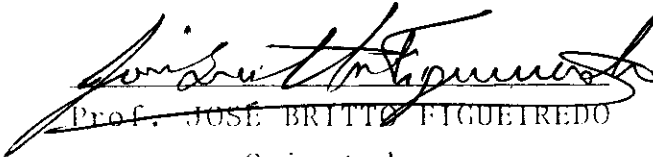
1. Leucose - Bovino. 2. Leucose - Diagnóstico.

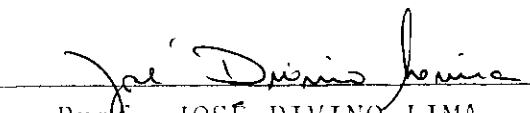
I. Título


CDD - 636.208 961 35

636.208 969 94

TESE APROVADA EM 10/07/1981


Prof. JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO
- Orientador -


Prof. JOSÉ DIVINO LIMA


Prof. RONALDO REIS

O presente trabalho contou com apoio financeiro da FUNDAÇÃO DE ESTUDO E PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA - FEP-MVP e do PROGRAMA DE SAÚDE ANIMAL DO CONSELHO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO, pela valiosa orientação e incentivo.

Ao Prof. RÔMULO CERQUEIRA LEITE, da Escola de Veterinária da UFMG, por ter realizado o diagnóstico clínico da Leucose Enzoótica Bovina, no rebanho onde realizou-se a pesquisa, pela colaboração durante a colheita do material e pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao Dr. RUFINO ANTUNES DE ALENCAR FILHO, pela orientação, principalmente na técnica de imunodifusão e por ter fornecido o antígeno utilizado neste trabalho.

Aos Profs. IVAN BARBOSA MACHADO SAMPAIO e RABINDRANATH LOYOLA CONTRERAS pela valiosa orientação na análise estatística.

Ao Dr. RUBENS ANTÔNIO CARNEIRO, do Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da UFMG, pela colaboração nos diagnósticos hematológicos.

Aos Drs. JUAN ANTÔNIO OBIAGA, VICENTE MATEO ASTUDILLO e KLEISE FREITAS COSTA, do Centro Panamericano de Febre Aftosa, pela orientação na parte de soroneutralização.

Ao Prof. ÉLVIO CARLOS MOREIRA, da Escola de Veterinária da UFMG, pelo empenho na obtenção de estágios no Instituto Biológico de São Paulo e no Centro Panamericano de Febre Aftosa do Rio de Janeiro.

Ao Prof. LUÍS AUGUSTO BATISTA BRITO, da Escola de Veterinária da Goiás, aluno de pós-graduação da UFMG, pela realização dos exames histopatológicos.

Ao Prof. ERNANE FAGUNDES DO NASCIMENTO, pelas fotografias dos exames histopatológicos.

Ao Prof. MARCOS PEREIRA GOMES, do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" - RS, por ter fornecido parte do antígeno.

Ao PICD/CAPES, UFRGS, pela oportunidade e bolsa concedidas, em especial ao Prof. EDMUNDO KANAN MARQUES, Presidente da Câmara Especial de Pós-Graduação e Pesquisa da UFRGS.

Ao Prof. JOSÉ DIVINO LIMA, da Escola de Veterinária da UFMG, pelas importantes sugestões.

Ao CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA, onde realizaram-se as provas laboratoriais de microneutralização.

À Bibliotecária EUNICE DE FARIA LOPES, pela orientação bibliográfica.

Ao Sr. GUIDO A. DE CAUX, pela revisão linguística.

Ao Prof. JOSÉ AILTON DA SILVA, pela colaboração na montagem das tabelas.

A SANDRA MAPIA NASCIMENTO, pelo apoio e amizade.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, pela agradável convivência.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

RESUMO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) foi estudada num rebanho Holandês Preto e Branco (HPB) composto de 230 animais, com o objetivo de se obter alguns conhecimentos básicos de diagnóstico, de evolução sorológica em bezerros e de interferência com a vacina anti-febre aftosa. Para verificação da evolução sorológica em bezerros, utilizou-se, como diagnóstico, a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), em placa, com antígeno glicoproteico. Estudaram-se 12 bezerros, filhos de mães positivas com a técnica citada, dos 30 aos 300 dias de idade. Dois bezerros apresentaram anticorpos durante todo o período. Nos demais, houve desaparecimento dos anticorpos entre 90 e 180 dias de idade. De cinco bezerros que ingeriram colostro, filhos de mães negativas, somente um mostrou reação positiva, dos 30 aos 300 dias. A incidência da doença no rebanho aumentou durante o período estudado, de 65,22 para 70,86%.

Para comparação entre hematologia e IDGA, em placa, utilizaram-se duas contagens linfocitárias intervaladas de três meses. Observaram-se variações de resultados entre as chaves linfocitárias de Bendixen e da Comunidade Econômica Européia (CEE) com a IDGA, em placa. Onze (4,78%) animais foram falsos positivos e 48 (20,87%) falsos nega-

tivos, quando se utilizou a chave de Bendixen. Quando foi usada a chave da CEE, 9 (3,91%) foram falsos positivos e 58 (25,22%) falsos negativos. Concluiu-se, também, que a percentagem de linfócitos morfologicamente anormais na LEB é baixa.

A partir da amostra estudada, propôs-se uma chave linfocitária, com probabilidade de 15% de erro para falsos positivos e negativos para cada faixa etária.

Comparou-se a IDGA, em placa e em lâmina, obtendo-se 163 (70,86%) positivos em placa e 139 (60,43%) em lâmina.

Para avaliação da interferência, com a vacinação anti-febre aftosa, titularam-se os anticorpos, através da técnica de microneutralização, antes da vacinação, e aos 7, 14, 21, 28, 60 e 90 dias pós-vacinação. Utilizaram-se bovinos primo e revacinados em diferentes faixas etárias, compostas de grupos infectados e não infectados com o vírus da LEB. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas quanto à produção de anticorpos nos diferentes grupos.

SUMÁRIO

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1. INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira evoluiu, nos últimos anos, de maneira razoável, principalmente em relação ao aumento do rebanho. O mesmo não ocorreu com a produção, produtividade e as disponibilidades para a defesa sanitária. Enzootias aparentemente disseminadas entre nós, vêm passando despercebidas pela falta de meios diagnósticos adequados, com conseqüente aumento de prevalências.

É esta a situação da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) enfermidade tipicamente crônica, afetando o sistema linfóide com inicial envolvimento ganglionar e posterior infiltração difusa de células neoplásicas em outros tecidos ou órgãos e a formação de massas tumorais invasivas.

Desde sua descrição por SIEDAMGROTZKY (1878) sua etiologia esteve sob discussão, até que se conseguiu o isolamento das partículas virais tipo C (MILLER et alii, 1969; VAN DER MAATEN et alii, 1974).

Assim, foi possível diferenciar-se a Leucose Enzoótica Bovina da Leucose Esporádica Bovina em suas modalidades clássicas: cutânea, tímica e a chamada forma dos bezerras.

O significado econômico da enfermidade traduz-se por mortes devidas a linfossarcoma ou por condenação de

carcaças. À exceção do carcinoma ocular, é, a LEB a mais frequente enfermidade neoplásica em bovinos. Nos Estados Unidos, 50% dos tumores observados em abatedouros sob inspeção federal, são a ela atribuídos. Entretanto, esses dados subestimam a real incidência da enfermidade, por um lado, por serem baseados somente na presença de lesões macroscópicas e, por outro, por não estarem computados as mortes ou abates verificados em outros locais (FERRER, 1980).

Em muitos países a extensão destas perdas são difíceis de se estimar quer pela deficiência de dados de matadouro ou dificuldade de diagnóstico. Deste modo, o impacto econômico da infecção não foi, ainda, corretamente determinado. Embora possuindo baixa mortalidade e alta morbidade, também não foi possível avaliar as perdas na produção leiteira, de carne e eficiência reprodutiva, causadas pela enfermidade.

No Brasil a maioria dos casos descritos são relacionados à importação de animais. SANTOS et alii (1959) evidenciaram a enfermidade através da importação de bovinos provenientes da Suécia. DACORSO FILHO et alii (1962) apresentaram descrição da leucose enzoótica bovina no Rio de Janeiro, em animais também importados. ALENCAR FILHO (1970) evidenciou a LEB, em São Paulo, em rebanho importado da Dinamarca. MUCHALUAT (1971) descreveu a enfermidade, em Minas Gerais, adquirida por rebanhos também provenientes da Dinamarca.

Não há, no Brasil, legislação específica sobre a enfermidade, não se produz antígeno para avaliação de sua prevalência e nem tampouco, se estabeleceu valores hematólogicos para classificação de bovinos infectados.

É objetivo deste estudo obter alguns conhecimentos básicos, ligados ao diagnóstico, a evolução sorológica em bezerros, e a interferência da LEB com a vacinação anti-febre aftosa, que possam servir de fundamento a outras pesquisas e a preconização de medidas de controle.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Rebanho

2.1.1. Tipo de produção

O tipo de exploração zootécnica influi na incidência da infecção. BAUMGARTENER et alii (1975) encontraram 1,2% de infecção em bovinos de corte, contrastando com os 10,2% em bovinos leiteiros, de um total de 7.188 animais provenientes de diferentes propriedades.

HOUSE et alii (1977), através de ampla amostragem, encontraram 2,6% de infecção em rebanhos de corte, em contraposição aos 28,2% de rebanhos leiteiros.

2.1.2. Presença anterior de casos clínicos

A presença anterior de casos clínicos é outro fator preponderante no número de reagentes. OLSON et alii (1975) encontraram variação de 2 a 16,0% de reagentes em rebanhos onde a enfermidade não ocorreu nos últimos 13 anos, e 24,0 a 42,0% onde havia histórico nos sete anos anteriores.

TABEL et alii (1976) encontraram 44,9% de reagentes em rebanhos com casos anteriores de LEB e nenhum no rebanho-controle.

HOUSE et alii (1977) encontraram 18,7% de infecção em rebanhos onde não havia ocorrido manifestação clínica. Já rebanhos com histórico apresentaram a taxa de 52,0%.

2.2. Manifestações clínicas e anátomo-patológicas

Dos rebanhos infectados somente 10-30% dos animais manifestam a forma clínica, geralmente, entre quatro e oito anos de idade (MUSCOPLAT et alii, 1974; WEILAND & STRAUB, 1975).

Quando há manifestação clínica da enfermidade, o tecido linfóide é o local onde as alterações ocorrem com maior frequência. Em 98% dos casos, um, vários ou todos linfonodos geralmente apresentam aumento de volume de duas a 10 vezes (BENDIXEN, 1958).

Na cavidade torácica, as tumorações são frequentemente encontradas no coração. Em 58% dos casos observam-se tais alterações, porém, geralmente não detectáveis ao exame clínico (BENDIXEN, 1965).

Dentre os órgãos da cavidade abdominal, alterações macroscópicas do fígado são observadas em 60% dos casos. Alterações tumorais do baço são as mais frequentes; em muitos casos o aumento do órgão é moderado. O rim geralmente apresenta infiltração difusa ou nodular (BENDIXEN, 1965). Todas as partes do aparelho genital podem apresentar alterações. Dependendo do estado fisiológico as infiltrações podem causar infertilidade, aborto ou distocia. No útero, a massa tumoral pode ser nodular ou difusa. Nas trompas, a infiltração tumoral pode ocasionar espessamento perceptível, lembrando alterações tuberculosas, porém sem formações calcificadas ou caseificadas. No útero, dependendo da época da gestação, do tamanho e localização da tumoração, pode haver morte do feto, aborto ou distocia (BENDIXEN, 1970).

No sistema nervoso, tais infiltrações são raras. Desordens nervosas relacionadas à LEB são consequência de danos mecânicos por tumores circunvizinhos (BENDIXEN, 1970).

A região orbital é o local mais freqüente de infiltrações que podem desenvolver-se de forma unilateral, ocorrendo em muitos casos simetricamente (FELDMAN, 1930).

2.3. Associação entre idade e infecção

A idade dos animais em que se observa maior percentagem da infecção está intimamente correlacionada à prevalência total de infectados no rebanho (THEILEN et alii, 1963; CONNER et alii, 1966; CYPESS et alii, 1974).

SORENSEN et alii (1961), MARSHAK et alii (1962); REISSINGER (1963), encontraram maior taxa de infecção entre bovinos de cinco a oito anos. Poucos bovinos menores de dois anos reagem à infecção e apresentam anticorpos precipitantes (BAUMGARTENER et alii, 1975).

Através da imunofluorescência, FERRER et alii (1977) detectaram 95% de infecção em bovinos, com idade superior a três anos, em rebanhos onde houvera casos clínicos.

2.4. Evolução sorológica em bezerros

2.4.1. Transmissão através do colostro, leite ou transplacentária

GROSS (1970) classificou a transmissão natural da LEB em horizontal e vertical. A vertical é definida como sendo a realizada através da placenta ou colostro (ROSENBERGER, 1963; STRAUB, 1966). MUSSGAY & KAADEN (1978) consideraram transmissão vertical como infecção intra-uterina, transplacentária, ainda que não se observe sintomatologia clínica nas mães infectadas.

- FERRER et alii (1976) e CHANDER et alii (1978)

relatam que, aproximadamente 14% dos bezerros, filhos de mães infectadas, nascem infectados.

MILLER & VAN DER MAATEN (1976) induziram a infecção, nas primeiras horas de vida, através da administração oral de grande número de linfócitos infectados.

FERRER & PIPER (1978) relatam que o vírus ou mais frequentemente o linfócito infectado, pode se apresentar no colostro ou leite de vacas infectadas, confirmando observações de DUTCHER & LARKIN (1964). SCHULZE et alii (1966), RAMPICHINI et alii (1975).

ROMERO et alii (1980) testaram bezerros filhos de vacas sem anticorpos detectáveis à imunodifusão em gel de ágar, com antígeno glicoproteico, onde a grande maioria não possuía anticorpos. Entretanto, um bezerro apresentou anticorpos até um ano de idade. Seus linfócitos, assim como os linfócitos da mãe, continham partículas virais do tipo C.

ROMERO et alii (1980) relataram que 19 de 21 bezerros de vacas com anticorpos possuíam anticorpos no primeiro mês de idade, que persistiram em dois destes animais por um mínimo de quatro meses.

2.4.2. Período de incubação

O período de incubação, em condições naturais, desde a infecção até a detecção de anticorpos, ainda não está elucidado, podendo variar de dois a 44 meses (CHANDER et alii, 1978; TYLER, 1978).

ROSENBERGER (1968) observou a transmissão da LEB após inocular bezerros recém-nascidos com órgãos linfossarcomatosos. Quatro de seis animais desenvolveram a enfermidade em períodos que variaram de dois a 14 anos. Entretanto, MILLER & OLSON (1972) obtiveram anticorpos detectáveis no soro de bezerros, entre três a quatro meses, após inoculação experimental. BURROUGHS & CARDINET (1973) inocu-

laram o vírus nos olhos, boca e nariz de bezerros e o isolaram do tecido linfático 106 dias após. MILLER & VAN DER MAATEN (1976), expondo três bezerros ao contato contínuo com animais infectados, obtiveram anticorpos detectáveis no soro de dois animais, um aos nove meses e outro aos 12.

KAADEN et alii (1978), utilizando antígeno glicoproteico e proteico, em 286 animais, num total de 2352 amostras testadas em intervalos regulares, de 1974 a 1978, verificaram que a percentagem de animais com anticorpos aumentara durante o período de observação: inicial de 4,8% (1974/1975); 9,7% (1976); 34,2 (1977) a 52,6% (1978).

2.4.3. Transmissão através de secreções e excreções

A transmissão horizontal pode ser realizada através do contato (BENDIXEN, 1960) e de secreções (OLSON & BAUMGARTENER, 1975). A infecção direta aos suscetíveis por animais, com ou sem manifestação clínica, pode ocorrer através de fezes, urina, líquido amniótico e secreções nasais ou oculares (MUSSGAY & KAADEN, 1978). Concebe-se que o vírus da LEB é excretado através da urina, saliva e outras secreções, simultaneamente (NIELSEN et alii, 1978).

2.4.4. Transmissão através da pele

ROSENBERGER (1963) relatou a possibilidade de transmissão através da tuberculinização.

TYLER (1978) verificou que a inoculação de 2500 linfócitos infectados poderia transmitir a infecção.

MAMMERICKX et alii (1978) afirmaram que a transmissão horizontal se deve mais à transmissão de células infectadas do que à presença de vírus livre. Estas células seriam inoculadas pela via cutânea ou subcutânea através de agulhas, instrumental cirúrgico ou solução de continuidade

por doenças cutâneas.

