

Programa de pós-graduação em Ciência Animal
Escola de Veterinária
Universidade Federal de Minas Gerais

Cláudia Fideles Resende

**PADRONIZAÇÃO DE ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DA
LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA**

Belo Horizonte – MG
2017

Cláudia Fideles Resende

**PADRONIZAÇÃO DE ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DA
LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA**

Trabalho de conclusão apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Co-orientador: Dr. Romulo Cerqueira Leite

**Belo Horizonte – MG
2017**

R433p Resende, Cláudia Fideles, 1991-
Padronização de ELISA indireto para diagnóstico da leucose enzoótica bovina / Cláudia Fideles Resende. – 2017.
35 p. : il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Co-orientador: Romulo Cerqueira Leite
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Leucose bovina – Teses. 3. Vírus da leucose bovina – Teses. 4. Teste imunoenzimático – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Leite, Romulo Cerqueira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.


CDD – 636.208 96

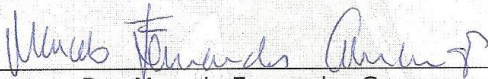
FOLHA DE APROVAÇÃO

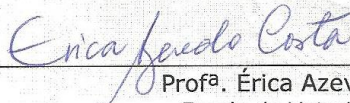
CLÁUDIA FIDELES RESENDE

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

Aprovada em 03 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Presidente - Orientador


Dr. Marcelo Fernandes Camargos
Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA


Profª. Érica Azevedo Costa
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus orientadores, prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis e prof. Romulo Cerqueira Leite pela grande oportunidade e por todos os ensinamentos teórico-práticos que tanto contribuíram para minha formação. Sou muito grata também pela paciência, confiança, “brincadeiras”, conselhos e ao grande apoio e incentivo que foram essenciais, especialmente na etapa final deste trabalho.

Ao Cairo Henrique Sousa de Oliveira, por ter me recebido no laboratório e me orientado desde a época da graduação. Obrigada pelos ensinamentos técnicos, profissionalismo, comprometimento, atenção e amizade.

Ao prof. Elias Jorge Facury Filho, por ter cedido as amostras utilizadas nos experimentos e a todos os alunos envolvidos nas coletas, especialmente a Júlia Gomes de Carvalho.

À Grazielle Cossenzo pela grande ajuda durante todo o mestrado, principalmente nas etapas de cultivo celular e produção de antígeno, e à Agda Leite pela produção de insumos necessários para o cultivo de células e também por não ter brigado comigo todas as vezes que pedi reagentes fora da data.

Agradeço imensamente à família RetroLab (também conhecida como família *Retrolabiridae*): Telissa, Raphael, Renata, Bárbara, Emília, Juliana, Bruna, Mariana e Rebeca. E aos egressos: Cairo, Fernanda, Camila, João Helder, Paula, André, Ana Paula, Grazielle e Agda. Muito obrigada pela grande ajuda nos experimentos, convivência, aprendizado, brigas, surtos, apoio, companheirismo e amizade. Sempre terei muito carinho por todos vocês, mesmo aqueles que hoje já não estão mais tão próximos.

Aos meus pais, Cláudio e Eleir, meus exemplos de vida, pela dedicação incondicional, educação, moral, ética e todo o apoio durante o mestrado e em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos, Luciana e Eduardo, pela lealdade e por sempre torcerem pelo meu sucesso, juntamente aos meus queridos cunhados Fernando e Nessa. Aos meus avós, tios e primos por todo o carinho e torcida.

Aos meus grandes e queridos amigos Marina, Bruno, Bianca, Fernanda e Bonde Mamauê. A vida não teria tanta graça sem vocês! Obrigada pela lealdade e por fazerem parte da minha caminhada e das minhas melhores lembranças. Agradecimento especial à Marina e ao Dynk pela ajuda com a dissertação.

Ao Gustavo Barony, que se tornou um verdadeiro amigo, e também ao Rafael e Nathália. Obrigada pelas gargalhadas no horário de almoço, vocês tornaram meus dias mais leves e divertidos.

Ao INCT-Pecuária, CNPq, Capes e Fapemig pelo apoio financeiro, e à Escola de Veterinária da UFMG pelo programa de pós-graduação em Ciência Animal.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta conquista.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1. Biologia do vírus da leucemia bovina (BLV).....	11
3.2. Patogenia e sinais clínicos	13
3.3. Transmissão.....	14
3.4. Epidemiologia.....	15
3.5. Impacto econômico.....	16
3.6. Diagnóstico laboratorial	16
3.7. ELISA indireto	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Amostras de soro	19
4.2. Cultivo de células/vírus	19
4.3. Produção do antígeno	20
4.4. Quantificação de proteínas totais.....	20
4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	20
4.6. IDGA	21
4.7. ELISA Chekit Leucose-Serum (IDEXX Laboratories, EUA).....	21
4.8. Padronização do ELISA indireto (iELISA).....	21
4.9. Análise estatística	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Antígeno produzido (Ag-BLV)	22
5.2. Padronização do iELISA	22
5.3. Comparação entre iELISA e ELISA Chekit (IDEXX).....	24
5.4. Análise dos resultados obtidos de amostras CC SC	25
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
9. ANEXO	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise comparativa entre os testes iELISA e IDGA.....	24
Tabela 2 - Análise comparativa entre os testes iELISA e ELISA Chekit.....	25
Tabela 3 - Relação dos resultados obtidos em cada teste das amostras de soro de bezerros CC e SC.....	25
Tabela 4 - Relação dos resultados discordantes obtidos das amostras de soro de bezerro CC e SC.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gel de poliacrilamida corado com Coomassie Blue Brilliant R-350.....	22
---	----

Figura 2 - Representação da distribuição dos soros por DO em iELISA comparada ao IDGA.....	23
Figura 3 - Curva ROC baseada no resultado das amostras de campo.....	23
Figura 4 - Comparação do resultado das 73 amostras de soros de bezerros testadas por iELISA e IDGA.....	24
Figura 5 - Comparação do resultado das 72 amostras de soros de bezerros testadas por iELISA e ELISA Chekit.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

AP – fosfatase alcalina
ATCC - <i>American Type Culture Collection</i>
BLV – vírus da leucemia bovina
BVDV – vírus da diarreia viral bovina
Cap – estrutura de reconhecimento do ribossomo localizada na extremidade 5' do genoma retroviral
CC – com colostro
CCDA – citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
Cm ² – centímetro quadrado
DNA – ácido desoxirribonucleico
ELISA – ensaio imunoenzimático
EUA – Estados Unidos da América
FLK – <i>fetal lamb kidney</i>
Env – gene viral que codifica as proteínas do envelope
G – força gravitacional exercida durante a centrifugação
G4 – proteína regulatória do BLV
Gag – gene viral que codifica as proteínas do nucleocapsídeo
gp30 – glicoproteína 30
gp51 – glicoproteína 51
H ₂ SO ₄ – ácido sulfúrico
HRP – horseradish peroxidase
HTLV-1 – vírus humano linfotrópico de células T do tipo 1
IDGA – imunodifusão em gel de ágar
IgG2 – imunoglobulina G subclasse 2
IgM – imunoglobulina M

IgY – imunoglobulina Y
IL-2 – interleucina 2
Kb – kilobases
kD – kilodalton
LEB – leucose enzoótica bovina
LP – linfocitose persistente
LTR – regiões longas terminais
M – molar
MEM – meio essencial mínimo Eagle
mL – mililitro
mm - milímetro
mM - milimolar
mRNA – RNA mensageiro
NM – nanômetros
OD – densidade óptica
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
OPD – o-fenilenodiamina
p12 – proteína 12
p15 – proteína 15
p24 – proteína 24
PBMC – células mononucleares de sangue periférico
PBS - tampão salina-fosfatase
PBST – PBS + 0,05% Tween 20
PCR – reação em cadeia da polimerase
PEG 6000 – polietilenoglicol 6000
Pol – gene viral que codifica as enzimas integrase e transcriptase reversa
pH – potencial hidrogeniônico
Pro – gene viral que codifica a enzima protease
R – região de repetição do genoma viral
R3 – proteína regulatória do BLV
Rex – proteína regulatória do BLV
RNA – ácido ribonucleico
ROC – *receiver operating characteristic*
SBL – leucose esporádica bovina
SC – sem colostro
SFB – soro fetal bovino
TA – temperatura ambiente

Tax – proteína regulatória do BLV
Tb1Lu – *Tadarida brasiliensis lung*
TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná
U3 – região única da extremidade 3’
U5 – região única da extremidade 5’
VPN – valor preditivo negativo
VPP – valor preditivo positivo
X – gene viral que codifica proteínas regulatórias
 μL – microlitro

RESUMO

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma doença infecciosa natural dos bovinos causada pelo vírus da leucemia bovina (BLV). Esta doença tem distribuição mundial e a prevalência sorológica é alta nos rebanhos bovinos brasileiros, sendo considerada uma doença de importância econômica. A identificação e isolamento de animais positivos são necessários para controlar a disseminação do vírus e exames sorológicos são utilizados para esse fim. A imunodifusão em gel de ágar (IDGA) foi considerada por muitos anos o teste de eleição. Entretanto, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) têm sido desenvolvidos e quando comparados ao IDGA apresentam sensibilidade mais elevada, leitura mais rápida e objetiva, além de possibilitarem o processamento de um grande número de amostras simultaneamente. A importação de *kits* de ELISA é um processo dispendioso e demorado, por isso a ferramenta mais utilizada no país ainda é o IDGA. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi padronizar um ELISA indireto (iELISA) para diagnóstico da LEB. A linhagem celular Tb1Lu infectada pelo BLV e livre de BVDV foi utilizada para a produção do antígeno. Setenta e três amostras de soro de bezerros coletadas antes e após a colostragem foram classificadas como negativas ou positivas pelo IDGA (referência). Para padronização do iELISA, diferentes concentrações do antígeno, soros controle positivo, negativo e conjugado foram avaliadas. Posteriormente, os resultados foram comparados com aqueles obtidos pelo IDGA e pelo ELISA comercial *Chekit Leucose-Serum* (IDEXX Laboratories, EUA). O protocolo final do teste foi definido nas seguintes condições: 1,0µg de antígeno bruto por poço, soro teste na diluição de 1:25 e conjugado diluído a 1:5000. A sensibilidade e especificidade relativas ao IDGA foram 94,44% e 75,68%, respectivamente, e encontrou-se VPP=79,1% e VPN=93,3%. A concordância entre os testes foi de 84% e o índice Kappa foi 0,699. O iELISA apresentou sensibilidade de 92,6% e especificidade de 87,09% em relação ao ELISA *Chekit*. A concordância entre os testes foi de 90,27% e o índice Kappa 0,801. Nove amostras foram negativas para o IDGA e positivas no iELISA. Quando comparado ao ELISA *Chekit*, o iELISA apresentou maior sensibilidade e classificou como positiva uma amostra com resultado indeterminado pelo teste comercial, demonstrando que o ensaio desenvolvido pode ser utilizado alternativamente ao ELISA *Chekit*. O iELISA desenvolvido constitui-se, portanto, em uma ferramenta diagnóstica complementar ao IDGA para o controle da LEB no Brasil.

Palavras-chave: iELISA, LEB, diagnóstico, controle.