VAN DER MAATEN & MILLER (1978), demonstraram que a inoculação intradérmica é efetiva, mesmo com pequena quantidade de sangue.

Vetores têm sido estudados, parecendo ter importância mecânica. Assim, HAWKINS et alii (1976), estudando a Anemia Infecciosa Equina, afirmaram que tabanídeos e outros insetos podem voar longas distâncias à procura do hospedeiro, podendo disseminar o vírus de um rebanho a outro. Entretanto, a área de disseminação pode ser restrita se houver perda de viabilidade dos linfócitos infectados, transportados pelos vetores.

NIELSEN et alii (1978) estudaram a transmissão da LEB em 14 bovinos adultos e jovens expostos ao contágio a partir de 30 vacas infectadas dispersas numa área de 0,5 ha. Em sete bovinos a exposição iniciou-se no verão, quatro apresentaram infecção após três meses e o restante após quatro meses de contato. Dos sete bovinos expostos no outono, todos permaneceram negativos por três meses, um se tornou positivo após seis meses. Entretanto, no verão seguinte, quatro deste grupo estavam infectados, indicando que a transmissão por contato é mais prevalente durante o verão. Isto, aliado ao fato de linfócitos infectados serem recuperados de tabanídeos que sugaram vacas positivas, indica que insetos hematófagos têm papel importante na disseminação da enfermidade.

2.5. Diagnóstico

2.5.1. Diagnóstico hematológico

2.5.1.1. Linfocitose persistente e chaves hematológicas

KNUT & VOLKMAN (1916) observaram que uma linfocitose persistente (LP) poderia ser sinal precursor da enfermidade, podendo aparecer meses ou até, anos antes da ma-

nifestação clínica. Suas características eram de linfocitose irregular, com períodos de recrudescimento e remissão. GÖETZE (1956) argumentou que a LP indicaria a fase pré-clínica da enfermidade. Após determinação etiológica da LEB; esta fase pré-clínica foi denominada fase de infecção. A idade dos bovinos, ajustada à contagem linfocitária, originaram diversas chaves hematológicas objetivando classificar animais em normais, suspeitos e apresentando linfocitose.

BENDIXEN (1958) desenvolveu uma chave hematológica, sendo esta a mais conhecida e amplamente difundida (TAB. I) e, sob sua orientação, a Dinamarca iniciou programa de controle. Diversas chaves foram criadas, em diferentes países, sendo a mais atual a adotada por países da comunidade econômica européia (CEE) (TAB. II). Até 1970, as chaves hematológicas utilizadas para o diagnóstico demonstraram ser um dos poucos métodos para identificação dos animais suspeitos, mesmo sem definição etiológica da enfermidade. Após a descoberta do agente e desenvolvimento de métodos sorológicos específicos tornou-se possível examinar criticamente o valor de tais chaves.

Existem grandes controvérsias sobre a interrelação de linfocitose persistente, infecção e linfossarcoma (MARSHAK & ABT, 1968).

Alguns autores afirmaram que a linfocitose persistente é um estágio anterior ao linfossarcoma. Bezerros quando inoculados com o vírus desenvolvem LP (THEILEN et alii, 1967; ROSENBERGER, 1968).

WEINHOLD & STRAUB (1968) afirmaram que a LP é um estágio pré-tumoral, já para MARSHAK & ABT (1968), somente 36% de bovinos com formas clínicas não têm histórico de linfocitose.

FLENSBURG & STRLYFFERT (1977) realizaram avaliação crítica do programa de controle na Dinamarca, iniciado em 1959. A introdução do diagnóstico sorológico somente o-

correu a partir de 1975. Os autores concluíram que:

- 1) a hematologia utilizada foi adequada à identificação da LEB; na fase clínica, em rebanhos nos quais as condições tenham favorecido sua disseminação;
- 2) por ser inespecífico e de baixa sensibilidade, foi difícil o diagnóstico hematológico em rebanhos com infecção recente, e
- 3) a erradicação não é possível somente com o uso do método hematológico.

CRESPEAU (1977) relatou que a detecção dos animais infectados, baseando-se na existência da LP, está sendo substituída gradativamente por métodos de sensibilidade e especificidade superiores. A participação de outras enfermidades infecciosas, que não a LEB, podem causar LP. Além disto, a linfocitose não pode ser, no plano individual, tomada como critério específico e constante da infecção. A precocidade real desta resposta é desconhecida e um bovino infectado pode não desenvolvê-la ou fazê-lo meses após a infecção.

A baixa sensibilidade dever-se-ia, em parte, às flutuações que sofrem a LP e à falta de sua precocidade. Em síntese, o método carece de fidelidade e não poderia servir de base para o diagnóstico definitivo a programas de controle e/ou erradicação.

FERRER (1980) afirmou que as chaves hematológicas falham na identificação de 60% dos bovinos infectados. Sendo a infecção, geralmente de evolução clínica silenciosa, a LP e, em particular, o linfossarcoma, não podem ser considerados respostas frequentes.

2.5.1.2. Alterações morfológicas linfocitárias

KNUT & DU TOIT (1917), foram os primeiros a descrever alterações linfocitárias, na LEB, utilizando tais

modificações como forma de diagnóstico. WEBER (1963) e MARKSHAK (1968) afirmaram que células similares também são observadas no sangue de bovinos afetados por outras condições neoplásicas.

CRESPEAU (1977) afirmou que a presença de células linfóides morfológicamente anormais na circulação periférica, como indicativo da infecção, apresenta sérias restrições pela irregularidade e dificuldade de interpretação.

2.5.1.3. Comparação entre hematologia e IDGA

FRENZEL et alii (1976) comparando a IDGA com antígeno glicoproteico e hematologia, verificaram que em 35 bovinos com LP, 91,1% foram positivos à IDGA. De 20 animais suspeitos hematologicamente e de 313 com contagem linfocitária normal 12,6 e 16,9%, respectivamente, deram resultados positivos à IDGA.

DEVARE et alii (1978) estudando a chave de Bendixen e IDGA, observaram que em 20 animais com linfossarcoma, todos positivos à IDGA, 15 apresentavam linfocitose. De 23 animais provenientes de rebanhos com alta incidência de casos clínicos, cinco foram positivos à IDGA e à chave de Bendixen e 18 à IDGA.

GUILLEMAN et alii (1978), comparando resultados hematológicos obtidos através da chave da CEE, em rebanhos com ocorrência de casos clínicos, verificaram que, de 25 bovinos classificados como normais hematologicamente, seis foram positivos à IDGA; entre 11 suspeitos, três; e de 53 com linfocitose persistente, 11.

HOFIREK et alii (1978) comparando resultados obtidos através de classificação pela chave da CEE e IDGA, com antígeno glicoprotéico do Laboratório PITMAN-MORE, encontraram 28,4% de positividade ao exame hematológico contrastando aos 47,2% da IDGA.

RUTILLI et alii (1978) estudando a enfermidade

na Itália, através da comparação da chave de Bendixen e IDGA com antígeno glicoproteico em 1124 animais testados, encontraram 149 positivos à hematologia; 65 positivos à IDGA, sendo que destes, 19 apresentaram concordância entre os dois métodos.

2.5.2. Diagnóstico sorológico (IDGA)

2.5.2.1. Sensibilidade e especificidade da IDGA

Dêsde a detecção das partículas virais, tipo C, dois antígenos precipitantes já foram identificados; um proteico (P) interno (MILLER et alii, 1972) e uma glicoproteína (GP) do envelope viral (ONUMA et alii, 1975). Ambos são capazes de induzir a síntese de anticorpos.

Devido a alta correlação entre infecção e resposta de anticorpos, FERRER et alii (1975) e SCHMIDT et alii (1975), argumentaram que a demonstração de anticorpos é o método mais indicado para diagnóstico da infecção.

OLSON & BAUMGARTENER (1975), testando 175 bovinos através da IDGA, fixação de complemento (FC) e imunofluorescência direta (IFD), encontraram os seguintes resultados: nenhum anticorpo foi detectado em 152 animais pelos três métodos; dos 23 animais com anticorpos, 16 foram positivos às três técnicas, um foi positivo somente à IFD, um à IDGA e cinco à FC e IDGA. Os autores argumentaram que as variações seriam devidas à sensibilidade dos métodos e as diferenças qualitativas dos diferentes antígenos utilizados, concluindo que qualquer das três técnicas poderia ser empregada.

HOUSE & HOUSE (1976) comparando a sensibilidade e especificidade da IDGA em placa, com antígeno glicoproteico do Laboratório PITMAN-MOORE, e FC, observaram que, em 62 soros testados houve coincidência entre as duas provas em 61 reações. Assim, 45 foram positivos às duas técnicas e 16 negativos. A discrepância ocorreu com um soro positi-

vo à FC e negativo à IDGA. Os autores concluíram que a FC e IDGA com antígeno glicoproteico teriam a mesma sensibilidade e especificidade.

MILLER et alii (1976) argumentaram que para a detecção de animais infectados, o antígeno GP é superior ao P, pois este apresenta 36% de falsos negativos. Os autores comparando a FC, a IDGA com antígeno proteico e glicoproteico, demonstraram que a FC é mais sensível que a IDGA com antígeno P, porém, falhou em detectar 15% dos soros positivos à IDGA com antígeno GP, concluindo que, pela sua sensibilidade, a última técnica poderia ser utilizada em programas de controle e/ou erradicação.

RUTILI et alii (1976) testando rebanhos com e sem histórico da enfermidade e comparando o isolamento de vírus, à FC, e a IDGA com antígeno GP e P, concluíram que: um resultado positivo sorologicamente não indica a presença do vírus em cultivo de linfócitos. A IDGA com antígeno GP detectou maior número de positivos do que a IDGA com antígeno P. Também concluíram ser aquela um método válido à detecção da infecção.

BAUSE et alii (1978) afirmaram que a IDGA é recomendada como diagnóstico oficial no programa de erradicação da enfermidade na Alemanha.

KAADEN et alii (1978), testando 76 animais no período de 1974 a 1978, em 22 testes repetidos, num total de 1672 amostras, não encontraram nenhum falso positivo à IDGA com antígenos P e GP.

RESSANG et alii (1978a) comparando a IFD, FC e IDGA com antígeno glicoproteico do Laboratório PITMAN-MOORE, em 1495 soros, encontraram alta correlação entre os três métodos. Houve discrepância em 38 soros (2,5%), que foi evidente em soros com baixa concentração de anticorpos. Analisando as três técnicas, os autores concluíram que todas são específicas. A IDGA é simples com leitura entre 24 e 48 horas; já a FC, além de ser laboriosa, requer o fator

anti-complemento. A IFD é específica, porém, necessita de cultivo celular. Em animais jovens ou com infecção recente, a combinação da IFD e IDGA seria a ideal.

RESSANG et alii (1978b), testando 2311 soros, frente à técnica de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) e a IDGA com antígeno GP, encontraram discrepância de 0,5% entre ambos os testes (12 amostras) sendo seis positivos à ELISA e negativos à IDGA e seis negativos à ELISA e positivos à IDGA; 53 foram positivos aos dois métodos e 2246 negativos.

TRAININ et alii (1978), afirmaram que o método de escolha utilizado em laboratórios da CEE é a IDGA com antígeno GP, argumentando que, para triagens de rebanhos, o método de escolha ideal seria este. Entretanto, para casos individuais, necessita-se um teste adicional.

FERRER (1980) afirmou que por ter sido demonstrado que soros positivos à IDGA com antígeno GP foram negativos à mesma técnica com antígeno P e a FC, aceitou-se que a IDGA com antígeno GP seria a técnica ideal à detecção da infecção. Entretanto, necessita-se considerar a técnica de produção do mesmo, a possível contaminação das células com outros vírus, principalmente o da diarréia bovina a vírus entre outros fatores. O autor discorda de tal técnica como diagnóstico definitivo, argumentando que esta seria ideal à triagens iniciais. Outro fator que diminuiria sua eficácia, seria a impossibilidade de, em animais menores de oito meses, a distinção entre infecção e anticorpos maternos adquiridos passivamente.

2.5.2.2. Variação no título de anticorpos

BAUMGARTENER (1977) relatou a possibilidade que condições de parto e colostro podem ter influência no título de anticorpos, especialmente quando se usa IDGA. Animais com altos títulos de anticorpos antes do parto, os a-

presentaram também no colostro os quais permaneceram, pelo menos, por sete dias e por alguns meses no leite. Em animais com baixos títulos de anticorpos, somente foi possível detectá-los no colostro, pela IDGA e com antígeno glicoproteico, por um prazo máximo de dois dias.

BAUSE et alii (1978) afirmaram que animais mostram diminuição no título de anticorpos a partir de, aproximadamente, quatro semanas antes do parto. Este retorna ao original de 2-4 semanas após o parto. Animais com baixo título apresentam reação negativa neste último período.

2.5.2.3. Comparação entre IDGA em placa e em lâmina

FERREIRA et alii (1980), encontraram em 300 soros testados, 201 positivos à IDGA em placa, com antígeno GP, ao passo que na IDGA em lâmina, somente 176 soros foram positivos.

2.6. Interferência com a vacinação anti-febre aftosa

Em medicina humana relatou-se que leucemias agudas ou crônicas causam diminuição na formação de anticorpos (MULLER et alii, 1968).

Analogamente, verificou-se em camundongos e aves, que diversos vírus de leucose desenvolvem uma ação imunossupressiva (SALAMAN & WEDDERBUN, 1966; BORELLA, 1969).

A influência da leucose enzoótica bovina sobre a formação de anticorpos, após vacinação anti-febre aftosa que é utilizada mais frequentemente em bovinos, foi testada por MAMMERICKX & ANTOINE (1970). Os autores, trabalhando com bovinos após a revacinação, utilizaram como diagnóstico da LEB, a hematologia e não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos infectados

e não infectados.

SEILS et alii (1970), realizando experimento em bovinos infectados e não infectados após primovacinação, com vacina monovalente contra febre aftosa, encontraram diferenças nos títulos de anticorpos, entre os dois grupos, que não foram estatisticamente significativas. Os autores diagnosticaram a LEB através de técnicas hematológicas.

ASTUDILLO (1980), considerou que um bovino estaria protegido da febre aftosa quando seu título, na técnica de microneutralização, estivesse em torno de 2,40.

TABELA I - Classificação de bovinos, através do número absoluto de linfócitos por mm^3 , de acordo com a faixa etária, segundo chave linfocitária de Bendixen, para LEB. Minas Gerais, 1981

Faixa etária	Normal	Suspeito	Linfocitose
0 → 1	< 10.000	10.000-12.000	> 12.000
1 → 2	< 9.000	9.000-11.000	> 11.000
2 → 3	< 7.500	7.500- 9.500	> 9.500
3 → 4	< 6.500	6.500- 8.500	> 8.500
> 4	< 5.000	5.000- 7.000	> 7.000

Fonte: BENDIXEN (1958)

TABELA II - Classificação de bovinos, através do número absoluto de linfócitos ,por mm^3 , de acordo com a faixa etária, segundo chave linfocitária da CEE, para LEB. Minas Gerais, 1981

Faixa etária (anos)	Normal	Suspeito	Linfocitose
0 → 1	< 11.000	11.000-13.000	> 13.000
1 → 2	< 10.000	10.000-12.000	> 12.000
2 → 3	< 8.500	8.500-10.500	> 10.500
3 → 4	< 7.500	7.500- 9.500	> 9.500
4 → 5	< 6.500	6.500- 8.500	> 8.500
5 → 6	< 6.000	6.000- 8.000	> 8.000
> 6	< 5.500	5.500- 7.500	> 7.500

Fonte: RESSANG et alii (1976)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Rebanho

O rebanho estudado, com parte dos animais importada do Canadá, pertence a uma fazenda situada na Região Metalúrgica de Minas Gerais e é composto de 230 bovinos Holandês Preto e Branco (HPB), em diferentes faixas etárias (TAB. III).

Pelo histórico do rebanho já haviam sido diagnosticados casos de leucose enzoótica bovina, através de exames clínicos e anatomopatológicos. Durante a realização do presente trabalho, no período de janeiro de 1980 a março de 1981, ocorreram quatro mortes causadas pela enfermidade.

3.2. Manejo

Os animais eram mantidos em regime de campo, recebendo no momento da ordenha, suplementação alimentar composta de silagem, ração para leite e "rolão de milho".

Os bezerros após o nascimento recebiam exclusivamente o colostro durante 24 horas, sendo transferidos para bezerreiros individuais, onde eram aleitados através de baldes. Aos 20 dias de idade eram soltos em piquetes,

recebendo aleitamento artificial, feno e concentrados, até a idade de seis meses.

Adota-se, neste rebanho, a inseminação artificial, como rotina, e a monta natural é utilizada em casos especiais. O sêmen empregado originava-se do Canadá.

Nos animais importados era feita premunição contra *Babesia* sp e *Anaplasma marginale*. Além destes, não foi diagnosticado nenhum outro hemoparasito.

Os animais eram vermifugados quando há suspeita clínica de parasitoses, e o controle de carrapatos é feito de 20 em 20 dias, por aspersão.

Eram utilizadas vacinas contra febre aftosa, brucelose, leptospirose e carbúnculo sintomático.

Todos os animais eram negativos à brucelose e tuberculose. Além da LEB, não foram diagnosticadas outras enfermidades no rebanho.

3.3. Diagnóstico da leucose enzoótica bovina

3.3.1. Técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) em placa

Utilizou-se o "KIT Leukassay B"*.

3.3.1.1. Preparo do ágar-gel

Solução tampão:

NaOH	2,0 g
H ₃ BO ₃	9,0 g
NaCl	70,0 g
H ₂ O _{DD}	1000 ml
pH 8,6	

* Leukassay - B. Bovine leukemia Glycoprotein, Immunodifusion antigen, ovine cell line origin; Reagent serum and reference serums, bovine origin PITMAN-MOORE INC., Washington Crossing, N.J. 08560

A cada 1000 ml da solução tampão adicionaram-se 7,0 g de ágar Noble*, obtendo-se concentração final de 0,7% de ágar. Foram colocados 15 ml do ágar aquecido entre 55 a 60°C, em placas de Petri de 100 mm de diâmetro, que permaneceram por 45 minutos à temperatura ambiente do laboratório (20 a 27°C) e por 15 minutos a 4°C, em geladeira, antes da perfuração.

3.3.1.2. Perfuração e preenchimento dos orifícios

Utilizou-se um perfurador de 7,5 mm de diâmetro, sendo os cilindros de ágar removidos a vácuo. Os sete orifícios foram preenchidos com o antígeno, soros de referência e soros testes, com auxílio de pipetas de Pasteur, estéreis, até o desaparecimento do menisco (aproximadamente 0,08 ml). Os orifícios mantinham entre si uma relação equidistante de 3 mm. As placas foram incubadas durante 48 horas à temperatura ambiente do laboratório (20 a 27°C), em câmara úmida.

3.3.1.3. Leitura e interpretação da prova

Para leitura foi utilizada fonte luminosa adequada ao método de imunodifusão; ajustável a várias posições e intensidades de luz, sendo as observações feitas, para maior destaque, contra fundo escuro.

Primeiramente foram lidos resultados dos controles, seguidos dos soros testados, sendo observados os seguintes tipos de reações:

* DIFCO LABORATORIES, Detroit, Michigan, USA

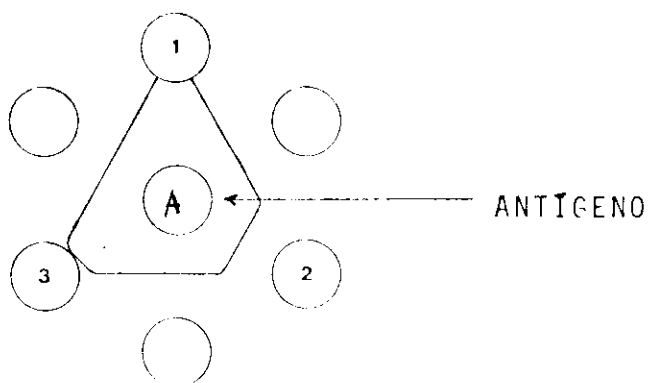


FIGURA 1 - Reações com soros de referência positivo, negativo e fracamente positivo

- 1 = soro de referência negativo: a linha controle continua até o orifício do soro de referência, sem curvar-se.
- 2 = soro de referência positivo: a linha controle curva-se em direção ao soro de referência, mantendo-se mais ou menos equidistante entre este e o antígeno.
- 3 = soro de referência fracamente positivo: a linha controle curva-se ligeiramente em relação ao antígeno, não formando uma linha completa e equidistante entre o soro de referência e o antígeno, situando-se próxima daquele.

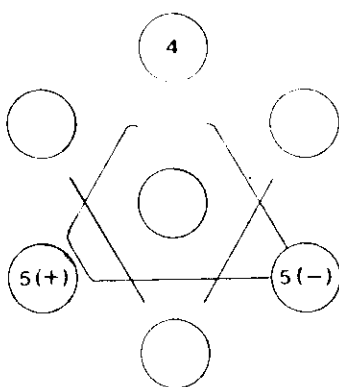


FIGURA 2 - Reações com soros fortemente positivos e soros com linhas não específicas

4 = soro teste fortemente positivo: a linha volta-se em direção ao antígeno, continuando como linha descontínua entre o soro teste e o antígeno. Para obtenção de linhas mais nítidas, os soros devem ser diluídos a 1:4 ou 1:8.

5(+); 5(-) = linhas de precipitação não específicas: cruzam-se com as do soro teste, sendo formadas por outras reações antígeno-anticorpo que não as causadas pelo vírus da leucose enzoótica bovina.

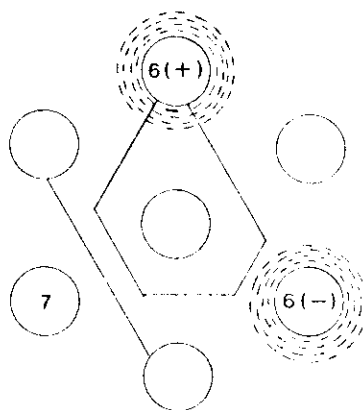


FIGURA 3 - Reações com soros causando turvação e soros produzindo uma segunda linha de precipitação

6(+); 6(-) = soros causando turvação em torno do orifício: pode se dever à presença de lípedes, ocorrendo obscurcimento das linhas de precipitação. Neste caso, deve-se repetir o teste com nova amostra.

7 = soro positivo com segunda linha de precipitação: indica possível reação a um segundo antígeno, presente no vírus da leucose enzoótica bovina.

3.3.2. Técnica da IDGA em lâmina

Seguiu-se o mesmo procedimento da técnica de IDGA em placa, com as seguintes variações da técnica do "KIT

Leukassay B" as lâminas utilizadas foram de 2,5 x 7,5 cm e a quantidade de ágar por lâmina, de 4,5 ml. O perfurador produzia orifícios de 5 mm de diâmetro, que foram preenchidos com, aproximadamente, 0,05 ml do antígeno e soros.

3.3.3. Hematologia

3.3.3.1. Material

O sangue foi colhido por punção na jugular, na quantidade de 3 ml, em tubos de ensaio esterilizados, com o anticoagulante EDTA*. As amostras, levadas ao laboratório num prazo máximo de três horas após a colheita, foram trabalhadas imediatamente. Dos 230 animais, colheram-se duas amostras de cada, intervaladas de três meses.

3.3.3.2. Método

A contagem global de leucócitos foi realizada por processo eletrônico através do "Coulter Counter"**. Para o exame diferencial foi usada a coloração segundo a técnica de Leishman, de acordo com CARVALHO (1978) e a contagem foi realizada conforme SCHALM et alii (1975).

3.4. Interferência com a vacina anti-febre aftosa

3.4.1. Material

As amostras foram colhidas antes da vacinação anti-febre aftosa*** e aos 7, 14, 21, 28 e 60 dias pós-va-

* Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) solução aquosa a 10%

** Coulter Counter - Model Z_{B1}. CAULTER ELETRONICS INC., Florida-USA

*** Vacina Aftobov - LABORATÓRIO RHODIA-MERIEUX, São Paulo-Brasil

cinação, para os grupos primovacinaados e revacinaados.

Após retração do coágulo, em temperatura ambiente, o soro sanguíneo obtido foi centrifugado e conservado a -20°C , até o momento do uso. Antes das provas laboratoriais, inativaram-se os soros aquecendo-os em banho-Maria a 56°C , por 30 minutos.

3.4.2. Método

O nível de anticorpos para o vírus tipo "O" da febre aftosa foi estabelecido mediante prova de microneutralização, descrita por FERREIRA (1976). Utilizou-se o vírus "O₁" Campos. Os títulos de anticorpos são expressos em logarítmos.

3.5. Análise estatística

Para verificação da associação (ou independência) entre idade e infecção e IDGA, em placa e em lâmina, utilizou-se a prova do Qui-quadrado (χ^2) (SNEDECOR & COCHRAN, 1967).

Para verificação da associação (ou independência) entre a IDGA em placa e as chaves linfocitárias de Bendixen e da CEE, a fim de não perder-se a exatidão de informação; recorreu-se à prova exata de FISCHER, com modificações de FREEMAN & HALTON (1952). Para tal prova, os dados foram processados pelo computador Burroughs modelo 6700, do Centro de Computação da Universidade Federal de Minas Gerais.

O cálculo de especificidade e sensibilidade da IDGA, em lâmina, com relação à IDGA em placa, foi realizado segundo THORNER & REMEIN (1961). Os dados foram registrados em tabelas de cálculo e processados de acordo com as fórmulas de THORNER & REMEIN (1961) (TAB. IV).

Para proposição de chave linfocitária utilizou-

se a seguinte metodologia. Cada faixa etária estudada foi dividida em dois grupos positivos e negativos, classificados através da IDGA. Sendo variável o tamanho da amostra para cada grupo específico, estimou-se o desvio padrão comum(s) a partir da amostragem global. Para estes mesmos grupos, foi calculado o intervalo de indivíduos típicos $\bar{x} \pm 1,96$, estabelecendo-se os limites teóricos populacionais inferiores e superiores para cada categoria. A faixa de superposição dos elementos típicos dos dois grupos foi dividida em três intervalos, sendo o da direita incorporado à área dos que apresentavam linfocitose, o da esquerda à área dos normais e a faixa central correspondeu aos elementos ditos suspeitos (FIG. 4). Este procedimento foi adotado em virtude de os valores limites da população típica de um grupo muitas vezes serem abrangidos totalmente pelos limites do outro, impedindo imediata tipificação daqueles valores. Os elementos limítrofes dos intervalos propostos foram calculados de modo que o erro advindo de diagnósticos de falsos positivos ou falsos negativos fosse exatamente 15%.

As percentagens de erro advindas deste procedimento foram calculadas de acordo com a área correspondente, sob a curva normal de Z e englobam não só 2,5% dos elementos atípicos unilaterais como também os 12,5% fixados arbitrariamente para os erros de diagnóstico. Assim sendo, na FIG. 4, a área correspondente ao erro de diagnóstico falso positivo está compreendida entre "c" e "d", onde "d" é o limite superior de elementos típicos negativos e "c" é o limite teórico inferior que se quer propor para o grupo que apresenta linfocitose. Logo, a probabilidade de um falso positivo será:

$$\left[\int_0^{Z_d} F(x) dx + \int_0^{Z_c} F(x) dx \right] + 2,5\% = 15\%$$

onde, $F(x)$ é a curva normal de Z para o grupo sadio. Sendo a diferença entre as áreas integradas 12,5%, calcula-se o valor teórico de Z_c e conseqüentemente o valor linfocitário correspondente ao limite do grupo com linfocitose.

O mesmo raciocínio é aplicável aos elementos "a" e "b", respectivamente limite inferior da população típica com linfocitose e limite superior proposto para o grupo normal.

Para avaliação da possível imunossupressão, os títulos médios de anticorpos, nos bovinos primovacina- dos e revacina- dos, com e sem infecção, em diferentes períodos foram submetidos à análise de variância e comparados entre si, pelo teste "t" de "Student" (SNEDECOR & COCHRAN, 1967).

TABELA III - Composição do rebanho HPB, de acordo com a faixa etária. Minas Gerais, 1981

Classe (anos)	Nº de bovinos	%
0 — 1	34	14,78
1 — 2	31	13,48
2 — 3	33	14,35
3 — 4	32	13,91
4 — 5	36	15,66
5 — 6	23	10,00
6 — 7	15	6,52
7 — 8	7	3,04
8 — 9	4	1,74
9 — 10	5	2,17
> 10	10	4,35
TOTAL	230	100,00

TABELA IV - Modelo de tabela para cálculo de sensibilidade e especificidade da IDGA em lâmina

Resultado da IDGA em lâmina	Resultado da IDGA em placa		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Nota.:

a = bovinos infectados detectados pelo teste

b = falsos positivos ao teste

c = falsos negativos ao testes

d = bovinos não infectados negativos ao teste

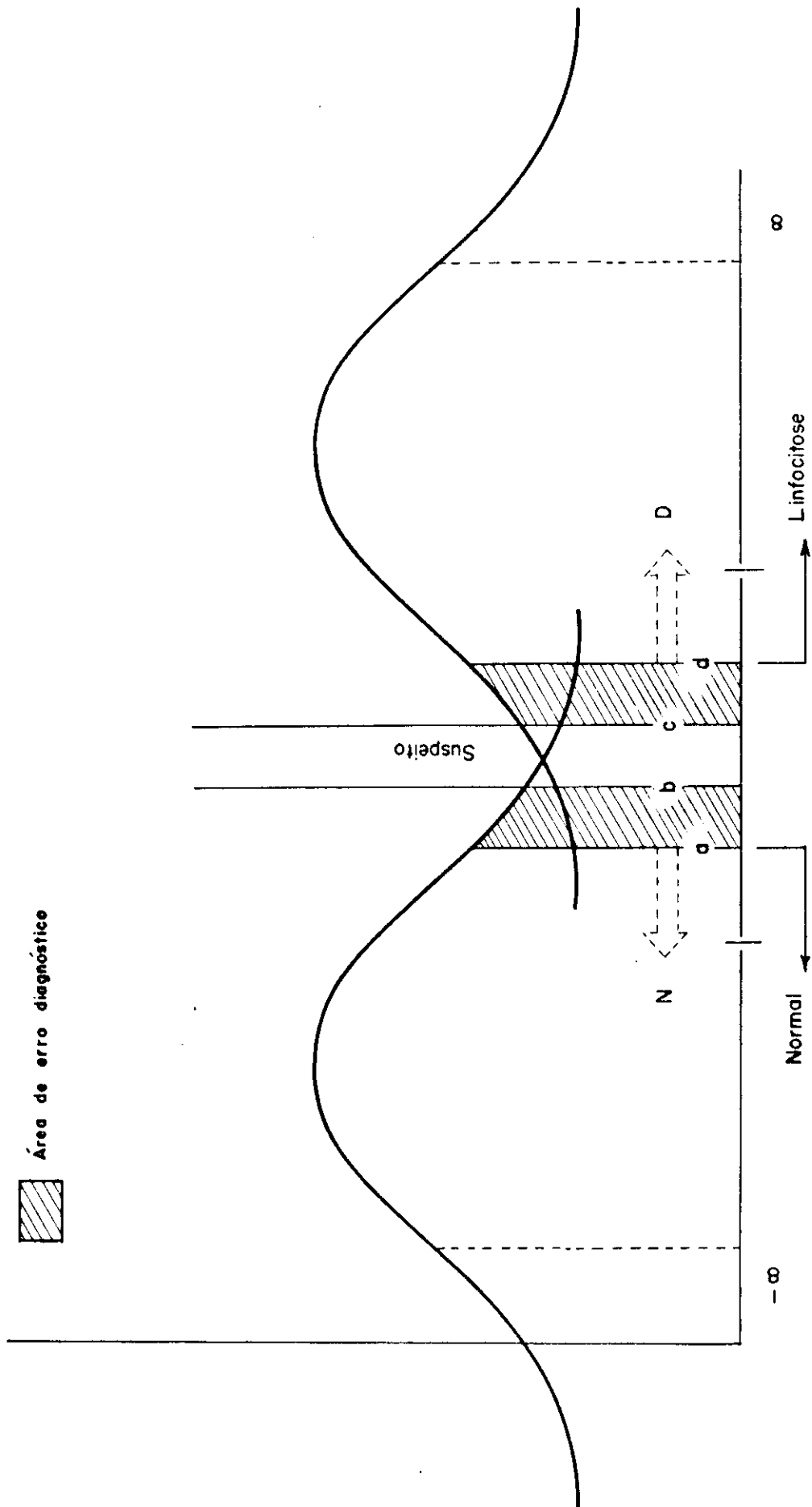


FIG. 4 - Discriminação teórica de áreas adotadas na proposição de chave linfocitária, partindo da caracterização dos grupos experimentais, independentemente de feixe etário.

4. RESULTADOS

4.1. Rebanho

4.1.1. Prevalência da infecção

Dos 230 animais examinados, considerou-se a presença de anticorpos em 163, resultando em prevalência de 70,86% (TAB. V).