ABSTRACT

Enzootic bovine leukosis (EBL) is a natural infectious bovine disease caused by bovine leukemia virus (BLV). This disease has a worldwide distribution and the serological prevalence is high in the Brazilian cattle herds, with an important economic impact. The identification and isolation of positive animals are necessary to control the spread of the virus and serological tests have been used for this purpose. Agar gel Immunodiffusion (AGID) was considered for many years the test of choice. However, immunoenzymatic assays (ELISA) have been developed and, when compared to the AGID, have higher sensitivity, faster and more objective reading, and also allow the processing of a large number of samples simultaneously. The importing of ELISA kits from other countries is an expensive and time consuming process. Because of this, the most used diagnostic tool in Brazil is still the AGID. Thus, the objective of this study was to standardize an indirect ELISA (iELISA) for diagnosis of EBL. The BLV-infected and BVDV-free Tb1Lu cell line was used for antigen production. Seventy-three serum samples from calves collected before and after colostrum feeding were classified as negative or positive by AGID (reference). For iELISA standardization, different antigen concentrations, positive and negative control sera and conjugates dilutions were evaluated. Subsequently, the results were compared with those obtained by the AGID and by the Chekit Leucose-Serum commercial ELISA (IDEXX Laboratories, USA). The final protocol for the iELISA was defined under the following conditions: 1.0µg of crude antigen per well, serum test at 1:25 dilution and conjugate diluted 1: 5000. The sensitivity and specificity related to the AGID were 94.44% and 75.68%, respectively, and PPV = 79.1% and NPV = 93.3%. The agreement between the tests was 84% and the Kappa index was 0.699. The iELISA showed sensitivity of 92.6% and specificity of 87.09% in comparison to Chekit ELISA. The concordance between the tests was 90.27% and the Kappa index 0.801. Nine samples were negative for AGID and positive for iELISA. When compared to the Chekit ELISA, the iELISA showed higher sensitivity once classified as positive one sample with undetermined result in the commercial test, demonstrating that the assay developed can be used alternatively to the Chekit ELISA. The iELISA developed in this work is, therefore, a diagnostic tool complementary to the AGID for the control of EBL in Brazil.

Key-words: iELISA, EBL, diagnostic, control.

1. INTRODUÇÃO

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma doença infecciosa natural dos bovinos provocada pelo vírus da leucemia bovina (BLV), um retrovírus pertencente ao gênero *Deltaretrovirus*. A doença é caracterizada por um longo período de incubação, sendo que 1-5% dos animais infectados desenvolvem o linfossarcoma, forma clínica fatal da doença, enquanto aproximadamente 30% desenvolvem a linfocitose persistente. Porém, frequentemente apresenta-se de forma inaparente, sendo o animal assintomático uma importante fonte de transmissão.

A infecção por esse vírus resulta em um comprometimento da resposta imune do hospedeiro, tanto ao nível humoral quanto celular. Essa imunossupressão pode ocasionar o surgimento de infecções secundárias, levando ao descarte precoce de animais, antes mesmo da detecção de qualquer sinal clínico. A doença é debilitante em animais que desenvolvem o linfossarcoma, sendo que os sintomas dependem da localização dos tumores e incluem distúrbios digestivos, como timpanismo, inapetência, fraqueza, perda de peso e, por vezes, sinais neurológicos, podendo levar ao óbito em semanas ou meses após o surgimento dos tumores.

O BLV é transmitido predominantemente pela rota horizontal durante procedimentos que envolvem contato com fluidos contaminados, como reutilização de materiais descartáveis ou indevidamente esterilizados, e picada de insetos hematófagos (*Tabanus fuscicostatus*). O BLV é um vírus linfotrópico de células B, mas também pode infectar linfócitos T, monócitos e granulócitos, dessa forma a principal fonte de infecção é o sangue, no entanto também já foi descrita a transmissão pelo leite, colostro, sêmen, saliva e secreção nasal contaminados. O conhecimento dessas vias de transmissão é importante para a realização de estudos de prevenção e controle da doença.

A LEB tem distribuição mundial e a prevalência sorológica é alta nos rebanhos bovinos brasileiros, principalmente leiteiros, provavelmente devido a técnicas de manejo comuns a esse tipo de produção. Essa doença apresenta alta morbidade em rebanhos infectados e pode atingir uma prevalência de 60 a 90%. Já foi descrita a redução das performances de produção de leite em rebanhos infectados com o BLV. Nesses rebanhos a produção de leite é menor e a taxa de descarte é maior, quando comparados a rebanhos livres, ocasionando prejuízos ao produtor.

Dessa forma, a LEB é considerada uma doença de importância econômica em que os principais prejuízos estão relacionados a morte ou descarte prematuro de animais, condenação de carcaças em matadouros, queda na produção de leite, gastos com serviço veterinário e com diagnóstico e tratamento de animais doentes. Adicionalmente, há perdas na exportação para mercados que requerem animais livres da infecção, pois muitos países, especialmente os da União Europeia, têm uma proibição contra a entrada de bovinos infectados com BLV e seus produtos.

A identificação e o isolamento de animais positivos são necessários para controlar a disseminação do vírus, e exames sorológicos devem ser realizados periodicamente. Os testes preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) são a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), baseados, principalmente, na detecção de anticorpos contra as proteínas gp51 e p24, do envelope e capsídeo viral, respectivamente. Além do diagnóstico, testes sorológicos têm outras importantes aplicações em Medicina Veterinária, incluindo pesquisa, vigilância epidemiológica, certificação de áreas livres e estudos de prevalência.

Métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos para detecção da infecção pelo BLV, sendo a soropositividade um dos melhores indicadores dessa infecção, uma vez que os animais infectados montam uma resposta imunológica persistente. O IDGA, geralmente utilizado para as amostras de soro ou plasma individuais, foi considerado por muitos anos o teste de eleição devido a sua alta especificidade, aceitável sensibilidade, baixo custo e por ser de fácil execução.

Entretanto, nos últimos anos, testes de ELISA têm sido desenvolvidos para utilização em amostras de soro e leite. Quando comparados ao IDGA, estes ensaios possuem sensibilidade mais elevada e leitura mais rápida e objetiva, além disso possibilitam o teste de um grande número de amostras simultaneamente.

A ferramenta mais utilizada no Brasil ainda é o IDGA, sendo que o único teste comercial nacional disponível utiliza antígeno produzido a partir do cultivo de células FLK (*fetal lamb kidney*) persistentemente infectadas pelo BLV. No entanto, sabe-se que essa linhagem é suscetível à contaminação pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV), o que pode influenciar negativamente na especificidade do teste, devido a possível ocorrência de reações inespecíficas.

Estudos anteriores já demonstraram que células de morcego são altamente permissivas ao BLV. A linhagem Tb1Lu (*Tadarida brasiliensis lung*) pode atingir elevados níveis de replicação viral após um período de cultivo e, em adição, também são resistentes à infecção pelo BVDV. Assim, essas células apresentam-se como uma boa alternativa para o cultivo de BLV e produção de antígeno para uso em diagnóstico.

2. OBJETIVO

Desenvolver um teste sorológico nacional eficaz, alternativo ao IDGA, para diagnóstico da LEB, para ser utilizado em estratégias de controle e prevenção, além de contribuir em estudos epidemiológicos da doença no Brasil. Assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar um ELISA indireto com antígeno produzido em linhagem celular Tb1Lu infectada com isolado brasileiro do BLV.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biologia do vírus da leucemia bovina (BLV)

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma doença infecto-contagiosa provocada pelo vírus da leucemia bovina (BLV), um retrovírus do gênero *Deltaretrovirus*, intimamente relacionado ao vírus humano linfotrópico de células T do tipo 1 (HTLV-1). A partícula viral mede 80-130nm de diâmetro e consiste basicamente em duas cópias de RNA de fita simples, não complementares, sentido positivo e genoma composto por 8,7kb (Camargos et al., 2004).

O genoma viral contém uma estrutura *cap* na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3'. Próximo a essas extremidades, estão localizadas as sequências R, repetida nas duas extremidades, U5 (única da extremidade 5') e U3 (única da extremidade 3'). Após a transcrição reversa, ocorre duplicação de U5 e U3 e o DNA proviral formado adquire sequências idênticas nas duas extremidades. A região U3 inclui elementos reguladores de transcrição, enquanto o início da região R corresponde ao início da transcrição. As regiões U5 e U3 incluem sítios necessários para a integração do provírus na célula hospedeira (Trainin et al., 1996; Ravazzollo e Costa, 2007; Goff, 2013).

Na região genômica entre as LTRs estão distribuídos genes para proteínas estruturais *gag* (p12, p15, p24) e *env* (gp51 e gp30), do capsídeo e envelope viral, respectivamente; para as enzimas virais *pro* (protease) e *pol* (transcriptase reversa e integrase); e para as proteínas regulatórias codificadas pelo gene X (*tax*, *rex*, G4 e R3).

As proteínas regulatórias *tax* e *rex* contribuem para infecciosidade e regulação da expressão viral do BLV. *Tax* tem a sequência mais conservada do genoma viral e tem sido amplamente estudada, pois há indícios que ela seja responsável pela transformação celular. Atua como transativador da transcrição do provírus e acredita-se exercer um papel significativo sobre diversas funções celulares, tais como transcrição, tradução, crescimento celular, apoptose e resposta imune. *Rex* parece ser mais importante para a expressão de proteínas estruturais, promovendo exportação nuclear e tradução no mRNA viral nas células infectadas. As funções de R3 e G4 não são muito bem descritas, embora G4 pareça exibir potencial oncogênico *in vitro*. Sabe-se que contribuem para manutenção da carga viral e não são essenciais para a infecciosidade *in vivo*, mas a sua deleção interfere na eficiência da replicação viral e potencial patogênico (Arainga et al., 2012; Aida et al., 2013; Barez et al., 2015).

As glicoproteínas do envelope viral desempenham importante função biológica no ciclo de replicação, determinando o tropismo e a especificidade viral. A proteína de superfície gp51 interage com os receptores de membrana (ainda desconhecidos) da célula alvo e induz uma alteração conformacional que inicia o processo de fusão pela proteína transmembrana gp30. Um peptídeo de fusão na extremidade amino-terminal da gp30 é exposto e desestabiliza a membrana da célula alvo, resultando na abertura da bicamada lipídica e liberação da nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira. A gp51 possui os epítomos lineares A, B, D e E, e os conformacionais F, G e H, estes últimos são alvo de anticorpos monoclonais que resultam na neutralização do vírus. (Camargos et al., 2004; Brogniez et al., 2016).

A principal característica dos retrovírus é a presença da enzima transcriptase reversa, fundamental na patogênese viral. Após introdução do nucleocapsídeo no interior da célula, ocorre o desnudamento e exposição do RNA viral, que é transcrito em DNA dupla fita, pela ação da transcriptase reversa. Este DNA dupla fita, chamado DNA proviral ou provirus, é direcionado para núcleo e é integrado permanentemente ao genoma da célula hospedeira pela ação da enzima integrase, que possui atividade endonuclease, necessária para clivar o DNA celular para a integração do provírus. Uma vez integrado ao genoma, o provírus utiliza da maquinaria de transcrição e tradução celular para a síntese de mRNA's destinados à produção das proteínas virais. Os nucleocapsídeos são montados no citoplasma, posteriormente são transportados até a membrana plasmática e saem da célula por brotamento, estes dois processos são impulsionados principalmente pela proteína precursora *gag*. As partículas virais são liberadas sem provocar lise celular e neste momento adquirem o envelope lipoproteico. Já no meio extracelular, as partículas finalizam o processo de maturação por ação de proteases e tornam-se infecciosas (Ravazzollo e Costa, 2007; Goff, 2013).