4.1.2. Manifestação clínica

Durante o experimento, quatro animais, todos com idade superior a cinco anos, apresentaram quadro clínico e morte. As FIG. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, referem-se aos animais A, B e D.

4.1.3. Associação entre idade e infecção

A associação entre idade e infecção foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$); enquanto bovinos na faixa etária de 0-1 apresentaram 35,29% de infecção, os maiores de seis anos apresentaram 95,12% (TAB. V).

4.2. Evolução sorológica em bezerros

Os resultados de bezerros, filhos de vacas ne-

gativas, que ingeriram colostro, são apresentados na TAB. VI, observa-se que somente um animal foi positivo após sete retestes consecutivos à IDGA, em placa.

Já bezerros, filhos de mães positivas, que também ingeriram colostro, apresentaram grande variação, quanto a positividade ou não, através da técnica de diagnóstico utilizada. Observa-se que somente dois foram positivos após sete retestes e que a grande maioria tornou-se negativa entre 30 e 180 dias, após ingestão do colostro. Somente um bezerro, filho de vaca positiva, permaneceu negativo do 30 aos 300 dias (TAB. VII).

4.5. Diagnóstico

4.3.1. Hematologia

4.3.1.1. Comparação entre médias de número de linfócitos por mm^3 e IDGA em placa

A comparação entre média do número de linfócitos por mm^3 e IDGA em placa, individualmente, segundo a faixa etária dos 250 bovinos, após dois leucogramas intervalados de três meses, é apresentada nas TAB. VIII, IX, X, XI, XII, XIII e XIV.

Observa-se a variação linfocitária em grupos positivos e negativos à IDGA. De 0-1 ano os positivos tiveram seus valores limites entre 19.780 e 5.740 e os negativos entre 13.004 e 3.130. Entre 1-2 anos, os positivos variaram de 18.900 a 4.202 e os negativos de 13.147 a 3.143. Na faixa etária de 2-3 anos, a variação para os positivos foi de 21.560 a 4.413 e para os negativos de 11.187 a 3.897. No grupo de 3-4 anos, a variação para os positivos foi de 19.950 a 4.056 e para os negativos, de 9.709 a 4.197. Entre 4-5 anos, os valores limites foram de 18.960 a 4.107 para os positivos e 8.540 a 3.817 para os negativos. De 5-6 anos,

positivos tiveram seus valores de 16,311 a 4,414 e os negativos, de 8.159 a 3.967. No grupo maior de seis anos, a variação foi de 19.440 a 3.307 para os positivos a 13.110 a 4.206 para os negativos.

4.3.1.2. Classificação segundo as chaves linfocitárias de Bendixen e da CEE

De acordo com a chave de Bendixen, observou-se 89 (38,7%) positivos, 40 (17,39) suspeitos e 101 (43,91%) negativos (TAB. XV).

Segundo a chave da CEE, encontrou-se um total de 67 (29,13%) positivos, 50 (21,74%) suspeitos e 113 (49,13%) negativos (TAB. XVI).

4.3.1.3. Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária de Bendixen

Na faixa etária de 0-1 ano, 5 (14,17%) bovinos foram falsos negativos e 2 (5,88%) falsos positivos. Entre 1-2 anos, 7 (22,58%) foram falsos negativos e 3 (9,68%) falsos positivos. Já na faixa etária de 2-3 anos obteve-se 5 (15,15%) falsos negativos e 2 (6,06%) falsos positivos. Entre 3-4 anos observaram-se 8 (25,00%) falsos negativos e 1 (3,13%) falso positivo. Nos maiores de quatro anos, 23 (23,00%) foram falsos negativos e 3 (3,00%) falsos positivos (TAB. XVII, XVIII, XIX, XX e XXI).

4.3.1.4. Comparação entre IDGA em placa e chave da CEE

Na faixa etária de 0-1 ano observam-se 5 (14,71%) falsos negativos e 1 (2,94%) falso positivo (TAB. XXII). Entre 1-2 anos existem 9 (29,03%) falsos negativos e 2 (6,45%) falsos positivos (TAB. XXIII). Na faixa de 2-3 anos,

7 (21,21%) foram falsos negativos e 2 (6,06%) falsos positivos (TAB. XXIV). De 3-4 anos encontraram-se 9 (28,12%) falsos negativos e 1 (3,12%) falso positivo (TAB. XXV). Entre 4-5 anos os falsos negativos foram 9 (25,00%) e falsos positivos 1 (2,78%) (TAB. XXVI). De 5-6 anos, 7 (30,34%) foram falsos negativos e 1 (4,35%) falso positivo (TAB. XXVII). Nos maiores de 6 anos, 12 (29,27%) foram falsos negativos e 1 (2,44%) falso positivo (TAB. XXVIII).

4.3.1.4. Comparação da IDGA e as chaves de Bendixen e CEE, excluindo-se os suspeitos, os falsos positivos e negativos

Dos 230 bovinos classificados segundo IDGA em placa, observou-se que 163 (70,86%) foram positivos e 67 (29,14%) negativos. Quando utilizada a chave de Bendixen, detectaram-se 131 bovinos; 78 positivos e 53 negativos (TAB. XXIX).

A mesma comparação com a chave da CEE assinalou 58 positivos e 55 negativos (TAB. XXX).

4.3.1.5. Associação (ou independência) entre hematologia e IDGA

A associação (ou independência) entre chave de Bendixen e CEE com IDGA, segundo prova exata de FISHER, é apresentada na TAB. XXXI e XXXII. Verifica-se que somente houve associação entre ambas as chaves e IDGA nos grupos de 0-1 e 2-3 anos.

4.3.1.6. Alterações morfológicas dos linfócitos

Tais alterações provenientes de 460 leucogramas, são apresentadas na TAB. XXXIII. Observou-se que a maior frequência de atipias por animal foi de linfoblastos e pro

linfócitos, 11 (2,39%), ocorrendo simultaneamente. A menor frequência ficou com as células em mitose, isoladamente, que apresentou a frequência de 0,21% ocorrendo em um só bovino. Verificou-se que em 460 leucogramas, somente 32 (6,95%) apresentaram alterações morfológicas linfocitárias.

4.3.1.7. Proposta de chave linfocitária

É apresentada na XXXIV. As faixas etárias só vão até seis anos. No grupo maior de seis, não foi possível estabelecer valores linfocitários, pois os positivos eram 39 e os negativos somente dois, ocorrendo superposição de valores linfocitários.

4.3.2. Diagnóstico sorológico

4.3.2.1. Comparação entre as técnicas de IDGA, em placa e em lâmina

A comparação entre as duas técnicas, segundo idade, pode ser observada na TAB. XXXV. Notou-se maior concordância entre os métodos nos animais maiores de três anos de idade. A maior diferença é verificada na faixa etária de 0-1 ano, que apresentou 12 (35,29%) positivos na placa e 4 (11,76%) em lâmina.

A placa detectou 163 (70,86%) positivos e a lâmina 139 (60,43%). À medida que aumenta a idade, diminui a percentagem de falsos negativos à lâmina.

A comparação entre as duas técnicas foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

4.3.3.2. Sensibilidade e especificidade da IDGA, em lâmina comparada à placa

A sensibilidade foi de 85,27% e a especificidade de 100,00%.

4.4. Interferência com a vacina anti-febre aftosa

Os resultados das médias dos títulos de anticorpos, anti-febre aftosa, antes da vacinação e aos 7, 14, 21, 28, 60 e 90 dias pós-vacinação, em bovinos primovacinados e revacinados, com e sem infecção, são apresentados nas TAB. XXXVI e XXXVII. Estatisticamente, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos nas diversas faixas etárias, em diferentes períodos.

TABELA V - Comparação entre idade e detecção de anticorpos, através da técnica de IDGA em placa, para LEB, em um rebanho HPB. Minas Gerais, 1981

Faixa etária (anos)		Positivos ã IDGA	%	Negativos ã IDGA	%
0 —————	1	12	35,29	22	64,71
1 —————	2	15	48,39	16	51,61
2 —————	3	22	66,66	11	33,34
3 —————	4	24	75,00	8	25,00
4 —————	5	31	86,11	5	13,89
5 —————	6	20	86,95	3	13,05
	> 6	39	95,12	2	4,88
TOTAL		163	78,86	67	29,14

$$X^2 \text{ tab} = 12,59$$

$$X^2 \text{ Cac} = 47,55$$

TABELA VI - Resultados da IDGA em placa, de bezerros que ingeriram colostro de vacas negativas à LEB, pela mesma técnica, em um rebanho HPB. Minas Gerais, 1981

Nº de ordem	Idade dos bezerros (dias)						
	50	60	90	120	180	240	500
				Resultado IDGA em placa			
1	N	N	N	N	N	N	N
2	N	N	N*				
3	P	P	P	P	P	P	P
4	N	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N	N

* Animal retirado do experimento

TABELA VII - Resultados da IDGA em placa, de bezerros que ingeriram colostro de vacas positivas à LEB, pela mesma técnica, em um rebanho HPB. Minas Gerais, 1981

Nº de ordem	Idade dos bezerros (dias)						Resultado IDGA em placa
	50	60	90	120	180	240	
1	P	P	P	P	P	P	P
2	P	P	P	P	N	N	N
3	P	P	P	P	P	N	N
4	P	P	N	N	N	N	N
5	P	P	P	P*	N	N	N
6	P	P	P	N	N	N	N
7	P	P	P	P	P*	N	N
8	P	P	P	P	N	N	N
9	P	P	P	P	P	N	N
10	P	P	P	P	P	P	P
11	N	N	N	N	N	N	N
12	P	P	P*				

* Animais retirados do experimento



TABELA VIII - Comparação entre a média do número de linfócitos por mm^3 e IDGA em placa para LEB, para um rebanho HPB, na faixa etária de 0-1 ano. Minas Gerais, 1981

Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA	Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA
1	19.780	P	18	7.379	N
2	16.985	P	19	6.854	P
3	14.200	P	20	6.368	N
4	13.735	P	21	6.193	N
5	13.004	N	22	6.157	N
6	12.714	P	23	6.037	N
7	12.180	N	24	5.797	N
8	11.518	P	25	5.740	P
9	11.417	N	26	5.414	N
10	11.004	P	27	5.312	N
11	9.306	P	28	4.918	N
12	8.614	N	29	4.298	N
13	8.246	P	30	4.140	N
14	8.224	N	31	4.118	N
15	7.896	P	32	4.083	N
16	7.814	N	33	3.230	N
17	7.519	N	34	3.130	N

TABELA IX - Comparação entre a média do número de linfócitos por mm^3 e IDGA em placa para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 1-2 anos. Minas Gerais, 1981

Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA	Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA
35	18.900	P	51	6.101	N
36	18.000	P	52	5.895	P
37	17.918	P	53	5.185	N
38	16.660	P	54	5.110	N
39	16.065	P	55	5.103	N
40	13.147	N	56	4.417	N
41	12.102	N	57	4.316	N
42	11.004	N	58	4.314	P
43	10.354	P	59	4.205	N
44	9.198	P	60	4.202	P
45	9.106	P	61	4.201	N
46	9.008	N	62	4.158	N
47	8.758	P	63	4.144	N
48	8.140	P	64	4.116	N
49	7.700	P	65	3.143	N
50	7.068	P			

TABELA X - Comparação entre a média do número de linfócitos, por mm^3 e IDGA em placa para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 2-3 anos. Minas Gerais, 1981

Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA	Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA
66	21.560	P	82	8.644	P
67	19.600	P	85	8.083	P
68	17.250	P	84	7.616	P
69	16.536	P	85	6.140	P
70	13.578	P	86	5.224	N
71	12.710	P	87	5.166	P
72	12.040	P	88	5.140	P
73	11.187	N	89	5.117	N
74	10.702	N	90	4.842	N
75	10.411	P	91	4.715	P
76	10.213	P	92	4.513	N
77	10.114	P	93	4.413	P
78	9.585	P	94	4.316	N
79	9.100	P	95	4.218	N
80	8.940	P	96	4.142	N
81	8.709	P	97	4.119	N
			98	3.897	N

TABELA XI - Comparação entre a média do número de linfócitos por mm^3 e IDGA em placa para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 3-4 anos. Minas Gerais, 1981

Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA	Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA
99	19.950	P	115	6.903	P
100	18.810	P	116	6.210	P
101	17.920	P	117	6.104	N
102	15.879	P	118	5.624	P
103	11.302	P	119	5.544	P
104	10.005	P	120	5.520	P
105	9.955	P	121	5.319	N
106	9.709	N	122	5.118	N
107	9.204	P	123	4.979	P
108	8.505	P	124	4.900	P
109	8.280	P	125	4.712	P
110	8.250	P	126	4.701	N
111	7.811	P	127	4.248	N
112	7.788	P	128	4.202	N
113	7.738	P	129	4.197	N
114	7.735	P	130	4.056	P

TABELA XII - Comparação entre a média do número de linfócitos por mm^3 e IDGA em placa para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 4-5 anos. Minas Gerais, 1981

Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA	Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA
131	18.960	P	149	7.640	P
132	18.270	P	150	7.504	P
133	16.875	P	151	7.130	P
134	13.804	P	152	6.862	P
135	13.167	P	153	6.534	P
136	12.276	P	154	5.610	P
137	11.400	P	155	5.512	N -
138	10.846	P	156	5.184	P
139	10.419	P	157	4.818	P -
140	10.220	P	158	4.703	P -
141	9.875	P	159	4.692	P -
142	9.540	P	160	4.624	N
143	8.896	P	161	4.514	P -
144	8.875	P	162	4.420	P -
145	8.540	N -	163	4.212	N
146	8.453	P	164	4.211	P -
147	8.241	P	165	4.107	P -
148	7.866	P	166	3.817	N

TABELA XIII - Comparação entre a média do número de linfócitos por mm^3 e IDGA em placa para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 5-6 anos. Minas Gerais, 1981

Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA	Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA
167	16.511	P	179	6.642	P
168	15.968	P	180	6.120	P
169	14.399	P	181	5.900	P
170	13.468	P	182	5.040	P
171	12.710	P	185	4.972	P
172	9.486	P	184	4.602	P
173	8.159	N	185	4.412	P
174	7.784	P	186	4.124	P
175	7.420	P	187	4.414	P
176	7.238	P	188	3.967	N
177	7.085	P	189	3.967	N
178	6.664	P			

TABELA XIV - Comparação entre a média do número de linfócitos por mm^3 e IDGA em placa para LEB, em um rebanho HPB, em bovinos maiores de 6 anos. Minas Gerais, 1981

Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA	Nº de ordem	Nº de linfócitos	IDGA
190	19.440	P	211	6.513	P
191	17.870	P	212	6.498	P
192	16.160	P	213	6.380	P
193	13.213	P	214	6.370	P
194	13.110	N	215	6.032	P
195	12.257	P	216	5.712	P
196	11.710	P	217	5.580	P
197	11.107	P	218	5.238	P
198	9.102	P	219	4.958	P
199	8.700	P	220	4.702	P
200	8.400	P	221	4.686	P
201	8.102	P	222	4.448	P
202	7.652	P	223	4.368	P
203	7.638	P	224	4.318	P
204	7.614	P	225	4.311	P
205	7.548	P	226	4.302	P
206	7.332	P	227	4.223	P
207	7.198	P	228	4.206	N
208	7.182	P	229	3.904	P
209	6.603	P	230	3.307	P
210	6.560	P			

TABELA XV - Classificação, segundo a chave linfocitária de Bendixen, para LEB, em um rebanho HPB. Minas Gerais, 1981

Faixa etária (anos)	Chave de Bendixen	Nº de bovinos	%
0 — 1	Positivos	7	20,59
	Suspeitos	3	8,82
	Negativos	24	70,59
1 — 2	Positivos	8	25,81
	Suspeitos	4	12,90
	Negativos	19	61,29
2 — 3	Positivos	13	39,39
	Suspeitos	6	18,18
	Negativos	14	42,43
3 — 4	Positivos	10	31,25
	Suspeitos	7	21,88
	Negativos	15	46,87
> 4	Positivos	51	51,00
	Suspeitos	20	20,00
	Negativos	29	29,00
TOTAL		250	

TABELA XVI - Classificação segundo a chave linfocitária da CEE, para LEB, em um rebanho HPB. Minas Gerais, 1981

Faixa etária (anos)	Chave da CEE	Nº de bovinos	%
0 — 1	Positivos	5	14,71
	Suspeitos	5	14,71
	Negativos	24	70,58
1 — 2	Positivos	7	22,58
	Suspeitos	2	6,45
	Negativos	22	70,97
2 — 3	Positivos	9	27,27
	Suspeitos	8	24,24
	Negativos	16	48,49
3 — 4	Positivos	8	25,00
	Suspeitos	8	25,00
	Negativos	16	50,00
4 — 5	Positivos	15	41,67
	Suspeitos	8	22,22
	Negativos	13	36,11
5 — 6	Positivos	7	30,43
	Suspeitos	7	30,43
	Negativos	9	39,4
> 6	Positivos	16	39,02
	Suspeitos	12	29,26
	Negativos	41	31,71
TOTAL		230	

TABELA XVII - Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária de Bendixen, para LEB, em um rebanho HPB na faixa etária de 0-1 ano. Minas Gerais, 1981

IDGA em placa		Chave de Bendixen						
Resultado	Nº	%	Positivos	%	Suspeitos	%	Negativos	%
Positivos	12	55,29	5	14,71	2	5,88	5	14,71
Negativos	22	64,71	2	5,88	1	2,94	19	55,88

TABELA XVIII - Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária de Bendixen, para LEB, em um rebanho HPB na faixa etária de 1-2 anos. Minas Gerais, 1981

IDGA em placa		Chave de Bendixen						
Resultado	Nº	%	Positivos	%	Suspeitos	%	Negativos	%
Positivos	15	48,59	5	16,3	3	9,68	7	22,58
Negativos	16	51,61	5	9,68	1	5,23	12	58,71

TABELA XIX - Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária de Bendixen, para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 2-3 anos. Minas Gerais, 1981

IDGA em placa		Chave de Bendixen						
Resultado	Nº	%	Positivos	%	Suspeitos	%	Negativos	%
Positivos	22	66,67	11	53,33	6	18,18	5	15,15
Negativos	11	55,33	2	6,06	0	0,00	9	27,27

TABELA XX - Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária de Bendixen, para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 3-4 anos. Minas Gerais, 1981

IDGA em placa		Chave de Bendixen						
Resultado	Nº	%	Positivos	%	Suspeitos	%	Negativos	%
Positivos	24	75,00	9	28,15	7	21,87	8	25,00
Negativos	8	25,00	1	5,15	0	0,00	7	21,87

TABELA XXI - Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária de Bendixen, para LEB, em um rebanho HPB, em bovinos maiores de 4 anos. Minas Gerais, 1981

IDGA em placa		Chave de Bendixen						
Resultado	Nº	%	Positivos %	Suspeitos %	Negativos %			
Positivos	90	90,00	48	48,00	19	19,00	23	23,00
Negativos	10	10,00	3	3,00	1	1,00	6	6,00

TABELA XXII - Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária da CEE, para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 0-1 ano. Minas Gerais, 1981

IDGA em placa		Chave da CEE						
Resultado	Nº	%	Positivos %	Suspeitos %	Negativos %			
Positivos	12	55,29	4	11,76	3	8,82	5	14,71
Negativos	22	64,71	1	2,94	2	5,88	19	55,88

TABELA XXIII - Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária da CEE, para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 1-2 anos. Minas Gerais, 1981

IDGA em placa		Chave da CEE						
Resultado	Nº	%	Positivos	%	Suspeitos	%	Negativos	%
Positivos	15	48,59	5	16,13	1	3,23	9	29,03
Negativos	16	51,61	2	6,45	1	3,23	13	41,93

TABELA XXIV - Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária da CEE, para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 2-3 anos. Minas Gerais, 1981

IDGA em placa		Chave da CEE						
Resultado	Nº	%	Positivos	%	Suspeitos	%	Negativos	%
Positivos	22	66,67	7	21,21	8	24,25	7	21,21
Negativos	11	33,55	2	6,06	0	0,00	9	27,27

TABELA XXV - Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária da CEE, para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 3-4 anos. Minas Gerais, 1981

IDGA em placa		Chave da CEE						
Resultado	Nº	%	Positivos	%	Suspeitos	%	Negativos	%
Positivos	24	75,00	7	21,88	8	25,00	9	28,12
Negativos	8	25,00	1	5,12	0	0,00	7	21,88

TABELA XXVI - Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária da CEE, para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 4-5 anos. Minas Gerais, 1981

IDGA em placa		Chave da CEE						
Resultado	Nº	%	Positivos	%	Suspeitos	%	Negativos	%
Positivos	31	86,11	14	58,89	8	22,22	9	25,00
Negativos	5	13,89	1	2,78	0	0,00	4	11,11

TABELA XXVII - Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária da CEE, para LEB, em um rebanho HPB, na faixa etária de 5-6 anos. Minas Gerais, 1981

IDGA em placa		Chave da CEE						
Resultado	Nº	%	Positivos	%	Suspeitos	%	Negativos	%
Positivos	20	86,95	6	26,09	7	30,43	7	30,43
Negativos	3	13,05	1	4,35	0	0,00	2	8,70

TABELA XXVIII - Comparação entre IDGA em placa e chave linfocitária da CEE, para LEB, em um rebanho HPB, em bovinos maiores de 6 anos de idade. Minas Gerais, 1981

IDGA em placa		Chave da CEE						
Resultado	Nº	%	Positivos	%	Suspeitos	%	Negativos	%
Positivos	59	95,12	15	36,58	12	29,27	12	29,27
Negativos	2	4,88	1	2,44	0	0,00	1	2,44

TABELA XXIX - Comparação entre IDGA em placa para LEB e chave linfocitária de Bendixen, excluindo-se a categoria de suspeitos, falsos negativos e falsos positivos, em um rebanho HHP. Minas Gerais, 1981

Faixa etária (anos)	IDGA em placa	Nº de bovinos	%	Chave linfocitária	Nº de bovinos	%
0 → 1	Positivos	12	35,29	Positivos	5	14,70
	Negativos	22	64,71	Negativos	19	55,80
1 → 2	Positivos	15	48,59	Positivos	5	16,13
	Negativos	16	51,61	Negativos	12	38,71
2 → 3	Positivos	22	66,67	Positivos	11	33,33
	Negativos	11	33,33	Negativos	9	27,27
3 → 4	Positivos	24	75,00	Positivos	9	28,13
	Negativos	8	25,00	Negativos	7	21,88
> 4	Positivos	90	90,00	Positivos	48	48,00
	Negativos	10	10,00	Negativos	6	6,00
TOTAL		230			131	

TABELA XXX - Comparação entre IDGA em placa para LEB e chave linfocitária da CEE, excluindo-se a categoria de suspeitos, os falsos negativos e falsos positivos, em rebanho HPB. Minas Gerais, 1981

Faixa etária (anos)	IDGA em placa	Nº de bovinos	%	Chave Linfocitária	Nº de bovinos	%
0 — 1	Positivos	12	35,29	Positivos	4	11,76
	Negativos	22	64,71	Negativos	19	55,88
1 — 2	Positivos	15	48,39	Positivos	5	16,13
	Negativos	16	51,61	Negativos	13	41,93
2 — 3	Positivos	22	66,67	Positivos	7	21,21
	Negativos	11	33,33	Negativos	9	27,27
3 — 4	Positivos	24	75,00	Positivos	7	21,88
	Negativos	8	25,00	Negativos	7	21,88
4 — 5	Positivos	31	86,11	Positivos	11	38,88
	Negativos	5	13,89	Negativos	4	11,11
5 — 6	Positivos	20	86,96	Positivos	6	26,09
	Negativos	3	13,04	Negativos	2	8,70
> 6	Positivos	39	95,12	Positivos	15	36,58
	Negativos	2	4,88	Negativo	1	2,44
TOTAL		230			115	

TABELA XXXI - Associação (ou independência) entre IDGA em placa e chave de Bendixen, estabelecidas através da prova exata de Fisher, segundo a faixa etária, em um rebanho HPB, Minas Gerais. 1981

Faixa etária	Resultado da prova exata de Fisher
0 —→ 1	0,028628
1 —→ 2	0,580722
2 —→ 3	0,010742
3 —→ 4	0,065486
> 4	0,179236

TABELA XXXII - Associação (ou independência) entre IDGA em placa e chave da CEE, estabelecidas através da prova exata de Fisher, segundo faixa etária, em um rebanho HPB, Minas Gerais. 1981

Faixa etária	Resultado da prova exata de Fisher
0 —→ 1	0,027854
1 —→ 2	0,723898
2 —→ 3	0,025014
3 —→ 4	0,108148
4 —→ 5	0,229988
5 —→ 6	0,810842
> 6	0,999989

TABELA XXXIII - Alterações morfológicas, observadas em linfócitos, em um rebanho HPB. Minas Gerais, 1981

Tipo de célula	Número de bovinos	%
Linfoblasto e prolinfócito	11	2,39
Linfoblasto, prolinfócito e célula em mitose	5	1,08
Linfoblasto	2	0,43
Prolinfócito	8	1,73
Célula em mitose	1	0,21
Prolinfócito e célula em mitose	5	1,08
TOTAL	32	6,95

* Observações de 460 leucogramas

TABELA XXXIV - Proposta de chave linfocitária para presumível diagnóstico da LEB, segundo número de linfócitos por mm^3 . Minas Gerais, 1981

Faixa etária (anos)	Negativo	Suspeito	Positivo
0 ——— 1	< 6.986	6.986-11.115	> 11.115
1 ——— 2	< 6.509	6.509-10.725	> 10.725
2 ——— 3	< 5.957	5.957-10.170	> 10.170
3 ——— 4	< 4.557	4.557-10.059	> 10.059
4 ——— 5	< 4.391	4.391- 9.849	> 9.849
5 ——— 6	< 3.887	3.888- 0.903	> 9.903

TABELA XXXV - Comparação entre técnica de IDGA em placa e em lâmina, para LEB, em um rebanho HPB, segundo faixa etária. Minas Gerais, 1981

Faixa etária (anos)	IDGA								
	Placa			Lâmina					
	Total de examinados	Positivos	% Negativos	Total de examinados	Positivos	% Negativos			
0	54	12	55,29	22	64,71	4	11,76	50	88,24
1	31	15	48,39	16	51,61	10	32,25	21	67,75
2	33	22	66,66	11	33,34	18	54,54	15	45,46
3	32	24	75,00	8	25,00	21	65,63	11	34,37
4	36	31	86,11	5	13,89	29	80,55	7	19,45
5	23	20	86,95	3	13,05	19	86,61	4	17,39
> 6	41	59	95,12	2	4,88	58	92,68	3	7,32
TOTAL	250	163	70,86	67	29,14	139	60,43	91	59,57

* χ^2 tab = 5,99

χ^2 calc = 144,45

TABELA XXXVI - Média dos títulos de anticorpos contra o vírus "O" de febre aftosa, antes da vacinação e aos 7, 14, 21, 28, 60 e 90 dias pós-vacinação em bovinos de um rebanho HBP, primo-vacinados e revacinados, negativos à IDGA em placa, para LEB, Minas Gerais. 1981

Faixa etária (meses/anos)	Nº de bovinos	Dias pós-vacinação						
		0	7	14	21	28	60	90
		Títulos de anticorpos (log)						
5 — 6 m	18 *	1,21	2,05	2,45	2,70	2,85	2,65	2,50
6 m — 2 a	20	2,36	2,52	2,70	2,85	2,94	2,74	2,54
2 — 4 a	19	2,44	2,59	2,75	2,89	2,94	2,78	2,56
4 — 6 a	8	2,43	2,60	2,73	2,79	2,86	2,69	2,55
> 6 a	2	2,27	2,47	2,70	2,85	2,92	2,62	2,55

* primo-vacinados

TABELA XXXVII - Médias dos títulos de anticorpos contra o vírus "O" de febre aftosa, antes da vacinação e aos 7, 14, 21, 28, 60 e 90 dias pós-vacinação em bovinos de um rebanho HPB, primo-vacinados e revacinados, positivos à IDCA em placa para LEB, Minas Gerais. 1981

Faixa etária (meses/anos)	Nº de bovinos	Dias pós-vacinação						
		0	7	14	21	28	60	90
Títulos de anticorpos (log)								
5 — 6 m	18*	1,22	1,77	2,31	2,64	2,85	2,64	2,49
6 m — 2 a	22	2,55	2,50	2,50	2,67	2,85	2,93	2,52
2 — 4 a	46	2,45	2,56	2,71	2,88	2,98	2,82	2,62
4 — 6 a	51	2,45	2,59	2,72	2,78	2,85	2,68	2,57
> 6 a	59	2,56	2,49	2,70	2,82	2,88	2,63	2,54

* primo-vacinados



FIGURA 5 - Intestino. Nódulos neoplásicos múltiplos ao nível da serosa intestinal. Linfonodos mesentéricos aumentados de volume.



FIGURA 6 - Rim. Formações nodulares neoplásicas múltiplas na superfície.



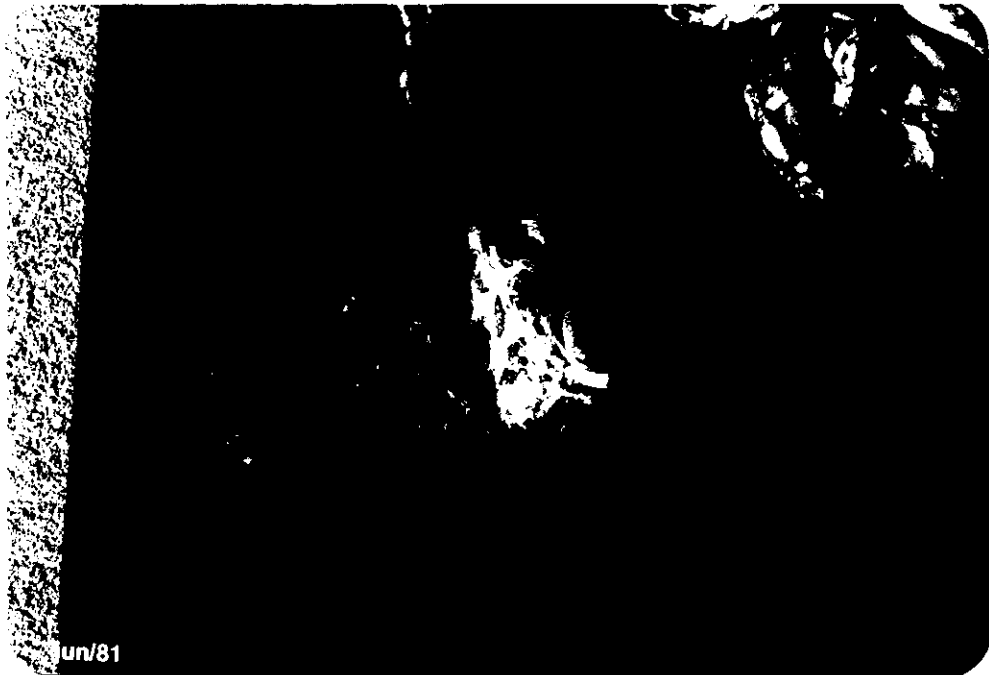


FIGURA 7 - Pulmão. Superfície de corte com massa tumoral sólida, envolvida por tecido conjuntivo.



FIGURA 8 - Útero. Parede espessa com formações nodulares na serosa e no endométrio.



FIGURA 9 - Rim. Linfossarcoma. Córtex renal invadida por células neoplásicas pleomórficas (HE, 100 X).

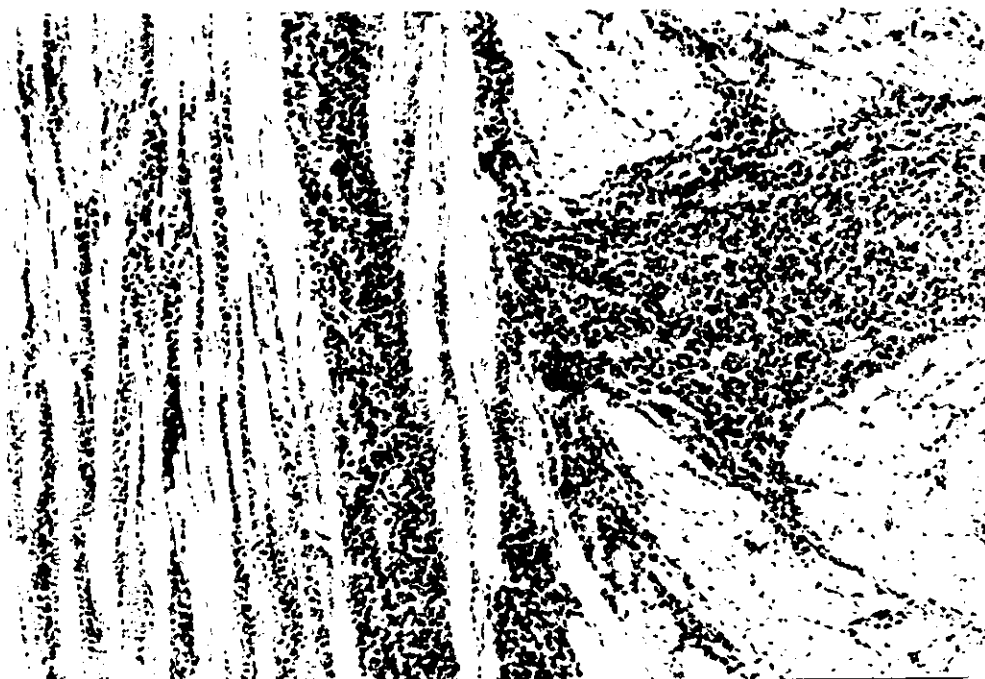


FIGURA 10 - Coração. Linfossarcoma. Miocárdio invadido por células tumorais. Pleomorfismo celular (HE, 100 X).