3.2. Patogenia e sinais clínicos

A leucose bovina é classificada em dois tipos, leucose esporádica bovina (SBL) e LEB, caracterizadas por leucemia de células T e B, respectivamente. A SBL ocorre com muito menos frequência do que a LEB e, embora sua causa seja ainda desconhecida, não está associada à infecção pelo BLV (Aida et al., 2013).

A maioria dos bovinos infectados pelo BLV não apresenta sinais clínicos, com o número de células infectadas variando em torno de 1% ou menos. Aproximadamente 30% desenvolvem a linfocitose persistente (LP), uma proliferação policlonal de linfócitos B em resposta a estimulação constante por antígenos de BLV, como consequência, há uma alteração na proporção entre células B e T. Em apenas uma pequena parcela dos animais acometidos, aproximadamente 5%, observa-se a formação de linfomas, forma clínica fatal da doença (Burny et al., 1988; Camargos et al., 2004).

A doença é debilitante em animais que desenvolvem o linfossarcoma, sendo que os sintomas desenvolvidos são determinados pela localização dos tumores e incluem timpanismo, inapetência, fraqueza, perda de peso e por vezes sinais neurológicos. A enfermidade pode levar

ao óbito em poucas semanas ou meses após o surgimento dos tumores e não é necessariamente precedida pela LP (“Enzootic Bovine Leukosis”, 2012).

Os principais determinantes da patogenicidade dependem principalmente de fatores do hospedeiro e sua interação com o vírus. Essa doença caracteriza-se por um longo período de incubação, variando de 200 dias a sete anos. Curiosamente, em contraste ao que ocorre com o hospedeiro natural do BLV, quase 100% dos ovinos experimentalmente infectados desenvolvem linfoma, além do menor período de incubação (aproximadamente dois anos). Já entre os bovinos os linfomas são encontrados com mais frequência em animais entre quatro e oito anos de idade (Doménech et al., 2000; Leite et al., 2013; Gillet et al., 2016).

Em estudos realizados no Japão por Tsutsui et al. (2016), uma análise da progressão da LEB utilizando modelo matemático determinou um período médio de incubação da doença de 6,5 anos, antes da manifestação clínica dos sintomas. Sabendo que a expectativa de vida do gado leiteiro no Japão é de cinco anos, foi proposto que muitos animais infectados foram abatidos antes da progressão da infecção até o estágio de manifestação clínica, indicando que essa prática, comum em animais de produção, pode diminuir artificialmente a prevalência da doença clínica. Isso pode explicar porque apenas um pequeno número de bovinos desenvolve linfoma, apesar da alta prevalência.

Anticorpos específicos podem ser detectados no soro sanguíneo entre duas e oito semanas após a infecção. Em animais experimentalmente infectados, uma resposta contra gp51 aparece mais cedo e com títulos bem elevados, porém um certo número de bovinos naturalmente infectados desenvolve uma resposta anti-p24 em nível superior (Larsen et al., 2013; Troiano et al., 2013). A imunidade humoral desempenha um importante papel na infecção primária, no entanto, os anticorpos sozinhos não são capazes de prevenir formação de tumores e de eliminar o provírus integrado. A citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (CCDA) contribui para a supressão da replicação do BLV, atrasando a progressão da doença. No entanto, há também um comprometimento da resposta imune do hospedeiro, tanto ao nível humoral quanto celular, incluindo alteração na produção de citocinas, na expressão do receptor de superfície e na capacidade de proliferação celular e apoptose. Esses distúrbios podem influenciar na patogênese, por exemplo, distúrbios na produção de IL-2, que embora estimule a proliferação de linfócitos T, também pode promover a proliferação de células B infectadas pelo BLV (Trainin et al., 1996; Camargos et al., 2004; Frie e Coussens, 2015).

Frie et al., (2016) vacinaram animais com uma vacina multivalente contendo antígenos virais e bacterianos para avaliar se a infecção por BLV influenciaria na resposta imune desenvolvida após o estímulo vacinal. Como resultado, vacas BLV positivas apresentaram respostas atípicas de células B e T e produziram menores títulos de anticorpos IgM e IgG2 em resposta à vacinação, sugerindo que animais infectados desenvolvem respostas anormais frente a estimulação por outros antígenos e provavelmente têm proteção comprometida contra outras doenças infecciosas.

3.3. Transmissão

O BLV infecta preferencialmente linfócitos B, porém linfócitos T, monócitos e granulócitos também podem ser infectados (Schwartz et al., 1994). A viremia é detectável apenas nas duas primeiras semanas após a infecção, depois desse período, a permanência e disseminação do vírus no organismo ocorrem principalmente por mitose das células contendo DNA proviral integrado. Portanto, a principal via de transmissão se dá pela transferência de células infectadas entre os animais, através do contato com fluidos biológicos contaminados (Ravazzollo e Costa, 2007).

A principal fonte de infecção é o sangue e, devido ao grande número de células infectadas, animais com LP são particularmente eficientes na transmissão desse vírus. Foi observado que

apenas 1µL de sangue de bovino com LP foi suficiente para causar infecção em animais suscetíveis após injeção subcutânea, intradérmica, intramuscular ou intravenosa. Transmissão por leite, colostro, sêmen, saliva e secreção nasal contaminados também pode ocorrer (Camargos et al., 2004; Leite et al., 2013; Yuan et al., 2015).

A transmissão do BLV ocorre predominantemente pela rota horizontal durante procedimentos que envolvem contato com fluidos contaminados, principalmente pela reutilização de materiais descartáveis ou indevidamente esterilizados em procedimentos cirúrgicos, vacinação, palpação retal, entre outros. A transferência de células infectadas pela picada de insetos hematófagos (*Tabanus fuscicostatus*) é comum em áreas tropicais e subtropicais com elevada infestação (Leuzzi Junior et al., 2001; Leite et al., 2013).

O contato direto e prolongado entre animais infectados e não infectados, o estresse e a maior manipulação parecem aumentar a taxa de transmissão do vírus. Foi observado que em rebanhos leiteiros a prevalência de infecção por BLV foi maior em bovinos de 24 meses de idade ou mais. É nessa faixa etária que as novilhas normalmente se juntam ao rebanho de ordenha, comprovando a hipótese de que o início do contato físico próximo, práticas de manejo intensivo e aumento da intervenção humana no rebanho são fatores determinantes na transmissão horizontal do vírus (Camargos et al., 2004; Gutiérrez et al., 2011).

A transmissão vertical é menos frequente. Transmissão intrauterina varia entre três e 6% das gestações de vacas soropositivas, com maior risco em bezerros nascidos de vacas com LP ou linfoma. Fêmeas com alta concentração de vírus e baixo título de anticorpos têm maior chance de transmitir a infecção ao feto. A infecção também pode ocorrer pela ingestão de leite e colostro contaminados, porém há controvérsias, uma vez que anticorpos colostrais podem bloquear a infectividade viral e reduzir a possibilidade de transmissão nos primeiros meses de vida, desaparecendo entre seis a sete meses. Sêmen contendo leucócitos infectados pode transmitir o vírus, mas a presença dessas células nesse material só ocorre em decorrência de traumas, inflamação ou coleta inadequada (Leuzzi Junior et al., 2001; Camargos et al., 2004; Leite et al., 2013).

3.4. Epidemiologia

A leucose bovina foi relatada pela primeira vez em 1871 como a presença de nódulos amarelados no baço aumentado em bovinos (Leisering 1871 citado por Aida et al., 2013), porém o vírus só foi isolado muitos anos depois, em 1969 (Miller et al., 1969 citado por Rodriguez et al. 2011). Acredita-se que a infecção tenha tido início na Europa e que sua disseminação tenha ocorrido pela introdução de bovinos europeus infectados em países livres da doença, no final do século XIX. A infecção então atingiu diversos países da Europa, Estados Unidos, Canadá e América do Sul, e posteriormente se espalhou pelo restante do mundo por meio do comércio internacional.

Pesquisas sorológicas revelaram que a LEB tem caráter endêmico em diversos países, com altas taxas de prevalência na América do Norte, América do Sul, África, Ásia e Austrália. Na Europa, programas nacionais de controle e erradicação implementados têm sido bem sucedidos. Diversos países, por possuírem rebanhos pequenos e baixa prevalência, conseguiram erradicar a infecção (Camargos et al., 2004; Rodriguez et al. 2011; Spadetto e Dias, 2013).

A LEB apresenta alta morbidade em rebanhos infectados e pode atingir uma prevalência de 60 a 90%. A prevalência sorológica é alta nos rebanhos bovinos brasileiros, principalmente leiteiros, e já foi detectada em diversos estados. No Pará, Molnár et al. (1999) encontraram uma ocorrência de 49,8% pela técnica de ELISA e 26% por IDGA em 721 amostras de soro sanguíneo. Em Botucatu, São Paulo, os resultados indicam 52% de soropositividade (Megid et al., 2003). No estado do Amazonas, Carneiro et al. (2003) detectaram 8,9% de soropositivos distribuídos nos 16 rebanhos avaliados. No Rio Grande do Sul, 60,71% (17/28) das

propriedades analisadas foram positivas (Poletto et al., 2004). Em Alagoas a prevalência média foi de 22,3% (Pinheiro Junior et al., 2013), em Minas Gerais 38,7% (Camargos et al., 2002), no Paraná 40,7% (Leuzzi Júnior et al., 2003), no Rio de Janeiro 53,2% (Romero e Rowe, 1981), no Tocantins 37% (Fernandes et al., 2009) e na Bahia 41% (Matos et al., 2005).

No Brasil a prevalência individual de animais infectados varia entre os estados com valores em torno de 50%, de acordo com o tipo de rebanho (leite ou corte) e sistema de exploração (extensivo ou intensivo), sendo que a doença ocorre com menos frequência em animais jovens (Leuzzi Junior. et al, 2001; Leite et al, 2013).

3.5. Impacto econômico

A infecção pelo BLV leva a prejuízos consideráveis tanto para o produtor quanto para a indústria. As principais perdas resultam do impacto na produção e eutanásia de animais com sinais clínicos, no entanto, perdas não relacionadas a morte por linfoma também são significativas em rebanhos positivos. Já foi demonstrado que a taxa de descarte é maior nesses rebanhos quando comparados com rebanhos negativos. Aparentemente a infecção por BLV afeta o sistema imunológico de tal forma que o animal deixa de ser produtivo o suficiente para ser mantido no rebanho e, muitas vezes, o animal é abatido antes mesmo do surgimento de qualquer sinal clínico.

Devido a imunossupressão resultante da doença, há maior suscetibilidade à infecções secundárias e oportunistas, o que também ocasiona abate e descarte prematuro. Estudos demonstram maior incidência de mastite, gastroenterite e bronquite entre vacas e rebanhos infectados com BLV do que livres. Dessa forma há aumento de custos com condenação de carcaças, serviços veterinários, medicamento e tratamento de animais doentes (Trainin et al., 1996; Leuzzi Junior et al., 2001; Trainin e Brenner, 2005; Frie et al., 2016).

A produção de leite e gordura também parece ser afetada, especialmente entre animais com LP. Esse efeito negativo pode estar relacionado a efeitos diretos provocados pelo vírus nas células do epitélio glandular mamário. Em países cujos sistemas mantêm registros detalhados de produtividade, como os EUA, Canadá, Japão e Austrália, estima-se uma queda de até 10% na produção leiteira (Da et al., 1993; Ravazzollo e Costa, 2007).