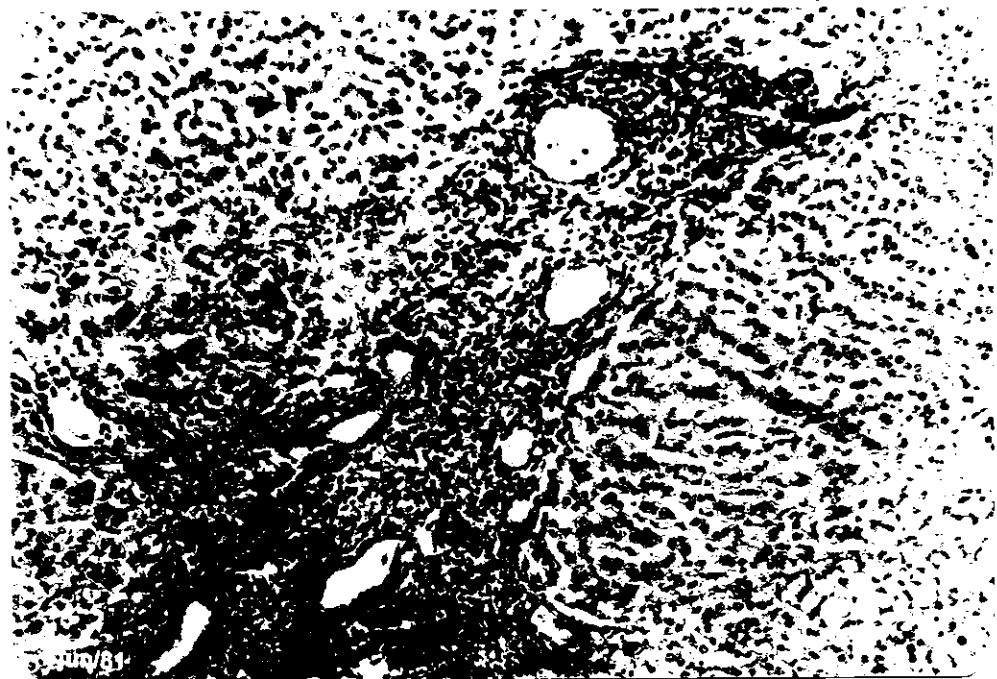


FIGURA 11 - Fígado. Linfossarcoma. Espaço porta invadido por células blastomatosas (HE, 100 X).



FIGURA 12 - Útero. Linfossarcoma. Endométrio invadido por células neoplásicas (HE, 65 X).

5. DISCUSSÃO

Sabe-se que a maior prevalência em rebanhos leiteiros, entre outros fatores, deve-se ao tipo de criação intensiva, o que facilitaria a transmissão. Como as formas clínicas são observadas geralmente, em animais acima de cinco anos, bovinos de corte, neste idade, possivelmente já foram abatidos. Assim, preferiu-se estudar gado leiteiro e, devido à pequena quantidade de antígeno disponível, pesquisou-se em único rebanho, porém de tamanho acima da média para a região. A prevalência encontrada, 70,86%, foi maior do que as apresentadas por BAUMGARTENER et alii (1975) e HOUSE et alii (1977). Tal discrepância poderia ser explicada pelo fato de os autores citados terem estudado vários rebanhos, bastante diferenciados, através de ampla amostragem, onde se incluíam rebanhos livres ou não da enfermidade ou com histórico clínico recente.

Os resultados diferem, também, dos obtidos por OLSON et alii (1973) que encontraram prevalência máxima de 42,00%, aproximando-se, entretanto, dos obtidos por TABEL et alii (1976) e estando mais concordantes com a percentagem de 52,00% encontrada por HOUSE et alii (1977). Talvez a diferença se deva ao fato dos autores não precisarem o

prazo mínimo da ocorrência de casos clínicos com relação à pesquisa efetuada. No presente estudo, manifestações clínicas ocorreram desde sete meses antes do início da pesquisa.

O rebanho estudado possuía, seguramente, a enfermidade. Mortes a ela atribuídas ocorreram durante o período da pesquisa. Dos quatro animais que manifestaram a forma clínica, todos eram positivos à IDGA em placa. Somente de dois destes foi possível realizar o diagnóstico hematológico. À necrópsia, encontraram-se alterações características da LEB nos quatro bovinos.

A ocorrência de casos clínicos, durante o período estudado, alcançou 1,73%, discrepando das percentagens maiores assinaladas por MUSCOPLAT et alii (1974), WEILAND & STRAUB (1975) e FERRER (1979). Talvez a diferença se deva ao fato de o prazo da presente observação ter sido de um ano, considerado por nós pequeno, muito embora a literatura consultada não especifique prazos de observação clínica. Devido ao curso tipicamente crônico da enfermidade um período amplo de observação propiciaria maior número de doentes.

Quanto à faixa etária, na qual manifestaram-se as formas clínicas, com evolução para a morte, houve concordância com o observado por MUSCOPLAT et alii (1974); WEILAND & STRAUB (1975) e FERRER (1978), pois todos os animais apresentavam idade superior a cinco anos. Estes animais, de acordo com o tipo de programação estatística da presente pesquisa, não constam na amostragem tabulada. Para efeito de compreensão foram aleatoriamente designados A, B, C e D.

A sintomatologia e lesões observadas, apresentaram grande variação, no animal A a localização tumoral foi predominantemente a nível de útero, causando distocia e impossibilidade da retirada do feto, até mesmo por cesariana (FIG. 12), concordando com casos já relatados por BENDIXEN (1970).

O animal apresentou enfartamento ganglionar generalizado, aborto e intensa exoftalmia bilateral, que aumentou, à medida em que progredia o quadro clínico. Sendo a região orbital o local mais freqüente das infiltrações, as tumorações desenvolvem-se a partir do tecido adiposo retrobulbar, em consequência, há aumento da pressão do globo ocular donde a crescente exoftalmia. Este animal apresentou quadro similar ao descrito por FELDMAN (1930). À necrópsia revelaram-se tumorações generalizadas nos sistemas respiratório, digestivo, circulatório e genito-urinário (FIG. 5, 6, 7, 8, 9 e 11) quadro descrito por muitos autores e, de modo especial, por BENDIXEN (1958) e BENDIXEN (1965).

O animal C, apresentou predominância de tumorações na região cervical esquerda com paraplegia do membro posterior esquerdo, enfartamento ganglionar generalizado, com destaque na cadeia ganglionar da face, o que também vem sendo descrito por BENDIXEN (1958) e BENDIXEN (1970), como achados da LEB.

Ao exame clínico do animal D, não se evidenciou qualquer alteração que levasse ao diagnóstico da LEB. À necrópsia, observaram-se intensas tumorações, principalmente a nível do coração (FIG. 10). BENDIXEN (1965) citou, também, tal ocorrência.

A prevalência de 70,86% do rebanho e as percentagens médias de 86,44% nas faixas etárias de 4 a 6 anos e de 95,12% nos maiores de seis anos, demonstraram o aumento paralelo da infecção e idade (TAB. V). Idênticas observações obtiveram THEILEN et alii (1965); CONNER et alii (1966) e CYPESS et alii (1974), em animais maiores de quatro anos.

A prevalência média encontrada em bovinos maiores de três anos foi de 85,79%, inferior à observada por FERRER et alii (1977). Já as taxas de infecção em bovinos menores de dois anos e maiores de cinco, estão de acordo com os achados de SORENSEN et alii (1961); MARSHAK et alii (1962); REISINGER (1963) e BAUMGARTNER et alii (1975). A

menor prevalência em bovinos, menores de dois anos, seria explicada pela lenta evolução da infecção.

Pelos resultados apresentados na TAB. VI, verifica-se que somente um animal, embora filho de vaca negativa, foi positivo à IDGA, em placa, até 300 dias após o nascimento. Tal fato não deve ser imputado somente à técnica utilizada, que forneceu resultados negativos em outros bezerros, testados pelo mesmo processo. O achado coincide com o de ROMERO et alii (1980) que, com o mesmo método e em condições similares em um animal detectou anticorpos até 360 dias após o nascimento.

Outro fator a considerar-se seria a transmissão pelo leite. Como os bezerros, neste estudo, após mamarem o colostro são alimentados com "pool" de leite provenientes de animais, infectados ou não, a possibilidade de tal transmissão é viável, segundo observações de DUTCHER & LARKIN (1964), RAMPICHINI et alii (1975) e FERRER & PIPER (1978).

Em contraposição, observa-se que bezerros filhos de vacas infectadas, após ingestão do colostro, podem permanecer negativos, fato já citado por FERRER et alii (1976), CHANDER et alii (1978) e que aventaram a possibilidade de até 86,00% de bezerros, filhos de mães infectadas, nascerem sem infecção.

Pelo relatado na literatura consultada, parece que, sem dúvida, a infecção através de colostro, é rara. Talvez os anticorpos maternos adquiridos passivamente sejam responsáveis pela resistência dos bezerros à infecção. Segundo resultados obtidos por MILLER & VAN DER MAATEN (1978) que somente conseguiram induzir a infecção nas primeiras horas de vida, através da administração oral de linfócitos infectados, poder-se-ia supor que após as primeiras 24-36 horas de vida, os linfócitos infectados não passariam através da mucosa intestinal, já que a absorção de macro-moléculas é limitada a este período. Porém, uma presença maciça de linfócitos infectados no colostro ou leite, ou, por

outro lado, condições que afetam a integridade da mucosa, poderiam predispor a tal tipo de transmissão.

No presente estudo, dois animais foram positivos após sete retestes, dos 30 aos 300 dias de idade, podendo-se presumir infecção intra-uterina, segundo observações de ROSENBERGER (1963); STRAUB (1966); GROSS (1970); FERRER et alii (1976); CHANDER et alii (1978) e FERRER (1980), ou através do colostro ou leite, de acordo com os estudos de DUTCHER & LARKIN (1964); RAMPICHINI et alii (1975) e FERRER & PIPER (1978).

Ao início do experimento, a incidência no rebanho era de 63,92%, após quatro retestes, durante um ano, observou-se um aumento de 65,22-66,52% a 68,69-70,86%. Estes aumentos poderiam se dever a fatores difíceis de identificação, dentro do prazo do experimento, suas limitações naturais, como, por exemplo, impossibilidade de inoculações experimentais e os meios de diagnóstico disponíveis, onde não se incluíram isolamento e identificação do vírus.

A diferença entre prevalência inicial e final pode se dever a que alguns dos animais já em período de incubação, tenham manifestado anticorpos precipitantes "a posteriori", conforme observações de ROSENBERGER (1968) MILLER & OLSON (1972); BURROUGHS & CARDINET (1973); MILLER et alii (1976) e KAADEN et alii (1978).

Como os animais são criados de maneira intensiva, a transmissão horizontal era facilitada, principalmente, pela ordenha através do contato de secreções e de excreções, como já afirmaram BENDIXEN (1960); OLSON & BAUMGARTENER (1975); MUSSGAY & KAADEN (1978) e NIELSEN et alii (1978).

Transmissão através de insetos hematófagos é outro fator a considerar-se. De acordo com HAWKINS et alii (1976) e NIELSEN et alii (1978), ela pode ocorrer e, na presente pesquisa, muito possivelmente aconteceu.

Outro fator preponderante seria a transmissão

através de agulhas, outros instrumentos perfurantes e intervenções cirúrgicas, de acordo com observações de ROSENBERGER (1963); VAN DER MAATEN & MILLER (1978) e MAMMERICKX et alii (1978). Segundo TYLER (1978), 2.500 linfócitos infectados podem transmitir a infecção. Se considerarmos que a contagem linfocitária normal está em torno de 6.000 linfócitos por mm^3 , isto representaria um pequeno volume de sangue. Porém, segundo se sabe, todo o material, principalmente agulhas, era constantemente desinfectado ou de uso individual.

Para verificação da associação (ou independência) entre IDGA em placa e chaves linfocitárias de Bendi-xen e CEE, utilizou-se a prova exata de Fisher. Quando se pretendeu utilizar o teste do Qui-quadrado (X^2) os valores calculados, nas diferentes idades e em ambas as chaves, apresentavam valores menores que cinco em, aproximadamente, 70% dos casos. Como o nível de significância da prova exata de Fisher e de 5% somente verificou-se associação entre IDGA e hematologia nas faixas etárias de 0-1 e 2-3 anos; tal associação talvez possa ser imputada a amostragem não probabilística.

O trabalho de CRESPEAU (1977) fala do valor relativo do diagnóstico da LEB, com base em achados de leucograma. Destaca ser a linfocitose persistente - resultados de vários exames - método de baixa especificidade e sensibilidade pelo que, logicamente, deve ser substituída por outros.

Em plano individual, a LP carece de especificidade na medida em que os animais podem, jamais, ter apresentado a LP durante meses ou anos que precederam a enfermidade. Pode haver LP não relacionada à infecção pelo vírus da LEB, mas a outras enfermidades infecciosas de origem bacteriana, viral, micótica ou parasitária. Além disto a linfocitose não pode ser tomada no plano individual como critério específico e constante da infecção. A precocidade

real desta resposta é desconhecida e um bovino infectado pode não desenvolvê-la ou fazê-lo meses após a infecção.

Os valores hematológicos individuais desta pesquisa, comparados à IDGA, em placa, concordam com o enunciado acima, pois, ao analisar-se a média do número de linfócitos por mm^3 , individualmente, notam-se extremas variações ocorrentes em diferentes faixas etárias. Por exemplo, na faixa de 0-1 ano (TAB. VIII) encontrou-se 13.004 linfócitos por mm^3 em animal negativo e 5.740 em positivo à IDGA. O mesmo ocorreu em outras faixas estudadas, observando-se que bovinos apresentavam frequentes e expressivas contagens, afirmação assinalada por muitos e já em tempos bem remotos por KNUT & VOLKMAN (1916).

A falta de sensibilidade seria, pois, devida em parte, às flutuações que sofrem a LP e a não precocidade desta. Em síntese, o método carece de fidelidade e não poderia servir de base de diagnóstico definitivo a programas de controle e/ou erradicação, como já afirmaram FLENSBURG & STREYFFERT (1977).

Ao observar-se o número de bovinos positivos e negativos frente às chaves de Bendixen e da CEE, constatou-se que na primeira detectaram-se 94 positivos e 101 negativos e, na segunda, os positivos foram 67 e os negativos 113. Ao comparar-se estes resultados usando-se seleção prévia através da IDGA, observaram-se que 83 foram positivos e 53 negativos à chave de Bendixen. Quanto à chave da CEE, 58 foram positivos e 53 negativos. Pelas diferenças observadas, através dos dois critérios, verifica-se que quando selecionam-se com IDGA, os números de positivos e, principalmente, os negativos, diminuem significativamente. Conclui-se que a sensibilidade da hematologia é muito inferior à especificidade, não sendo tal critério, um método seguro à detecção da infecção (FRENZEL, 1976; GUILLEMAN et alii, 1978; HOFIREK et alii, 1978; RUTILI et alii, 1978) e, para FERRER (1980) os leucogramas, agru-

pados em chaves, falhariam em 60% dos casos de detecção de bovinos realmente infectados.

Ao analisar-se a IDGA com as chaves de Bendixen e CEE, observou-se que na primeira chave, o número de falsos negativos eram 48 e os de falsos positivos 11 e os de suspeitos 35. Já na segunda chave, os falsos negativos foram 58, os falsos positivos 9 e os suspeitos, 40. Se considerarmos os 230 animais diagnosticados como positivos ou negativos à técnica sorológica, observa-se que a discrepância entre os métodos é significativa.

Em termos de controle e/ou erradicação, os falsos negativos seriam extremamente prejudiciais. Pela alta difusão da LEB, tal fato é extremamente nocivo, pois, seriam eles fonte constante de infecção não detectável. Quanto aos falsos positivos não representariam grande risco, além de serem em percentagem bem menor.

Outro fato a ressaltar-se seria a categoria de suspeitos. Tal classificação implica em novos retestes, obrigando sua permanência no rebanho.