Estudos realizados por Ott et al. (2003), demonstraram prejuízo de mais de 500 milhões de dólares anualmente nos EUA quando considerados todos os problemas causados pela doença, principalmente pela queda na produção de leite em rebanhos positivos. Rajão et al. (2014) estimou que, no Brasil, a infecção por BLV pode resultar em perdas de mais de 100 dólares por vaca por lactação, o que representa uma perda econômica significativa, especialmente para pequenos produtores.

Além disso, há perda econômica indireta referente a restrições pelo comércio internacional. Muitos países, especialmente os da União Europeia, têm uma proibição contra animais e produtos de origem animal infectados com BLV, tais como sêmen e embriões (Larsen et al., 2013).

A LEB é de certa forma negligenciada e o verdadeiro impacto econômico dessa infecção não é totalmente claro, o que contribui para a disseminação da doença, uma vez que as medidas de controle não são realizadas de forma eficiente.

3.6. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da LEB pode ser feito pela identificação direta do agente por isolamento viral, a partir do cultivo *in vitro* de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), ou pela detecção de DNA proviral por reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de sangue,

órgãos e tumor. Entretanto, apesar de apresentar alta sensibilidade, o diagnóstico molecular é limitado devido ao elevado custo, sendo normalmente utilizado em pesquisa do vírus / doença ou de forma complementar à sorologia, como teste confirmatório em laboratórios de referência do mundo (“Enzootic Bovine Leukosis”, 2012; Leite et al., 2013).

A glicoproteína gp51 é altamente imunogênica e, por isso, é amplamente utilizada em testes de diagnóstico sorológico. A p24 também é bastante utilizada, uma vez que essa proteína compõe a maior parte do capsídeo viral e induz forte resposta imune. Os testes sorológicos preconizados pela OIE são o IDGA e o ELISA. A soropositividade é um dos melhores indicadores dessa infecção, uma vez que os animais infectados montam uma resposta imunológica robusta e persistente. Além do diagnóstico, esses testes têm outras importantes aplicações em Medicina Veterinária, incluindo pesquisa, vigilância epidemiológica, certificação de áreas livres e estudos de prevalência (Camargos et al., 2007; Gutiérrez et al., 2009; “Enzootic Bovine Leukosis”, 2012).

O IDGA, utilizado para as amostras de soro ou plasma individuais, foi considerado por muitos anos o teste de eleição para diagnóstico da LEB, sobretudo pela sua praticidade e baixo custo. Consiste basicamente em uma reação de precipitação de antígeno por anticorpo em meio semi-sólido, o gel de agarose, no qual antígeno e anticorpos se difundem formando complexos insolúveis que podem ser visualizados como linhas de precipitação. Porém, apesar da fácil aplicabilidade, apresenta falhas em detectar baixos títulos de anticorpos, especialmente em infecções recentes ou em animais com resposta de anticorpos reduzida, o que permite a ocorrência de falso-negativos no rebanho. Durante o periparto (duas a seis semanas antes e uma a duas semanas após o parto), os títulos de anticorpos também podem ser indetectáveis por IDGA, devido ao deslocamento de anticorpos maternos circulantes para o colostro. Também possui limitações associadas a repetibilidade e tempo para a obtenção dos resultados (até 72 horas), além de ter uma leitura subjetiva, o que pode ocasionar erros de interpretação de resultado (“Enzootic Bovine Leukosis”, 2012; Rodrigues et al., 2014).

Muitos testes utilizam antígeno produzido a partir do cultivo de células FLK persistentemente infectadas pelo BLV. Acontece que a maioria das linhagens de FLK disponíveis atualmente está contaminada pelo BVDV, o que pode resultar na ocorrência de reações inespecíficas. Em estudos realizados por Oliveira et al. (2013), 88 amostras pertencentes a 32 culturas de células de diferentes espécies, obtidas de oito laboratórios, foram testadas para diferentes contaminantes. Das 88 amostras, 21 (23,9%) foram positivas para BVDV por PCR, incluindo as três amostras de FLK de três diferentes lotes analisados.

Em 1995, rebanhos bovinos livres de LEB foram vacinados contra BVDV e posteriormente um número crescente de resultados positivos para essa doença foi detectado por ELISA, porém análises dessas reações por outros testes sorológicos e PCR forneceram resultados negativos. Concluiu-se que os resultados falso-positivos foram decorrentes de reatividade cruzada contra anticorpos anti-BVDV induzidos pela vacina (Beier e Conraths, 1996 citado por Beier et al., 2004).

Uma linhagem celular permissiva ao BLV e livre de BVDV poderia ser utilizada para produção de antígeno para uso em diagnóstico, eliminando assim a possível ocorrência de reações inespecíficas. Estudos realizados por Graves e Ferrer (1976) demonstraram que células de morcego são altamente permissivas ao BLV. A linhagem Tb1Lu apresentou aumento progressivo na produção de partículas virais, atingindo elevados níveis de replicação após um período de cultivo. Patrascu (1988) também observou aumento contínuo na produção de vírus em linhagem celular Tb1Lu, liberando grandes quantidades mesmo após um longo período de cultivo, bem como a indução de sincícios. Em adição, essas células também são resistentes à infecção por BVDV (ATCC), apresentando-se como uma fonte adequada para fins de pesquisa e produção.

Nos últimos anos, testes de ELISA têm sido desenvolvidos para utilização em *pool* ou em amostras individuais de soro e leite. Quando comparados ao IDGA, esses ensaios possuem sensibilidade mais elevada e leitura objetiva, sendo possível o processamento de um grande número de amostras simultaneamente, com obtenção de resultados em poucas horas (Gutiérrez et al., 2009; Troiano et al., 2013). Esse teste tem sido amplamente utilizado e pode ser aplicado para a detecção de antígenos independentemente de estarem associados a células ou em fase líquida. Baseia-se na imobilização de antígeno ou anticorpo em microplacas de fase sólida, seguida de incubação com soro teste. A detecção de uma interação antígeno-anticorpo altamente específica é realizada pela utilização de anticorpos marcados com enzimas e adição de um substrato cromogênico para a enzima conjugada, que irá produzir uma reação colorimétrica visível mensurável em espectrofotômetro (leitor de ELISA) (Goff, 2013; Gan e Patel, 2013).

3.7. ELISA indireto

Essa técnica possui algumas variações de acordo com modificações no procedimento básico. O ELISA indireto é o formato mais popular no diagnóstico virológico. O primeiro passo envolve a adsorção do antígeno à fase sólida de uma microplaca, normalmente de poliestireno, 96 poços. O revestimento ocorre devido a interação entre o plástico e os resíduos da proteína, por meio de forças de atração molecular chamadas de Van Der Waals, baseada na polaridade das moléculas. Dois tipos de placas estão disponíveis: uma com alta afinidade para moléculas com domínios hidrofílicos e hidrofóbicos, recomendada para adsorção de várias proteínas, incluindo glicoproteínas; e outra mais indicada para adsorção de moléculas hidrofóbicas. Além do material de superfície, a imobilização do antígeno também depende do tempo, temperatura e pH do meio. Adição da proteína dissolvida em tampão alcalino e incubação prolongada a 4°C parecem dar um revestimento mais uniforme.

Como a capacidade de ligação dos poços da placa é superior à quantidade de proteína adsorvida, após remoção da solução de revestimento, adiciona-se uma solução de bloqueio, ou seja, uma solução de proteínas heterólogas diluídas em um tampão, que se ligam aos sítios não ocupados pelos antígenos na superfície do poço, impedindo a ligação não específica de anticorpos durante os passos subsequentes do ensaio. A escolha do bloqueador ideal depende do tipo de conjugado enzimático utilizado no ensaio, sendo que ele deve bloquear todos os espaços remanescentes sem interagir com o epítipo de ligação do anticorpo. As placas revestidas e bloqueadas podem ser utilizadas imediatamente ou secas e armazenadas a 4°C para posterior utilização, dependendo da estabilidade da proteína adsorvida.

O anticorpo primário (soro / leite teste), que se liga especificamente ao antígeno, é então adicionado à placa e incubado, juntamente com soros controle positivo, negativo e branco. Em seguida, adiciona-se o conjugado (anticorpos secundários marcados com enzima), com especificidade para os anticorpos primários. Os marcadores enzimáticos mais utilizados são a fosfatase alcalina (AP) e horseradish peroxidase (HRP). Essas enzimas degradam o substrato, alterando a coloração do sistema ou gerando emissão química de luz.

O substrato específico da enzima é adicionado e incubado, a reação é interrompida após um curto período de tempo e é feita a detecção do sinal obtido. O resultado pode ser quantificado por espectrofotometria (leitor de ELISA), com comprimento de onda determinado pelo substrato utilizado, por exemplo o o-fenilenodiamina (OPD), melhor substrato para HRP, que apresenta melhores valores de absorvância à uma densidade óptica (OD) de 492nm.

A realização de lavagens completas entre todas as etapas do ELISA é fundamental para garantir a qualidade do teste, pois nesse processo ocorre a remoção do excesso de reagentes não ligados, reduzindo o *background*. Entretanto lavagens excessivas podem resultar na diminuição da sensibilidade causada pela eluição do antígeno adsorvido. Durante as lavagens, é importante que o excesso de líquido seja removido, a fim de evitar a diluição das soluções adicionadas nas etapas seguintes. A solução de lavagem é constituída por uma solução tampão com adição de

um detergente não iônico, geralmente tampão salina-fosfatase (PBS) com Tween-20 a 0,05%, e pode ser utilizada para diluição de anticorpos e bloqueio (Voller et al., 1979; Esser P., 2010; Thermo Fisher Scientific Inc., 2011; “An introduction to ELISA”, 2016).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras de soro

Como nos rebanhos brasileiros a prevalência da LEB é alta e dificilmente obteríamos amostras de rebanhos livres, para controles negativos, optamos pela estratégia de obter soros de bezerros antes da mamada do colostro. Setenta e três alíquotas de amostras de soro de bezerros coletadas antes (n = 32) e após (n = 41) mamar o colostro (sem colostro – SC e com colostro – CC, respectivamente), obtidas de uma mesma propriedade, foram gentilmente cedidas pelo professor Elias Jorge Facury Filho, do Laboratório de Clínica de Ruminantes da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As amostras foram coletadas sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), protocolo nº151/2015, relativo ao projeto intitulado “Produção de IgY anti - *Cryptosporidium pestis* e *bovis* e sua avaliação no controle da infecção em camundongos e bezerros”.

4.2. Cultivo de células/vírus

Foi utilizada uma linhagem celular Tb1Lu, ATCC, CCL-88, previamente infectada com amostra de campo isolada de um bovino da Fazenda Experimental Modelo de Pedro Leopoldo, como parte do projeto de mestrado intitulado “Leucose bovina: Isolamento do vírus e produção de antígeno para IDGA”. A infecção foi confirmada por PCR para amplificação do gene *tax* do BLV (Galinari, 2014). Para garantir a ausência do BVDV, tanto a célula quanto o soro fetal bovino (SFB) utilizados foram previamente testados para BVDV por PCR, pelo Laboratório de Cultivo Celular, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária da UFMG.

O cultivo foi feito em garrafas plásticas, com Meio Essencial Mínimo Eagle (MEM) contendo 1% de penicilina/estreptomicina, 0,5% de fungizon e 25mM de Hepes, suplementado com 5% de SFB (MEM 5% SFB).