Pela IDGA obtêm-se resultados positivos ou negativos, a curto prazo. Já na hematologia, para um diagnóstico definitivo, os exames devem ser realizados em intervalos não inferiores a três meses para confirmação da LP.

Quando se observam os resultados da IDGA, em placa, comparados às chaves linfocitárias, excluindo-se as categorias de suspeitos, falsos negativos e falsos positivos, observa-se, que em 230 diagnosticados à técnica sorológica, somente 136 o foram à chave de Bendixen e 113 à chave da CEE. Sem dúvida, a rapidez, a sensibilidade e a especificidade daquela técnica são superiores à hematológica, segundo o observado por DEVARE et alii (1978).

Nas manifestações clínicas observadas, somente conseguiu-se realizar o diagnóstico hematológico de dois bovinos. Estes não apresentaram LP, segundo as duas chaves estudadas, discordando, em parte, de GÖETZE (1956):

THEILEN et alii (1967); ROSENBERGER (1968); WEINHOLD et STRAUB (1968) e concordando com MARSHAK & ABT (1968). Estes casos, importantes dentro de programas de erradicação, falam em favor da necessidade de outros métodos de diagnóstico para LEB, além das chaves hematológicas.

Por não produzirmos antígeno em escala comercial e, atualmente, pela dificuldade imposta à sua importação, os diagnósticos estão sendo realizados através da hematologia, apesar de suas relativas sensibilidade e especificidade. Como os valores utilizados são obtidos de realidades diferentes da nossa, tentou-se elaborar chave linfocitária a partir da amostra estudada.

Pela quantidade disponível de antígeno ter impossibilitado amostragem probabilística, a chave proposta somente abrange faixa etária até seis anos. Como o grupo dos bovinos maiores de seis anos possuía 39 animais positivos e dois negativos impossibilitou, em tal categoria, uma proposição linfocitária.

Ao comparar-se a chave proposta com a de Bendixen ou CEE verificam-se extremas variações. Na faixa de 0-1, obtiveram-se, como contagem linfocitária normal, valores menores de 6.986; já a chave de Bendixen, em tal categoria, apresenta valores menores de 10.000 e a de CEE menor de 11.000. Tal resultado indica que, neste experimento e em nossas condições, bovinos com aproximadamente 7.000 linfócitos poderiam ser considerados normais. Na mesma faixa, encontram-se como suspeitos, bovinos com 6.986 a 11.115 linfócitos. A chave de Bendixen apresenta valores de 9 a 11.000 e a da CEE de 11 a 13.000. Nesta categoria, a classificação proposta foi mais rígida, comparada à chave de Bendixen e, mais ainda, à chave da CEE. Neste intervalo, poder-se-ia triar maior número de animais. Já na categoria de alta linfocitose, encontram-se como pertencentes a ela, bovinos com contagem acima de 12.000 e da CEE de 13.000, classificação que se aproxima da de Bendixen. A diferença

com a chave da CEE é de 2.000 linfócitos. Estas diferenças podem ser devidas a classificação proposta ter como base a IDGA, o que não ocorreu com as outras chaves. Além disto, diferenças regionais como clima, solo, adaptação aos trópicos, alimentação, entre outros inúmeros fatores, poderiam estar interferindo.

Trabalhou-se somente com um rebanho leiteiro, HPB, composto em sua minoria de animais importados. Além disto, quando se consultou a literatura, os autores não especificaram como foram elaboradas tais chaves, a partir de que amostragem e para que raças.

Através da análise das diferentes faixas etárias e categorias de classificação, observa-se que as diferenças continuam significativas. Na faixa de 1-2 anos, enquanto a chave de Bendixen classifica, como normal, bovino com contagem linfocitária menor de 9.000 e da CEE menor de 10.000, encontra-se na amostra estudada, o valor de 6.309. As diferenças seriam de aproximadamente 3.000 e 4.000 linfócitos. Se considerarmos a amostra estudada, a partir da chave proposta, o número de falsos negativos seria significativamente menor. Quanto aos suspeitos, a chave proposta apresenta valores entre 6.309 e 10.275, e a de Bendixen 9.000 a 10.000, a da CEE 10.000 a 12.000. Novamente a classificação proposta aproxima-se mais da chave de Bendixen. Nesta categoria, a sobreposição foi mais extensa o que constitui evidente desvantagem frente a ambas as chaves citadas.

As diferenças continuam em todas as faixas etárias, observando-se discordância a partir de dois anos. Os valores de linfocitose da proposição são maiores que a chave de Bendixen. Na da CEE a diferença na faixa de 2-3 anos é pequena; entretanto, nos outros, a diferença continua significativa.

Considerando-se que em 460 leucogramas, somente 36 (6,92%) bovinos apresentaram atipias linfocitárias: pode-se

admitir que sua frequência seja baixa. Ressalta-se que os bovinos que mostraram estas atípicas linfocitárias foram sempre os mesmos nos dois exames intervalados de três meses. As células em mitose apresentaram menor frequência e os linfoblastos e os prolinfócitos a maior. Tais resultados discordam de KNUTH & DU TOIT (1917) mas não com os de WEBER (1963), MARSHAK (1968) e CRESPEAU (1977).

RESSANG et alii (1978a), mesmo encontrando alta correlação entre a imunofluorescência direta (IFD), FC e IDGA com o antígeno glicoproteico, observaram discrepâncias em 2,5% dos soros examinados. Sendo esta verificada naqueles soros com baixa concentração de anticorpos, os autores recomendaram a combinação da IFD e IDGA em tais casos, principalmente em animais jovens e com possível infecção recente. No experimento, para minimizar possíveis erros de diagnóstico, retestou-se os bezerros sete vezes e os bovinos adultos, quatro. Não tivemos condições de realizar outras formas de diagnóstico, principalmente a IFD, que requer cultivo celular. Além disto, no Brasil, em nenhum laboratório, se utiliza a IFD para diagnóstico da LEB, pois tal implicaria em possuir-se cultivo celular e o vírus.

Uma vez que o vírus da LEB produz dois tipos de antígenos que induzem a formação de anticorpos específicos (MILLER et alii, 1972; ONUMA et alii, 1975), utilizou-se o antígeno glicoproteico por ser o único disponível e um método válido à detecção da infecção, segundo MILLER et alii (1976) e RUTILI et alii (1976).

De acordo com SCHMIDT et alii (1975); OLSON & BAUMGARTNER (1975), FERRER et alii (1975), a IDGA é método adequado à detecção deste tipo de anticorpos, pela alta correlação entre estes e a infecção. Quando comparou-se esta técnica com métodos de alta sensibilidade e especificidade, como o ELISA, verificou-se que a discrepância entre ambas as técnicas foi de 0,5% correspondente a 12 amostras conforme o relatado por RESSANG et alii (1978b). Em outros

estudos realizados com antígeno glicoproteico do laboratório PITMANN-MOORE, da mesma procedência do utilizado neste trabalho, foram relatadas discrepâncias. Porém, HOUSE & HOUSE (1976) argumentaram que a fixação de complemento (FC) e a IDGA com antígeno glicoproteico teriam a mesma sensibilidade.

KAADEN et alii (1978) testando 76 animais, no período de 1974 a 1978, num total de 1672 amostras, não encontraram nenhum falso positivo à IDGA com antígeno GP e P. No presente estudo, não se realizou comparação com outro método sorológico.

BAUSE et alii (1978) afirmaram que a IDGA é recomendada como teste diagnóstico oficial do programa de erradicação na Alemanha e TRAININ et alii (19878), informaram que o método de escolha utilizado em laboratórios na CEE é a IDGA, com antígeno GP, embora ressaltando que apesar da comparação entre IDGA com antígeno GP, P e IFD, mostrar a superioridade da sensibilidade do primeiro, para casos individuais, necessitar-se de teste adicional.

A maior ressalva, quanto à IDGA, é feita por FERRER (1980) que postulou sobre a qualidade de produção do antígeno e possíveis contaminações nas células, como também a dificuldade do diagnóstico definitivo em animais até oito meses e que ingeriram colostro.

Durante o estudo, testou-se cinco animais no intervalo de 30 a 45 dias antes do parto; estes mantiveram suas reações positivas em retestes um mês pós-parto. Isto discorda, em parte, com BAUSE et alii (1978) e BAUMGARTENER (1977), cujos resultados se basearam em titulagens periódicas. Nossas condições de trabalho, ligadas à escassez de antígeno, não permitiram a titulação dos soros obtidos "antem et post-partum".

Até o momento, na literatura consultada, somente um trabalho (FERREIRA et alii, 1980) apresenta comparação entre IDGA em placa e em lâmina. Os autores apresentaram um resultado global das diferenças entre as duas téc-

nicas, não especificando em que faixa etária se detectou o maior número de falsos negativos.

Segundo nossos resultados (TAB. XXXV) observou-se que o maior número de falsos negativos estão na faixa etária de 0-1 ano, sendo a diferença entre as duas provas devidas ao encontro de mais oito animais (23,53%) falsos negativos à prova executada em lâmina. À medida que aumenta a idade a diferença entre as duas provas diminui, esta é menor em bovinos maiores de seis anos.

Embora havendo associação entre ambas as técnicas ($P < 0,05$), a IDGA em lâmina seria recomendável a triagem, em rebanhos ou áreas, para diagnóstico de situação inicial ou global. Para casos individuais, em controles de propriedades ou para importação e exportação, a IDGA em placa seria recomendável para animais até quatro anos de idade. Como, até o momento, não se produz antígeno no Brasil em escala comercial, a IDGA em lâmina seria mais econômica.

Enfermidades, principalmente infecciosas, podem ter influência variável sobre a formação da imunidade. Segundo MULLER et alii (1968) em medicina humana, leucemias, agudas ou crônicas, sem etiologia totalmente definida, interferem na formação de anticorpos.

Analogamente SALAMAN & WEDDERBUN (1966) e BORELA (1969) verificaram que em camundongos e aves, diversos vírus de leucose, desenvolvem uma ação imunossupressiva, vírus estes diferentes do responsável pela LEB bovina.

No nosso estudo, não foram observadas diferenças, quanto a produção de anticorpos anti-febre aftosa, entre grupos primovacinados e revacinados, com e sem infecção. Todos os animais, de ambos os grupos, estavam protegidos ao final de 90 dias segundo critérios de ASTUDILLO (1980). No grupo primovacinado, entre 0-28 dias, o aumento do título foi mais retardado em relação ao não infectado. Entretanto, não houve diferença estatística significativa

($P > 0,05$) entre estes, em nenhum período. Os resultados obtidos permitem concluir que não há imunossupressão, pelo menos quanto à produção de anticorpos anti-febre aftosa em bovinos, primo e revacinados com infecção pelo vírus da LEB estando em concordância com MAMMERICKX & ANTOINE (1970) e SEILS et alii (1970).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- há aumento paralelo entre infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) e idade dos bovinos;
- bezerros que ingeriram colostro, filhos de vacas negativas à técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), em placa, para LEB, podem apresentar reação positiva à mesma técnica, devido a concentração de anticorpos;
- o inverso pode acontecer, isto é, bezerros que ingeriram colostro, filhos de vacas positivas à IDGA, em placa, para LEB, podem apresentar reação negativa;
- bezerros que ingeriram colostro, filhos de vacas positivas à técnica acima citada, apresentaram anticorpos precipitantes que desapareceram entre 90 e 180 dias;
- prevalência da infecção apresentou tendência crescente no período estudado;
- procurando encontrar método capaz de indicar possíveis portadores da infecção, em rebanhos ou áreas, com base em nossas condições de ambiente e na amostragem estudada, propôs-se chave linfocitária para classificação dos suscetíveis;

- houve associação significativa entre as chaves linfocitárias de Bendixen e da Comunidade Econômica Européia (CEE) e IDGA em placa nas faixas etárias de 0-1 e 2-3 anos;
- a sensibilidade da chave linfocitária de Bendixen foi superior a da CEE;
- a especificidade da chave linfocitária da CEE foi superior a de Bendixen;
- as chaves linfocitárias de Bendixen e CEE apresentaram sensibilidade e especificidade inferiores a IDGA em placa;
- a presença de linfócitos morfológicamente anormais na LEB é baixa;
- a prova de IDGA em placa pode ser substituída pela mesma técnica em lâmina, principalmente em bovinos maiores de quatro anos;
- em condições naturais a LEB não interfere com a produção de anticorpos anti-febre aftosa na primo ou na revacinação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALENCAR FILHO, R.A. Leucograma de bovinos nacionais e estrangeiros com vistas ao estudo da leucose. Biológico, São Paulo, 36(8):181-4, 1970.
2. ASTUDILLO, V.M. Erros de classificação na discriminação sorológica do estado imunitário contra a febre aftosa em bovinos. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1980. 24p.
3. BAUMGARTENER, L.E., 1977 apud BAUSE, I.; INDERWEISSEN, F.M.; SCHMIDT, F.W. Results of an epidemiological survey of enzootic bovine leukosis in the Lower Saxony and a preliminary communication of an examination into relationship between BLV-antibody development and calving. Ann. Rech. Vet., Paris, 9(4):765-9, 1978.
4. BAUMGARTENER, L.E.; OLSON, C.; MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Survey for antibodies to leukemia (C-type) virus in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 165():249-51, 1975.
5. BAUSE, I.; INDERWIESEN, F.M.; SCHMIDT, F.W. Results of an epidemiological survey of enzootic bovine leukosis in the Northean part of Lower Saxony and a preliminary

- communication of an examination into relationship between BLV-antibody development and calving. Ann. Rech. Vet., Paris, 9(4):765-9, 1978.
6. BENDIXEN, H.J. Bovine lymphosarcoma. Adv. Vet. Sci., New York, 10:129-204, 1965.
 7. BENDIXEN, H.J. Leukosis. In: GIBBONS, H.J. Bovine medicine & surgery. Illinois, American Veterinary Publications, 1970. Cap.13, p.547-60.
 8. BENDIXEN, H.J. Leukosis enzootica bovis, with special regard to diagnosis, epidemiology and eradication. Copenhagen, Royal Veterinary and Agricultural College, 1963. (Thesis, Ph.D.) apud BENDIXEN, H.J. Bovine lymphosarcoma. Adv. Vet. Sci., New York, 10:129-204, 1965.
 9. BENDIXEN, H.J. Undersogelser over kvaegets leukose. 2. Kvaegleukonsens kliniske diagnostik. Nord. Veterinaer-med., Copenhagen, 10() : 275-301, 1958.
 10. BENDIXEN, H.J. Untersuchungen über die Rinderleukose in Dänemark. II. Pathogenese und Enzoziologie der übertragbaren Rinderleukose. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr., Hanover, 67:57-65, 1960.
 11. BORELLA, L.A. The suppressive effect of Rauscher leukemia virus on the secondary antibody response of system cells cultured in cell-impermeable diffusion chambers. J. Immunol., Baltimore, 103() :185-95, 1969
 12. BURROUGHS, A.L. & CARDINET, C.H. A small intranuclear virus recovered from lymphatic tissue of a bovine with malignant lymphoma. Arch. Gesamt. Virusforsch., Heilderberg, 42:67-77, 1975.
 13. CARVALHO, W.F. Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia. 2.ed. Belo Horizonte, Cooperativa Editora de Cultura Médica, 1978. 272p.

14. CHANDER, S.; SAMAGH, B.S.; GREIG, A.S. BLV-antibodies in serial sampling over five years in a bovine leukosis herd. Ann. Rech. Vet., Paris, 9(1):797-802, 1978.
15. CONNER, G.H.; BELLE, J.A.; LANGHAM, R.F.; CRITTENDEN, M. Studies on the epidemiology of bovine leukemia. J. Nat. Cancer Inst., Washington, 36:383-86, 1966.
16. CRESPEAU, F.L. Comparacion entre los metodos sorologicos y hematologicos, utilizados en el diagnostico de la leucosis bovina. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE LEUCOSIS BOVINA, I. Caracas, 1977. Caracas, 1977. p. 43-58.
17. DACORSO FILHO, P.; LANGENEGER, J.; FARIA, J.F.; AGUIAR, A.A. Casos de leucose bovina no Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 8., Belo Horizonte, 1962. Anais. Belo Horizonte, 1962. 304p.
18. DEVARE, S.G.; OROZLAN, S.; STEPHENSON, J.R. Application of radioimmunologic techniques to studies of the epidemiologic involvement of bovine leukemia virus in lymphosarcoma of domestic cattle. Ann. Rech. Vet., Paris, 9(4):689-97, 1978.
19. DUTCHER, R.M.; LARKIN, E.P. Viruslike particles in cow's milk from a herd with a high incidence of lymphosarcoma. J. Nat. Cancer Inst., Washington, 33:1050-64, 1964.
20. FELDMAN, W.H. The so-called lymphoide hyperplasias of animals. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 77(1):294-313, 1950.
21. FERREIRA, M.E.V. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro, (21/22): 17-20, 1976.