No momento da passagem, o meio metabolizado foi coletado e o tapete celular foi lavado duas vezes com PBS 1X. Após lavagem, foi adicionado tripsina em quantidade suficiente para cobrir a monocamada e incubou-se por cinco a 10 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado pequeno volume de MEM 5% SBF e homogeneizou-se por pipetagem, para desagregação das células. Realizou-se contagem em Câmara de Neubauer e foi feito o repique de 70.000 céls/cm² para novas garrafas. As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C até atingir aproximadamente 80% de confluência, quando foi feita nova passagem das células. O sobrenadante foi coletado a cada passagem e armazenado a -20°C.

4.3. Produção do antígeno

Células e sobrenadante foram submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento para rompimento das células e liberação de partículas e proteínas virais. A suspensão celular foi centrifugada a 925g por 30 minutos à 4°C para retirada dos debris celulares. Para precipitação das proteínas, o sobrenadante foi recolhido e foi adicionado, aos poucos, 0,318g de sulfato de amônio para cada 1mL de sobrenadante, que foi mantido sob agitação por uma hora a 4°C, após adição completa do o sulfato de amônio. Foi realizada nova centrifugação a 4000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em pequeno volume

de PBS (menos de 1/50 do volume original) e transferido para uma membrana de diálise previamente preparada, etapa necessária para a retirada do sulfato de amônio. O conteúdo na membrana foi dialisado contra PBS 1x (100 vezes o volume contido na membrana), com duas trocas, a 4°C sob agitação. A primeira diálise foi feita por aproximadamente 12-14 horas e a segunda por aproximadamente quatro horas. Após diálise, a membrana foi coberta com polietilenoglicol (PEG 6000) a 4°C por aproximadamente uma hora, para concentração do volume do dialisado. O concentrado foi transferido para um microtubo e foi adicionado 10% de triton X-100 a 1% de inibidor de protease (Sigma/P8849) com agitação lenta por inversão por 30 minutos.

4.4. Quantificação de proteínas totais

A estimativa da concentração de proteínas totais do concentrado final foi realizada utilizando o *kit* de Proteínas Totais Monoreagente da Bioclin (Minas Gerais, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, em um tubo de ensaio foi adicionado 2,5mL de biureto (branco), em outro foi adicionado 2,5mL de biureto + 50µL da amostra e em um terceiro foi adicionado 2,5mL de biureto + 50µL do padrão. As soluções foram bem homogeneizadas e, após 10 minutos de incubação, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (Spectrumlab 22PC) a um comprimento de onda de 545nm.

4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para desagregação e análise das proteínas, o antígeno foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando o *AmershamTMECLTMGel 10%* (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, em cada canaleta foi adicionado 1,0µg/35µL de cada antígeno e 5µL do marcador de massa molecular *Mark 12TM Unstained Standart* (Invitrogen) e iniciou-se a corrida por uma hora a 160V. Após eletroforese, foi realizada a coloração do *AmershamTMECLTMGel* com *Coomassie Blue Brilliant R-350*.

4.6. IDGA

Para realização do IDGA, foi utilizado o *kit* comercial da TECPAR, que utiliza antígeno bruto produzido a partir de linhagem celular FLK persistentemente infectada pelo BLV, seguindo as recomendações do fabricante. Em uma lâmina de vidro 25x76mm, foi adicionado 4,5mL de ágar a 0,9% diluído em tampão fosfato pH 7,3. Após solidificação, os poços foram perfurados com cortador padrão com sete orifícios de 4mm de diâmetro (um central e seis periféricos), distanciados 3mm entre si. No poço central, foi pipetado 25µL do antígeno e nos poços periféricos, foram adicionados 25µL do soro controle positivo e dos soros teste, alternadamente, totalizando três soros teste por roseta e nove soros por lâmina. Após 72 horas de incubação em câmara úmida a temperatura ambiente (TA), procedeu-se leitura com auxílio de luz indireta contra um fundo escuro.

4.7. ELISA *Chekit Leucose-Serum* (IDEXX Laboratories, EUA)

Todas as amostras foram submetidas ao ELISA comercial (ELISA *Chekit*), um ELISA indireto com microplacas revestidas com antígeno bruto inativado. O procedimento foi realizado seguindo as recomendações do fabricante: controle positivo, controle negativo e soros teste foram diluídos no diluente de amostra na proporção de 1:10, cada diluição foi adicionada em seu respectivo poço e a placa foi incubada por uma hora a 37°C. Em seguida, conjugado anti-igG de ruminante foi adicionado e incubou-se por uma hora a 37°C. Foi adicionado o substrato e, após 15 minutos de incubação a TA, a reação foi interrompida com solução de parada. Entre todas as etapas foram realizadas três lavagens com solução de lavagem 1x. Foi feita a leitura a 450nm e os resultados foram interpretados conforme orientação do manual do *kit*.

4.8. Padronização do ELISA indireto (iELISA)

Inicialmente, as placas de ELISA (*Maxisorb*, *Nunc*, Hampton, NH, USA) foram adsorvidas por 19h a 4°C com duas diferentes concentrações do antígeno (0,5µg/poço e 1,0µg/poço) diluído em tampão carbonato 0,05M pH 9,6 em um volume total de 100µL/poço. Após incubação, a placa foi lavada duas vezes com 200µL/poço de PBS 1X + 0,05% de Tween 20 (PBST). Em seguida foi realizado bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação, com 100µL/poço de solução de bloqueio (PBST + 5% de leite em pó desnatado), incubando-se por uma hora a TA. Foram realizadas três lavagens com PBST. Em seguida diluições seriadas de quatro soros, dois positivos (pool de amostras positivas e amostra CC) e dois negativos (SFB e amostra SC) por IDGA (1:2 a 1:256) foram realizadas em PBST + 1% de leite em pó desnatado, e 100µL de cada diluição, foram adicionados em cada poço da placa incubando-se por uma hora a TA. Seguiu-se nova lavagem com PBST e foram testadas diluições do conjugado (*anti-bovine IgG peroxidase* – *Sigma*) a 1:5000 e 1:7500, diluído em PBST + 1% de leite em pó desnatado. Foi adicionado 100µL/poço e incubou-se por mais uma hora em TA. Três novas lavagens foram realizadas e adicionou-se 100µL/poço do substrato: solução de o-fenilendiamina (OPD) (0,5 mg/mL) e 0,003% de peróxido de hidrogênio 30 volumes em tampão fosfato-citrato pH 5,0 (ácido cítrico 0,1 M; fosfato de sódio 0,2 M), por 20 minutos a TA, ao abrigo da luz. Após incubação, a reação foi interrompida com 40µL/poço de H₂SO₄ 1N. Foi realizada a leitura em leitor de ELISA em comprimento de onda de 492nm. Todos os soros foram avaliados em duplicata, além do branco (PBST + 1% de leite em pó desnatado).

4.9. Análise estatística

Para análise estatística, os dados foram tratados no programa *MedCalc* versão 13.0.0.0 (*MedCalc Software*, Mariakerke, Bélgica). A determinação do ponto de corte do iELISA foi realizada através da análise de Curva Roc. Para comparação entre os testes foi utilizada uma tabela de contingência (2x2), e foram avaliados valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), sensibilidade e especificidade relativas, concordância entre os testes e índice Kappa.

5. RESULTADOS

5.1. Antígeno produzido (Ag-BLV)

A concentração de proteínas totais foi estimada em 6,19µg/µL. Para verificar a presença de proteínas virais, o antígeno produzido foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida. Uma banda próxima à altura de 52kDa foi detectada, indicando a presença da glicoproteína gp51 do envelope viral (Fig.1).

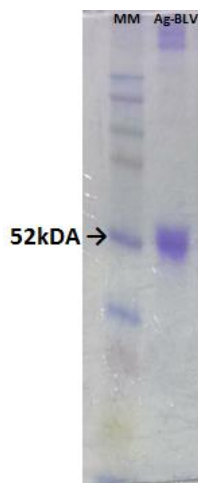


Figura 1: Gel de poliacrilamida corado com *Coomassie Blue Brilliant R-350*.
Canaleta 1: marcador molecular (MM), canaleta 2: Ag-BLV.

5.2. Padronização do iELISA

O iELISA foi padronizado com as seguintes condições: 1,0 μ g de antígeno bruto por poço, soro na diluição de 1:25 e conjugado na diluição de 1:5000. Nessas condições obteve-se uma maior discriminação entre soros positivos e negativos, baseado no resultado do IDGA, utilizado como referência nessa padronização.

A figura 2 mostra a relação entre a frequência da DO e a distribuição de 36 (49,31%) soros positivos e 37 (50,69%) negativos por IDGA (referência). Vinte e sete soros negativos por IDGA tinham DO inferior a 0,100, enquanto apenas dois foram positivos, já na DO entre 0,100 e 0,150 o número de positivos aumentou para 12, enquanto a quantidade de negativos caiu para seis.

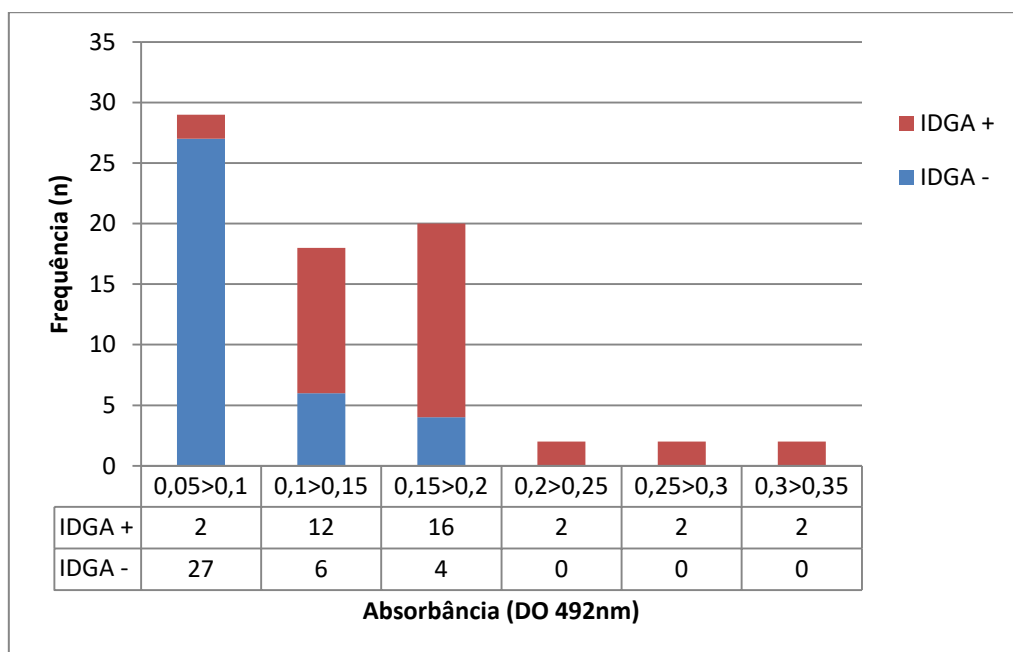


Figura 2: Representação da distribuição dos soros por DO em iELISA comparada ao IDGA

A análise da Curva Roc (Fig.3), utilizando as amostras de campo, indicou um ponto de corte em uma DO de 0,104 (Fig.4). A capacidade diagnóstica do teste foi medida pela avaliação de sua

sensibilidade e especificidade relativas ao IDGA, com intervalo de confiança de 95%, que foram 94,44% e 75,68%, respectivamente. Ao avaliar a probabilidade de um animal com resultado positivo e negativo no iELISA realmente possuir ou não anticorpos anti-BLV, encontrou-se VPP=79,1% e VPN=93,3%. A área sob a curva (AUC) foi calculada em 0,883 e utilizada para avaliar a acurácia do teste. A concordância entre os testes foi de 84% e o índice Kappa foi 0,699, classificado como bom (0,61 - 0,80) de acordo com a escala Fleiss (Lage, D. P., Martins, V. T., Duarte, M. C. et al., 2016) (tabela 1).

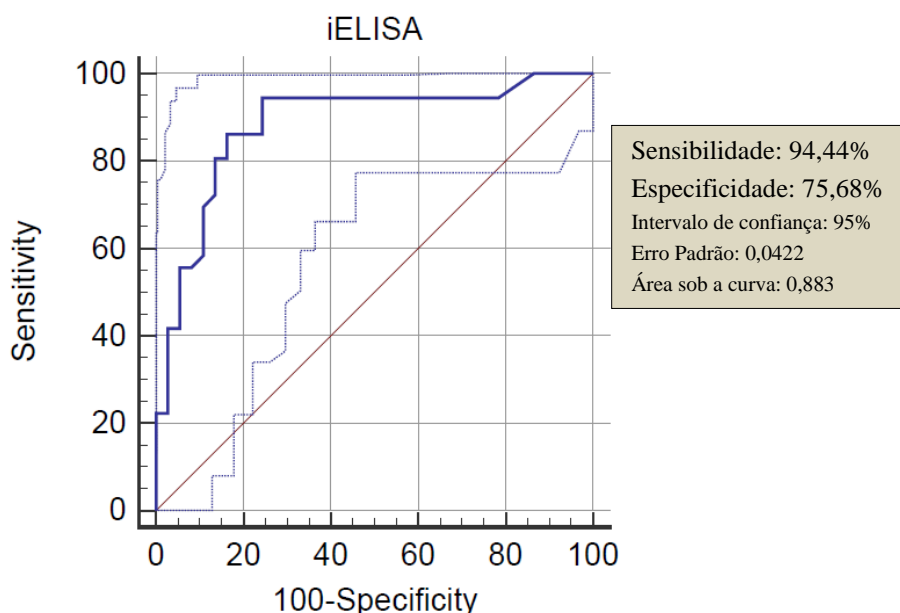


Figura 3: Curva Roc baseada no resultado das amostras de campo

Tabela 1: Análise comparativa entre os testes iELISA e IDGA

		iELISA		Sens.%	Esp.%	VPP%	VPN%	Conc.%	Kappa	
		Pos	Neg							
IDGA	Pos	34	2	36	94,44	75,68	79,1	93,3	84	0,699
	Neg	9	28	37						
		43	30	73						

As amostras de campo foram consideradas positivas quando apresentaram DO acima de 0,104. Das 73 amostras de soro testadas, 43 (58,9%) foram positivas no iELISA, sendo que destas, nove (12,32%) foram negativas por IDGA. Trinta amostras (41,09%) foram consideradas negativas no iELISA, apenas duas (2,73%) destas foram positivas pelo IDGA (Fig.4).

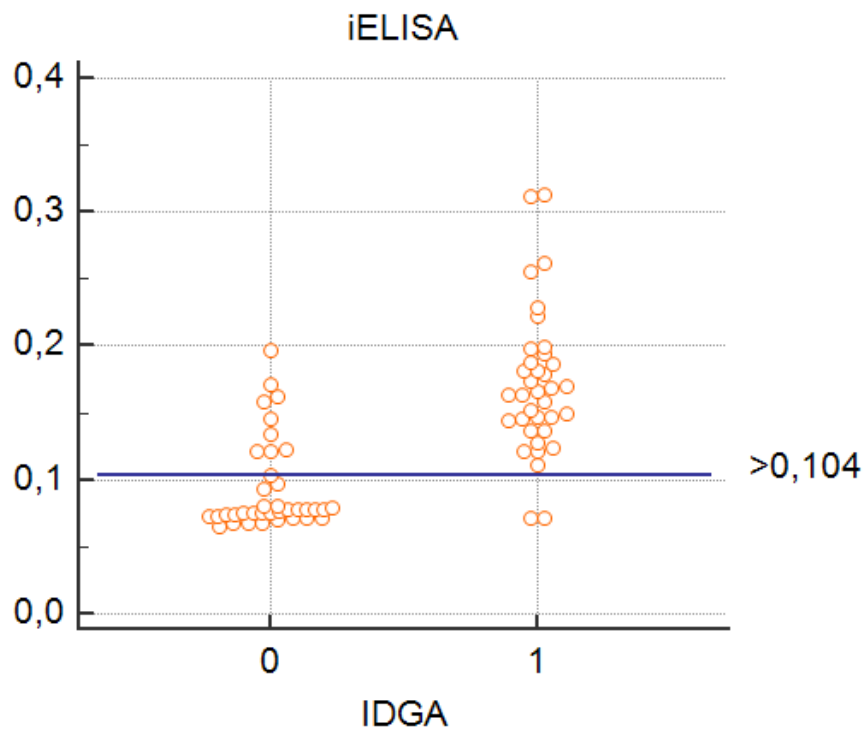


Figura 4: Comparação do resultado das 73 amostras de soros de bezerros testadas por iELISA e IDGA.

5.3. Comparação entre iELISA e ELISA Chekit (IDEXX)

Das 73 amostras de soro testadas, 41 (56,16%) foram positivas, 31 (42,46%) negativas e uma foi considerada indeterminada pelo ELISA Chekit, enquanto pelo iELISA foram detectadas 43 (58,9%) amostras positivas (incluindo a amostra com resultado indeterminado pelo ELISA Chekit) e 30 negativas (41,09%) (Fig.5).

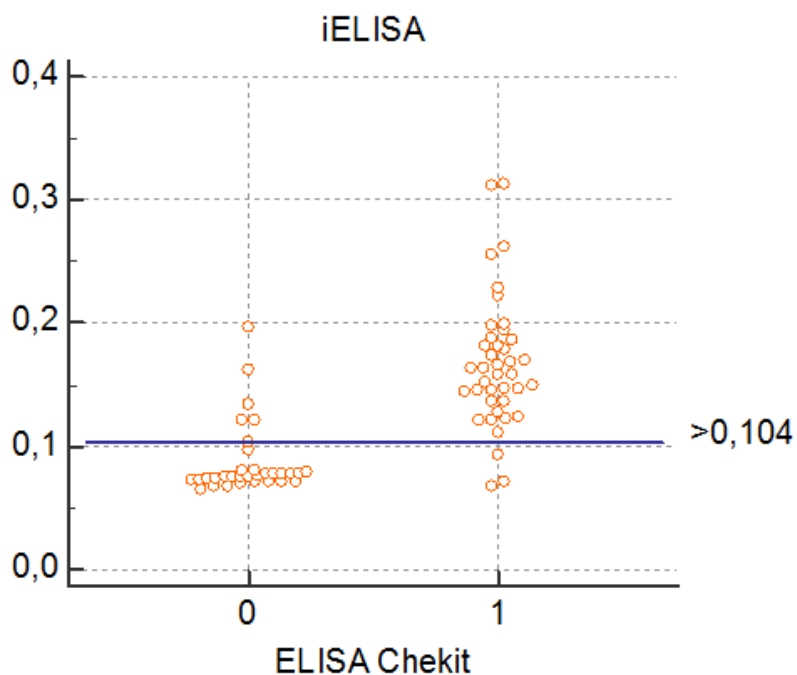


Figura 5: Comparação do resultado das 72 amostras de soros de bezerros testadas por iELISA e ELISA Chekit.

Para análise dos parâmetros de sensibilidade, especificidade, concordância e índice kappa a amostra com resultado indeterminado pelo ELISA *Chekit* foi excluída. Dessa forma, o iELISA apresentou sensibilidade de 92,6% e especificidade de 87,09% em relação ao ELISA *Chekit*. A concordância entre os testes foi de 90,27% e o índice Kappa 0,801 (Tabela 2).

Tabela 2: Análise comparativa entre os testes iELISA e ELISA *Chekit*

		iELISA		Sens.%	Esp.%	Conc.%	Kappa
		Pos	Neg				
ELISA <i>Chekit</i>	Pos	38	3	92,6	87,09	90,27	0,801
	Neg	4	27				
		42	30				

5.4. Análise dos resultados obtidos de amostras CC e SC

A maioria das amostras de soro de bezerro CC e SC foram positivas e negativas, respectivamente, nos três ensaios (Anexo 1), como era de se esperar. Entretanto, como pode ser observado na tabela 3, um pequeno número de bezerros CC foi diagnosticado como negativo e SC como positivo.

Tabela 3: Relação dos resultados obtidos em cada teste das amostras de soro de bezerros CC e SC

Soros	IDGA		iELISA		ELISA <i>Chekit</i>	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
CC	34 (46,6%)	7 (9,6%)	40 (54,8%)	1 (1,4%)	37 (51,4%)	3 (4,2%)
SC	2 (2,7%)	30 (41,1%)	3 (4,1%)	29 (39,7%)	3 (4,2%)	29 (40,2%)
Total:	73		73		72	

A tabela 4 mostra com mais detalhe o resultado de cada teste. Houve discordância entre 11 (15,06%) amostras de soro, sendo que uma amostra (37 CC) positiva para o iELISA, teve resultado negativo pelo IDGA e indeterminado pelo ELISA *Chekit*. Três amostras (02 CC, 42 CC e 03 SC) foram positivas pelo iELISA e negativas nos outros dois testes. Curiosamente, o soro 11 SC, positivo por IDGA, foi negativo para os ELISA's.

Tabela 4: Relação dos resultados discordantes obtidos das amostras de soro de bezerros CC e SC

Amostra	RESULTADO		
	IDGA	iELISA	ELISA <i>Chekit</i>
01 CC	-	+	-
02 CC	-	+	-
04 CC	-	+	+
27 CC	-	+	+
35 CC	-	-	+
37 CC	-	+	Indeterminado
42 CC	-	+	-
01 SC	-	-	+
03 SC	-	+	-
11 SC	+	-	-
12 SC	-	+	+

21 SC	-	+	-
23 SC	+	-	+

6. DISCUSSÃO

O BLV parece exibir menor variabilidade genética quando comparado a outros retrovírus, contudo, estudos filogenéticos do gene *env* de estirpes isoladas de vários países demonstram que esse vírus pode ser classificado em pelo menos nove genótipos distintos de acordo com variações na gp51. Essas variações são localizadas preferencialmente nos epítomos conformacionais F, G e H, e especula-se que podem influenciar nas características antigênicas do vírus, podendo reduzir a sensibilidade dos métodos de diagnóstico, principalmente sorológicos, uma vez que estes são locais de indução de anticorpos neutralizantes. O uso de antígeno proveniente de uma amostra viral brasileira para produção do ELISA indireto pode melhorar a sensibilidade do teste, uma vez que essa variabilidade entre as estirpes está associada a diferentes regiões geográficas. Entretanto, os sítios de glicosilação, importantes em processos como ligação do vírus com os receptores celulares e fusão célula-célula, foram altamente conservados entre as diferentes estirpes de BLV. Esse alto grau de conservação preserva as funções essenciais da proteína (Camargos et al., 2004; Polat et al., 2016). Para avaliar melhor essa interferência, seria necessário testar um maior número de amostras e de diferentes origens. Além disso, é primordial a realização de mais estudos para elucidar essa hipótese, que é ainda contraditória.