22. FERREIRA, M.I.; ROMERO, C.H.; CHERYL, A.R.; SILVA, A.G. Estudo comparativo entre provas de imunodifusão e achados hematológicos, na infecção com o vírus da leucose enzoótica bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., Fortaleza, 1980. Anais. Fortaleza, 1980. p.206.
23. FERRER, J.F. Bovine lymphosarcoma. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., New York, 24:2-65, 1980.
24. FERRER, J.F. In: PROCEEDINGS BOVINE SYMPOSIUM, 1979. College Park, 1979, p.77-92 apud FERRER, J.F. Bovine lymphosarcoma. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., New York, 24:1-68, 1980.
25. FERRER, J.F.; BHATT, D.M.; ABT, D.A.; MARSHAK, R.R.; BALIGA, V.L. Serological diagnosis of infection with the putative bovine leukemia virus. Cornell Vet., Ithaca, 65:527-42, 1975.
26. FERRER, J.F. & PIPER, C.E. An evaluation of the role of milk in the natural transmission of BLV. Ann. Rech. Vet., Paris, 9(4):805-7, 1978.
27. FERRER, J.F.; PIPER, C.E.; ABT, D.A. Diagnosis of bovine leukemia virus infection. Evaluation of serologic and hematologic tests by a direct infectivity detection assay. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 38: 1977-81, 1977.
28. FERRER, J.F.; PIPER, C.E.; ABT, D.A. Natural transmission of the bovine C-type leukemia virus (BLV). Bibl. Haematol., Basel, 36:235-7, 1976.
29. FLENSBURG, J.C.; STREYFFERT, B. The control of bovine leukosis in Denmark. Nord. Veterinarmed., Copenhagen, 29:49-67, 1977.
30. FREEMAN & HALTON, 1952 apud SPIGEL, M.R. Estatística. Rio de Janeiro, Livro Técnico, 1967. 580p.

31. FRENZEL, B.; KAADEN, O.R.; MUSSGAY, M.; WEILAND, F.
Some biochemical and serological properties of a glycoprotein isolated from bovine leukemia virus. In: BOVINE LEUCOSIS VARIOUS METHODS OF MOLECULAR VIROLOGY. Bruxelles, 1976. Bruxelles, A. Burny, 1976. p.119-20.
32. GÖETZE, R. Ueber Ursachen und Bekämpfung der Leukose des Rindes. Monatsch. Veterinarmed., Jena, 11 : 169-73, 1956.
33. GROSS, L. Oncogenic viruses. 2.ed. Oxford Pergamon Press, 1970 apud FERRER, J.F. Bovine lymphosarcoma. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., New York, 24:1-68, 1980.
34. GUILLEMAIN, B.; MANOUN, T.; ASTIER, T.; DUPLAN, J.F.; PARODI, A.L. Early polykaryocytosis inhibition test: Evaluation of its performance in a sero-epidemiological survey of bovine leukemia virus induced antibodies in cattle. Ann. Rech. Vet., Paris, 9(4):709-20, 1978.
35. HAWKINS, J.A.; ADAMS, W.V.; WILSON, B.H. Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 168:63-4, 1976.
36. HOFIREK, B.; JAGOS, P.; POLAK, I.; RADEMACHER, R.; TESAR, A.; VAREJKA, F.; ZAVADA, J. Diagnostics of enzootic leukosis in cattle in Czechoslovakia and the methods of its suppression. Ann. Rech. Vet., Paris, 9(4):739-42, 1978.
37. HOUSE, C.; HOUSE, J.A.; GLOVER, F.L. Antibodies to the glycoprotein antigen of bovine leukemia virus in the cattle population of five states. Cornell Vet., Ithaca, 67:510-22, 1977.
38. HOUSE, J.A. & HOUSE, C. Studies on the bovine leukemia glycoprotein immunodiffusion test. In: BOVINE LEUCOSIS VARIOUS METHODS OF MOLECULAR VIROLOGY. Bruxelles, 1976.

- Bruxellas. A. Burney, 1976. p.237-45.
39. KAADEN, O.R.; NETH, R.; FRENZEL, B. Sequential studies of bovine leukemia virus antibody development in dairy cattle over a four-year period. Ann. Rech. Vet., Paris, 9(4):771-6, 1978.
 40. KNUTH, P. & DU TOIT, P.J. Weitere Untersuchungen über die Lymphozytomatose des Rindes. Ber. Muench. Tieraerztl. Wochenschr., Hamburg, 33:205-8, 1917 apud BENDIXEN, H.J. Bovine lymphosarcoma. Adv. Vet. Sci., New York, 10:129-204, 1965.
 41. KNUTH, P. & VOLKMANN, O. Untersuchungen über die Lymphozymatose des Rindes. Z. Infk. Haust. West Germany, 17:393-467, 1916 apud BENDIXEN, H.J. Bovine Lymphosarcoma. Adv. Vet. Sci., New York, 10:129-204, 1965.
 42. MAMMERICKX, M. & ANTOINE, O. La response immunologique au vaccin antiaphteux des bovines atteints de leucose bovine enzootique. Ann. Med. Vet., Bruxelles, 114(5):139-45, 1970.
 43. MAMMERICKX, M.; CORMANN, A.; BURNY, A.; DEKEGEL, O.; PORTETELLE, D. Erradication of enzootic bovine leukosis based on the detection of the disease by the GP immunodiffusion test. Ann. Rech. Vet., Paris, 9(4):885-94, 1978.
 44. MARSHAK, R.R. Criteria for the determination of the normal and leukotic state in cattle. J. Nat. Cancer Inst., Washington, 41:243-63, 1968.
 45. MARSHAK, R.R. & ABT, D.A. The epidemiology of bovine leukosis. Bibl. Haematol., Basel, 31:166-82, 1968.
 46. MARSHAK, R.R.; CARRIEL, L.L.; LAWRENCE, W.C.; CROSHAW, J.E.; SCHRYVER, H.F.; ALTERA, K.P.; NICHOLS, W.W. Studies on bovine lymphosarcoma. I. Clinical aspects.

- Pathological alterations and herd studies. Cancer Res., Baltimore, 22:202-17, 1962.
47. MILLER, L.D.; MILLER, J.M.; OLSON, C. Inoculation of calves with particles resembling C-type virus from cultures of bovine lymphosarcoma. J. Nat. Cancer Inst., Washington, 48:423-8, 1972.
48. MILLER, J.M.; MILLER, L.D.; OLSON, C.; GILLETE, K. G. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference bovine lymphosarcoma. J. Nat. Cancer Inst., Washington, 43:1297-305, 1969.
49. MILLER, J.M.; OLSON, C. Precipitation antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. J. Nat. Cancer Inst., Washington, 49:1459-62, 1972.
50. MILLER, J.M. & VAN DER MAATEN, M.J. Serologic response of cattle following inoculation with bovine leukemia virus. Bibl. Haemat., Switzerland, 43:187-9, 1976 .
51. MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J.; PHILLIPS, M. Studies of a glycoprotein associated with bovine leukemia virus. In: BOVINE LEUKOSIS: VARIOUS METHODS OF MOLECULAR VIROLOGY. Bruxellas, 1976. Bruxellas A. Burny, 1976. p.69-80.
52. MUCHALUAT, M.A. Leucose bovina em um rebanho do Estado de Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 23:321-8, 1971.
53. MÜLLER, H.E. & MÜLLER, V.V.J. Das quantitative serumproteinspektrum bei Lungenkrankheiten. Dtsch. Med. Wochenschr., Hanover, 93:102-26, 1968.
54. MUSCOPLAT, C.C.; JHONSON, D.W.; POMEROY, K.A.; OLSON, J.M.; LARSON, V.L.; STEVENS, J.B.; SORENSEN, D.U. Lymphocyte surface immunoglobulin: Frequence in normal and lymphocyte cattle. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 35:593-5, 1974.

55. MUSSGAY, M. & KAADEN, O.R. Progress in studies on the etiology and serologic diagnosis of enzootic bovine leukosis. Curr. Top. Mol. Microbiol. Immunol., Heidelberg, 79:43-72, 1978.
56. NIELSEN, S.B.; PIPER, C.E.; FERRER, J.F. Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: Role of blood sucking insects. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 39(7):1089-92, 1978.
57. OLSON, C.; HOSS, H.E.; MILLER, J.M.; BAUMGARTENER, L.E. Evidence of bovine C-type (leukemia) virus in dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 163 : 355-7, 1973.
58. OLSON, C.; BAUMGARTENER, L.E. Pathology of lymphosarcoma in sheep induced with bovine leukemia virus. Cancer Res., Baltimore, 36:2365-73, 1976.
59. ONUMA, M.; OLSON, C.; BAUMGARTENER, L.E.; PEARSON, L. D. An ether-sensitive antigen associated with bovine leukemia virus infection. J. Nat. Cancer Inst., Washington, 55:1155-8, 1975.
60. PITMAN-MOORE, Inc., Washington Crossing. Bovine leukemia glycoprotein immunodiffusion antigen, ovine cell line origin. Reagent serum and references serums, bovine origin. Leukassay-B. Washington Crossing, 1976, 4p.
61. RAMPICHINI, L.; PORTUGAL, C.F.L.; SEVERINI, M.; RUTILLI, D. Leucosi enzootica dei bovini e studio di particelle di tipo "C" in una bovina adulta, con leucemia linfatica acuta e in bovine dello stesso allevamento con linfocitosi persistente. Tumori, Milan, 61:261-70, 1975.
62. REISSINGER, R.C. Epizootiology of spontaneous cancer in cattle with particular reference to malignant lymphoma. Ann. N.Y. Acad. Sci., New York, 108:855-71, 1963.

63. RESSANG, A.A.; GIELKENS, A.L.J.; QUAK, S.; MASTENBROEK, N.; TUPPERT, C.; CASTRO, A. Studies on bovine leukosis. VI. Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine leukosis virus. Ann. Rech. Vet., Paris, 9(4):663-6, 1978b.
64. RESSANG, A.A.; MASTEBROEK, N.; QUAK, J. Enzootic bovine leukemia. Bull. Off. Epizoot., Paris, 85:1-10 1976.
65. RESSANG, A.A.; MASTEBROEK, N.; QUAK, J. Studies on bovine leukosis. V. A comparative study on the practical value of the agar gel immunodiffusion test, the indirect fluorescent antibody technique and the micro complement fixation of antibodies to bovine leukosis virus. Tijdschr. Diergeneesk., Utrecht, 103:758-62, 1978a.
66. ROMERO, H.; CHERYL, A.R.; ARAÚJO, A.S.; SILVA, A.G. Transmissão natural do vírus da leucose enzoótica bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., Fortaleza, 1980. Anais. Fortaleza, 1980. p. 203.
67. ROSENBERGER, G. Successful experimental transmission of bovine leukosis. Bibl. Haemat., Basel, 31:136-43, 1968.
68. ROSENBERGER, G. Twelve years of bovine leukosis research at Hanover. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., Hanover, 70:410-17, 1963.
69. RUTILI, D.; SEVERINI, M.; RAMPICHINI, L.; TITOLI, F. Epidemiologic study on enzootic bovine leukemia in Italy. Ann. Rech. Vet., Paris, 9(4):761-4, 1978 .
70. RUTILI, D.; SEVERINI, M.; RAMPICHINI, L.; TITOLI, F. Hematological, serological and electron-microscopical diagnosis of bovine leukemia. I. Preliminary investigation in some herds of Umbria. In: BOVINE

LEUCOSIS: VARIOUS METHODS OF MOLECULAR VIROLOGY,
Bruxellas. A. Burney, 1976. p.171-8.

71. SALAMAN, M.H. & WEDDERBUN, N. Immunology. Oxford, 10: 445, 1966.
72. SANTOS, J.A.; PINHEIRO, P.V.; SILVA, L.J. Linfossar - coma com lesões da língua e das câmaras cardíacas em bovinos. An. Esc. Flum. Med. Vet., Niterói, 2:1-8. 1959.
73. SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. Veterinary hematology. 3.ed., Philadelphia, Lea & Fabbiger, 1975. 407p.
74. SCHMIDT, F.W.; LIMA, G.E.; MITSCHERLICH, E.; VON MILE ZEWSKI, K.E.; LEMBKE, A. Versuche zur Züchtung lines agents der Rinderleukose in leukozyten-kulturen von rinde. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B, Hamburg, 22:673-86, 1975.
75. SCHULZE, P.; WITTMANN, W.; GRALHEER, H. Acta Virol. , Prague, 10:467-70, 1966 apud REISSINGER, R.C. Epizootiology of spontaneous cancer in cattle with particular reference to malignant lymphoma. Ann.N.Y. Acad. Sci., New York, 108:855-71, 1963.
76. SEILS, H.; WITTMANN, W.; WEYHE, D. Beiträge zur Diagnose und Bekämpfung der enzootischen Rinder leukose. 4- Vergleichende Untersuchungen über die Antikörperproduktion nach der Vakzinierung gegen Maul-und Klauenseuche mit riemser Maul-und Klauen- senche-Konzentratvakzine bei klinisch gesunden Rindern und Rindern im Stadium der Präleukose. Arch. Exp. Veterinaermed., Stuttgart, 25:581-6, 1970.
77. SIEDAMGROTEKY, O. Ueber Leukämie bei den Haustieren. Pflugs Vorträge für Tierärzte, Germany, 10:393-401 , 1878 apud BENDIXEN, H.J. Bovine lymphosarcoma. Adv. Vet. Sci., New York, 10:129-201, 1965.

78. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Statistical methods . 6.ed., Ames, The Iowa State University Press, 1967. 580p.
79. SORENSEN, D.K.; ANDERSON, R.K.; PERMAN, V.; SAUTTER, J.H. In: WORLD HEALTH ORGAN CONF. COMP. STUDIES LEUKEMIAS. Philadelphia, 1961 apud FREEDLAND, R.A.; THEIS, J.H.; CORNELIUS, C.E. Blood enzymes in bovine lymphosarcoma. Ann. N.Y. Acad. Sci., New York, 108 (3):1313-30, 1963.
80. STRAUB, O.C. Preliminary results in the study of vertical transmission of bovine leukemia. Comparative Leukemia Research. Oxford, Pergamon Press, 1966. p. 239-43.
81. TABEL, N.; CHANDER, S.; VAN DER MAATEN, M.J.; MILLER, J.M. Bovine leukosis. Epidemiological study of bovine C-type virus by the use of the complement fixation test. Can. J. Comp. Med., Ottawa, 40:351-4, 1976.
82. THEILEN, G.H.; APPLEMAN, R.D.; WIXON, H.G. Epizootiology of bovine lymphosarcoma in California cattle. Ann. N.Y. Acad. Sci., New York, 108:1203-13, 1963.
83. THEILEN, G.D.; DUNGWORTH, D.L.; HARROLD, J.B.; STRAUB, O.C. Bovine lymphosarcoma transmission studies. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 28:373-97, 1967.
84. THORNER, R.M. & REMEIN, Q.R. Principles and procedures in the evaluation of screening for diseases. Washington, United States Government Printing Office, 1961. 24p.
85. TRAININ, Z.; MEIROM, R.; GLUCKMANN, A. Comparison between the immunodiffusion and the immunofluorescence tests in the diagnosis of bovine leukemia virus (B. L.V.). Ann. Rech. Vét., Paris, 9(4):659-62, 1978 .
86. TYLER, L. Enzootic bovine leukosis. Vet. Rec., London, 103(9):194-8, 1978.

87. VAN DER MAATEN, M.J. & MILLER, J.M. Susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection by various routes of exposure. In: ADVANCES IN COMPARATIVE LEUKEMIA RESEARCH, 1977. New York, Hilgers/Yohn, New York, 1978. p.29-32.
88. VAN DER MAATEN, M.J.; MILLER, J.M.; BOOTHE, A.D. Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle with lymphosarcoma. J. Nat. Cancer Inst., Washington, 52:491-8, 1974.
89. WEBER, W.T. Hematologic aspects of bovine lymphosarcoma. Ann. N.Y. Acad. Sci., New York, 108(3):1270-83, 1963
90. WEILAND, F.; STRAUB, O.C. Frequency of surface immunoglobulin bearing blood lymphocytes in cattle affected with bovine leukosis. Res. Vet. Sci., England, 19:100-2, 1975.
91. WEINHOLD, E. & STRAUB, O. Transmission of bovine leucosis by serum, blood, bone-marrow and leucocytes. Bibl. Haematol., Basel, 31:149-53, 1968.