O IDGA é o método mais utilizado para diagnóstico da LEB no Brasil. Essa técnica continua sendo a mais prática e econômica, sendo reconhecida pela maioria dos governos como o teste oficial utilizado em processos de importação. Entretanto, devido à alta prevalência do BLV nos rebanhos brasileiros, é inviável sua utilização em estudos epidemiológicos e programas de controle, uma vez que um grande número de amostras deve ser testado (Camargos et al., 2007; Troiano et al., 2013). Além disso, atualmente apenas um laboratório produz o *kit* de IDGA para essa doença no Brasil, e este não consegue suprir o país nos exames básicos de rotina laboratorial, pois o antígeno utilizado é dependente de cultivos virais, um processo de produção longo e complexo, sendo necessária grande quantidade de antígeno para execução desse teste. No iELISA desenvolvido apenas 16,15µL do antígeno produzido foram suficientes para adsorver uma placa de 96 poços e testar 45 amostras (testadas em duplicata), enquanto no IDGA, são necessários 25µL de antígeno puro para testar somente três amostras. Portanto, uma das grandes vantagens do ELISA em relação ao IDGA, é o uso de quantidades muito menores de antígeno por teste / placa, além de ser um teste de alta sensibilidade, capaz de testar um grande número de amostras simultaneamente e fornecer resultados rapidamente.

Entretanto, atualmente não há *kits* de ELISA comerciais disponíveis no Brasil e a importação desses é um processo dispendioso e geralmente demorado, o que inviabiliza o uso desta técnica em grande escala no país. Além disso, muitos desses ensaios utilizam preparações de antígeno oriundas do cultivo de células FLK persistentemente infectadas pelo BLV, suscetíveis à contaminação por BVDV. Com a finalidade de minimizar a ocorrência de reações inespecíficas e aumentar a especificidade do teste, uma linhagem celular Tb1Lu infectada pelo BLV e livre de BVDV foi utilizada para a produção do antígeno utilizado na padronização do iELISA e se mostrou como uma alternativa eficiente para esse fim.

Quando comparado a outros tipos de ELISA, o ELISA indireto apresenta vantagens relacionadas a facilidade de execução e boa sensibilidade, pois cada anticorpo primário contém vários epítomos de ligação pelo anticorpo secundário, permitindo a amplificação do sinal. Baixo custo e versatilidade também são características desse método, uma vez que o mesmo anticorpo secundário conjugado pode ser utilizado para detecção de uma variedade de anticorpos

primários e diferentes marcadores de visualização podem ser utilizados com o mesmo anticorpo primário (Thermo Fisher Scientific Inc., 2011).

De acordo com resultado obtido pela eletroforese (Fig.1), a gp 51 viral constitui-se na principal proteína parcialmente purificada no processo de produção do antígeno. Animais infectados desenvolvem uma resposta humoral caracterizada pela produção de altos títulos de anticorpos, principalmente contra as proteínas p24 e gp51, o que justifica a ampla utilização desses antígenos em testes de diagnóstico sorológico, mais comumente a gp51, uma vez que anticorpos contra a mesma atingem títulos mais elevados e são detectados mais precocemente do que aqueles produzidos contra p24 (Gutiérrez et al., 2009).

O iELISA desenvolvido neste trabalho apresentou alta sensibilidade (94,44%) e considerável especificidade (75,68%) relativas ao IDGA, sendo capaz de detectar 9,58% a mais de amostras positivas do que o teste de referência. Além disso, quatro (5,47%) amostras com resultado fraco positivo no IDGA apresentaram leitura alta no iELISA, sendo classificadas como positivas. Reações fracas ao IDGA e positivas no iELISA são uma característica importante do teste, uma vez que esse tipo de reação é mais difícil de detectar e pode facilmente passar despercebida. Isso pode ocorrer porque o IDGA só detecta grandes quantidades de imunoglobulinas, o que permite a ocorrência de falsos negativos no rebanho, podendo prejudicar a eficiência de programas de controle.

Das 73 amostras testadas, nove foram negativas para o IDGA e positivas no iELISA, isso poderia ser explicado por um baixo título anticorpos no soro desses animais, indetectáveis pelo IDGA, ou até mesmo erro de leitura, uma vez que a leitura dos resultados desse teste é subjetiva e sujeita a erros de interpretação. Curiosamente, duas amostras coletadas de animais não colostrados foram positivas por IDGA e negativas no iELISA, esses resultados podem ser interpretados como falso positivos. Outra alternativa é que esses bezerros tenham nascido de vacas infectadas e tenha ocorrido transmissão vertical durante a gestação. Animais colostrados negativos por IDGA foram positivos em pelo menos um dos ELISA's, o que provavelmente indica um resultado falso negativo no IDGA.

Quando comparado ao ELISA *Chekit Leucose-Serum* (IDEXX Laboratories, EUA), o iELISA apresentou maior sensibilidade e classificou como positiva uma amostra com resultado indeterminado pelo teste comercial. Demonstrando que o ensaio desenvolvido possui desempenho similar ao comercial e pode ser utilizado alternativamente ao *Chekit Leucose-Serum* com a vantagem de ser economicamente mais viável e acessível aos produtores e laboratórios de diagnóstico.

O controle da LEB é difícil devido à sua ampla distribuição, lenta evolução e presença de um grande número de animais assintomáticos, que passam despercebidos pelo rebanho, além da falta de conhecimento entre produtores e técnicos sobre a real importância da doença como fonte de prejuízos, o que contribui para disseminação do vírus. Nos EUA, onde o baixo risco de desenvolvimento de tumor não é visto como razão suficiente para controlar a disseminação do vírus e, portanto, não há esforços para tal, a perda econômica anual associada à essa infecção é estimada em 500 milhões de dólares. Os prejuízos são resultantes da condenação de carcaças em matadouros, descarte precoce ou morte de animais com linfomas, queda na produção de leite e barreiras para exportação de animais e seus produtos, além de gastos com medicamentos e assistência veterinária (Rajão et al., 2014; Frie et al., 2016). A identificação de animais positivos é necessária para controlar a disseminação do vírus, o iELISA desenvolvido possibilita melhor compreensão da verdadeira situação da LEB no Brasil e realização de estudos do impacto da doença na produtividade, auxiliando órgãos oficiais no controle eficiente dessa enfermidade.

Adicionalmente aos impactos provocados na pecuária e economia, o BLV também tem sido alvo de pesquisa devido ao seu possível potencial zoonótico como agente causador do câncer de mama humano. Estudos realizados por Buehring e colaboradores (2003), em que foram testadas

257 amostras de soro humano, encontrou-se 74% de soropositividade contra a proteína p24 do capsídeo viral. Outro estudo conduzido pelo mesmo grupo, em 2014, detectou a presença de DNA de BLV em tecido mamário de mulheres diagnosticadas com câncer de mama. O trabalho não é conclusivo, mas sugere uma possível associação entre BLV e câncer de mama em humanos. Dessa forma, pesquisas envolvendo BLV e saúde humana têm se tornado mais frequentes, sendo que testes de diagnóstico eficientes em detectar animais positivos são importantes ferramentas de trabalho nesses estudos, uma vez que essa infecção pode representar também um problema de segurança alimentar e saúde pública.

Testes sorológicos possuem algumas limitações e em algumas situações, por exemplo em infecção recente ou periparto, podem falhar em detectar animais positivos. Nesses casos, amostras que apresentarem perfil duvidoso podem ser confirmadas por um método auxiliar, como PCR para detecção de provírus.

A determinação precisa do estado de infecção por BLV é importante em estratégias de prevenção baseadas na separação de animais positivos e negativos para criar rebanhos livres e a triagem visa classificar indivíduos que têm maior probabilidade de estarem doentes. Quando a prevalência da doença é alta, como é o caso da LEB, é indicado o uso de um teste com alta sensibilidade, mesmo que sua especificidade seja relativamente baixa (Siqueira e Tibúrcio, 2011). Portanto, o iELISA desenvolvido é uma boa alternativa para ser utilizada como teste de triagem para a LEB.

7. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, foi possível concluir que o ELISA indireto padronizado com antígeno gp51 produzido em Tb1Lu infectada com amostra brasileira do BLV, apresentou uma alta sensibilidade para o diagnóstico do LEB, podendo ser utilizado como ferramenta em pesquisas e inquéritos sorológicos. Entretanto, resultados conflitantes devem ser confirmados por um teste complementar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDA, Y.; MURAKAMI, H.; TAKAHASHI, M., et al. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol.*, v.4, p.328, 2013.

“AN INTRODUCTION TO ELISA”. What is ELISA, procedures, types of ELISA, detection options and results. 2016. Disponível em: < <https://www.bio-rad-antibodies.com/an-introduction-to-elisa.html>>. Acesso em: 12 dez. 2016.

ARAINGA, M.; TAKEDA, E.; AIDA, Y. Identification of bovine leukemia virus tax function associated with host cell transcription, signaling, stress response and immune response pathway by microarray-based gene expression analysis. *BMC Genomics*, v. 28, n. 121, p. 1-18, 2012

BAREZ, P.Y.; BROGNIEX, A.; CARPENTIER, A. et al. Recent advances in BLV research. *Viruses*, v. 7, n. 11, p. 6080-88, 2015.

BEIER, D., CONRATHS, F.J. Abklärung fraglicher und falsch-positiver Ergebnisse in einem Testbesteck zum Nachweis von Antikörpern gegen das bovine Leukosevirus (BLV) und mögliche Zusammenhänge zu BVD/MD-Impfungen. *Mitteilungsblatt zur Tierseuchensituation der Bundesrepublik Deutschland, BFAV*, I. Halbjahr, 1996.

- BEIER, D.; RIEBE, R.; BLANKENSTEIN, P. et al. Establishment of a new bovine leukosis virus producing cell line. *J Virol Methods*, v. 121, n. 2, p. 239–246, 2004.
- BROGNIEZ, A.; BOUZAR, AB.B.; JACQUES, R. J. et al. Mutation of a single envelope N-linked glycosylation site enhances the pathogenicity of bovine leukemia virus. *J Virol.*, v. 89, n. 17, p. 8945-56. 2015.
- BROGNIEZ, A.; MAST, J.; WILLEMS, L. Determinants of the bovine leukemia virus envelope glycoproteins involved in infectivity, replication and pathogenesis. *Viruses*, v. 8, n. 4, p. 88, 2016.
- BUEHRING, G. C.; PHILPOTT, S. M.; CHOI, K. Y. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 19, n.12, p. 1105-13, 2003.
- BUEHRING, G. C.; SHEN, H. M.; JENSEN, H. M. et al. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerg Infect Dis.*, v. 20, n. 5, p. 772–782, 2014.
- BURNY, A.; CLEUTER, Y.; KETTMANN, R. et al. Bovine leukaemia: Facts and hypotheses derived from the study of on a infectious cancer. *Vet Microbiol.*, v. 17, n. 3, p. 197-218, 1988.
- CAMARGOS, M. F.; MELO, C. B.; LEITE, R. C. et al. Frequência de soropositividade para a leucose enzoótica bovina em rebanhos de Minas Gerais. *Ciênc Vet Trop.*, v. 5, n. 1, p. 20-26, 2002.
- CAMARGOS, M. F.; REIS, J. K.P.; LEITE, R.C. Bovine Leukemia Virus. *Virus Reviews & Research*, v. 9, n. 1, p. 44-59, 2004.
- CARNEIRO, P. A. M.; ARAÚJO, W. P.; BIRGEL, E. H.; SOUZA, K. W. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica*, v. 33, n. 1, p. 111-125, 2003.
- CAMARGOS, M. F.; FELIZIANI, F.; DE GIUSEPPE, A. et al. Evaluation of diagnostic tests to bovine leukemia vírus. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 102, p. 169-173, 2007.
- DA, Y.; SHANKES, R. D.; STEWART, J. A.; LEWIN, H. A. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 90, p. 6538-6541, 1993.
- DOMENECH, A.; GOYACHE, J.; LLAMES, L. et al. In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. *J Gen Virol.*, v. 81, n. 1, p. 109-118, 2000.
- ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS. World Organization For Animal Health (OIE). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Paris. 7ª edição, v.1, capítulo 2.4.11, p. 721- 731, 2012.
- ESSER, P. Principles in adsorption to polystyrene. Technical Bulletin: 06a. Thermo Fisher Scientific, 2010.
- FERNANDES, C. H. C.; MELO, L. E. H.; TENÓRIO, T. G. S. et al. Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região norte do estado do Tocantins, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v. 76, n. 3, p. 327-334, 2009.

- FRIE, M. C.; COUSSENS, P. M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 163, n. 3-4, p. 103–114, 2015.
- FRIE, M. C.; SPORER, K. R.; WALLACE, J. C. et al. Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 182, p. 125-135, 2016.
- GALINARI, G. C. F. Leucose bovina: Isolamento do vírus e produção de antígeno para IDGA. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- GAN, S. D.; PATEL, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, 2013.
- GILLET, N. A.; HAMAIDIA, M.; BROGNIEZ, A. et al. Bovine leukemia virus small noncoding RNAs are functional elements that regulate replication and contribute to oncogenesis *in vivo*. *Plos One*, v. 12, n. 4, 2016.
- GOFF, S. P. Retroviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Fields Virology*. 6ª edição. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 1424-1473.
- GRAVES, D. C.; FERRER, J. F. In vitro transmission and propagation of the bovine leucemia vírus in monolayer cell cultures. *Cancer Research*, v. 36, p. 4152-4159, 1976.
- GUTIÉRREZ, G.; ALVAREZ, I.; FONDEVILA, N. et al. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet Microbiol.*, v. 137, n. 3-4, p. 224–234, 2009.
- GUTIÉRREZ, G.; ALVAREZ, I.; POLITZKI, R. et al. Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol.*, v. 151, n. 3-4, p. 255-263, 2011.
- LARSEN, A.; GONZALEZ, E. T.; SERENA, M. S. et al. Expression of p24 gag Protein of Bovine Leukemia Virus in Insect Cells and Its Use in Immunodetection of the Disease. *Mol Biotechnol.*, v. 54, p. 475–483, 2013.
- LEISERING, A. Hypertrophy der Malpigischen Körperchen der Milz. *Bericht über das Veterinarwesen im Königreich Sachsen*, v. 16, p. 15–16, 1871.
- LEITE, R. C.; REIS, R. K. P.; OLIVEIRA, A. P. et al. Retrovíroses dos animais domésticos. *Veterinária e Zootecnia*, v. 20, p. 73-92, 2013.
- LEUZZI JUNIOR, L. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 22, n.2, p. 211-221, 2001.
- LEUZZI JÚNIOR, L. A.; GUIMARÃES JÚNIOR, J. S.; FREIRE, R. L., et al. Influência da idade e do tamanho do rebanho na soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos produtores de leite tipo B, na região norte do estado do Paraná. *Rev Bras Ciênc Vet.*, v. 10, n. 2, p. 93-98, 2003.
- MATOS, P. F.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre os resultados do teste de Elisa e da imunodifusão em gel de ágar. *Braz. J. Vet. Res. anim. Sci.*, v. 42, n. 3, p. 171-179, 2005.

- MEGID, J.; NOZAKI, C. N.; KURODA, R. B. S., et al. Ocorrência de leucose enzoótica bovina na microrregião da Serra de Botucatu. *Arq Bras Med Vet Zootec.*, v. 55, p. 645-646, 2003.
- MILLER, J.M.; MILLER, L.D.; OLSON, C.; GILLETTE, K.G. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst.*, v. 43, p. 1297-1305, 1969.
- MOLNÁR, É.; MOLNÁR, L.; DIAS, H. T., et al. Ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos no estado do Pará, Brasil. *Pesq Vet Bras.*, v. 19, p. 7-11, 1999.
- OLIVEIRA, T. F. P.; FONSECA Jr., A. F.; CAMARGOS, M. F., et al. Detection of contaminants in cell culture, sera and trypsin. *Biologicals*, v. 41, p. 407-414, 2013.
- OTT, S. L.; JOHNSON, R.; WELLS, S. J. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Med Vet.*, v. 61, n. 4, p. 249-262.
- PATRASCU, I.V. Bovine leukemia virus. VII. In vitro replication of virus in bat lung cell culture NBL BLV 2. *Virologie*, v. 39, n. 3, p. 199-205, 1988.
- PINHEIRO JUNIOR, J. W.; SOUZA, M. E.; PORTO, W. J. N. et al. Epidemiologia da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (LEB). *Ci. Anim. Bras.*, v.14, n.2, p. 258-264, 2013.
- POLAT, M.; TAKESHIMA, S. N.; HOSOMICHI, K. et al. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology*, v. 13, n. 4, 2016.
- POLETO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. *Ciência Rural*, v. 34, n. 2, p. 595-598, 2004.
- RAJÃO, D. S.; HEINEMANN, M. B.; REIS, J. K. et al. Effects of bovine leukemia virus infection on crossbred and purebred dairy cattle productive performance in Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 2, p. 891-900, 2014.
- RAVAZZOLLO, A. P.; COSTA, U. M. Retroviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: ufsm, 2007. p. 809-837.
- RODRIGUES, A. S.; BRITO, R. L. L.; PINHEIRO, R. R. et al. Padronização do Elisa indireto e *Western Blot* para diagnóstico da artrite-encefalite caprina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 66, n. 2, p. 417-424, 2014.
- RODRÍGUEZ, S. M.; FLORINS A.; GILLET, N. et al. Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV. *Viruses*, v. 3, n. 7, p. 1210-1248, 2011.
- ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. *Trop Anim Health Prod.*, v. 13, n. 2, p. 107-111, 1981.
- SPADETTO, R. M.; DIAS, A. S. Leucose enzoótica bovina – revisão de literatura. *Rev Cient Eletr Med Vet.*, ano XI, n. 20, 2013.
- SIQUEIRA, A. L.; TIBÚRCIO, J. D. Noções de probabilidade e aplicações. In: SIQUEIRA, A. L.; TIBÚRCIO, J. D. *Estatística na área da saúde: conceitos, metodologia, aplicações e prática computacional*. Belo Horizonte: Coopmed, 2011. p. 139-174

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. Thermo Scientific Pierce Assay Development Thecnical Handbook. Version 2. 2011.

TRAININ, Z.; BRENNER, J. MEIRON, R.; UNGAR-WARON, H. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 54, n. 1-4, p. 293-302, 1996.

TRAININ, Z.; BRENNER, J. The direct and indirect economics impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, v. 60, p. 94–105, 2005.

TROIANO, L. D. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AGOTTANI, J. V. B. et al. Production, characterization, and use of monoclonal antibodies against gp51 protein to diagnose bovine leukemia virus infection. *Biores Open Access*, v. 2, n. 1, p. 55-60, 2013.

TSUTSUI, T.; KOBAYASHI, S.; HAYAMA, Y.; YAMAMOTO, T. Fraction of bovine leukemia virus-infected dairy cattle developing enzootic bovine leucosis. *Prev Vet Med.*, v. 124, p. 96-101, 2016.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): A guide with abstract of microplate applications. Alexandria: Dynatech Laboratories, INC, p. 7-44, 1979.

YUAN, Y.; KITAMURA-MURAMATSU, Y.; SAITO, S. et al. Detection of the BLV provirus from nasal secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-qPCR-2: Comparison with blood samples from the same cattle. *Virus Res.*, v. 210, p. 248- 254, 2015.

9. ANEXO

Anexo 1: Relação dos resultados obtidos pelos três testes realizados

Amostras	Resultados			
	IDGA	iELISA		ELISA Chekit
		Leitura	Resultado	
01 CC	-	0,122	+	-
02 CC	-	0,162	+	-
03 CC	++	0,199	+	+
04 CC	-	0,146	+	+
05 CC	++	0,166	+	+
06 CC	++	0,194	+	+
07 CC	++	0,146	+	+
08 CC	++	0,198	+	+
12 CC	++	0,152	+	+
13 CC	++	0,145	+	+
14 CC	++	0,149	+	+
19 CC	++	0,186	+	+
20 CC	++	0,181	+	+
21 CC	++	0,229	+	+
27 CC	-	0,123	+	+
33 CC	++	0,137	+	+
34 CC	++	0,121	+	+
35 CC	-	0,093	-	+
36 CC	++	0,158	+	+
37 CC	-	0,171	+	Indeterminado
38 CC	++	0,124	+	+
39 CC	+	0,170	+	+
40 CC	+	0,181	+	+
41 CC	++	0,128	+	+
42 CC	-	0,197	+	-
43 CC	++	0,147	+	+
44 CC	++	0,121	+	+
45 CC	++	0,169	+	+
VIT CC	++	0,179	+	+
Gêmeo CC	++	0,312	+	+
Gêmea CC	++	0,313	+	+
B010 CC	++	0,256	+	+
B011 CC	++	0,188	+	+
B016 CC	++	0,164	+	+
B020 CC	++	0,147	+	+
B021 CC	++	0,262	+	+
B025 CC	++	0,111	+	+
B033 CC	+	0,174	+	+
B036 CC	++	0,164	+	+
B037 CC	+	0,137	+	+

B004 CC	++	0,222	+	+
01 SC	-	0,068	-	+
02 SC	-	0,080	-	-
03 SC	-	0,122	+	-
04 SC	-	0,078	-	-
05 SC	-	0,071	-	-
06 SC	-	0,078	-	-
07 SC	-	0,076	-	-
08 SC	-	0,078	-	-
09 SC	-	0,071	-	-
10 SC	-	0,070	-	-
11 SC	++	0,071	-	-
12 SC	-	0,158	+	+
13 SC	-	0,097	-	-
14 SC	-	0,074	-	-
15 SC	-	0,068	-	-
16 SC	-	0,073	-	-
17 SC	-	0,078	-	-
18 SC	-	0,076	-	-
19 SC	-	0,071	-	-
20 SC	-	0,073	-	-
21 SC	-	0,134	+	-
22 SC	-	0,104	-	-
23 SC	++	0,071	-	+
24 SC	-	0,068	-	-
40 SC	-	0,075	-	-
BLACK SC	-	0,065	-	-
S.J. SC	-	0,079	-	-
300 SC	-	0,081	-	-
330 SC	-	0,074	-	-
331 SC	-	0,077	-	-
91238 SC	-	0,076	-	-
DOUG SC	-	0,078	-	-

Legenda: +: amostra fracamente positiva; ++ : amostra positiva; - : amostra negativa