

OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS NO ESTADO DO PARÁ¹

Paulo R.G. de LIMA²
Eva MOLNÁR³
László MOLNÁR⁴
Hilma Lúcia T. DIAS⁵
Victoria T.M. GUEDES⁶

RESUMO: Determinou-se a ocorrência da infecção pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos, utilizando o teste ELISA indireto em rebanhos bovinos de diferentes raças, ambos os sexos e com idade de três a 12 anos, criados no Estado do Pará. As amostras de sangue foram coletadas em 31 rebanhos de 18 municípios localizados nas seis mesorregiões do Estado. A ocorrência de soropositividade foi igual a 70,81% (364/514). Com exceção de um, nos demais rebanhos foram encontrados animais reagentes e a ocorrência de soropositividade variou de 5% a 100%.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Vírus da Leucose Enzoótica dos Bovinos, ELISA Indireto, Ocorrência, Estado do Pará.

BOVINE LEUKEMIA VIRUS INFECTION IN BOVINE HERDS OF PARÁ STATE, BRAZIL

ABSTRACT: The bovine leukosis virus infection in bovine herds of different breeds raised in Pará State was determined by indirect ELISA. The samples of blood were collected in 31 herds of 18 municipal districts located in six mesoregions of the Pará State. The occurrence of seropositivity was 70,81% (364/514). In all herds, but one, there were seropositive animals and the occurrence of seropositivity ranged between 5% and 100%.

INDEX TERMS: Bovine Leukosis Virus, Indirect ELISA.

¹ Aprovado para publicação em 27.09.2000

² Médico Veterinário, Aluno do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal - Centro Agropecuário - Universidade Federal do Pará - UFPA

³ Médica Veterinária, Ph.D., Professora Visitante - Centro Agropecuário - UFPA.

⁴ Médico Veterinário, PhD, Professor Visitante - Centro Agropecuário - UFPA.

⁵ Médica Veterinária, Dra., Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional do CNPq. - Centro Agropecuário - UFPA.

⁶ Médica Veterinária, Dra., Estagiária do Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades Animais - Centro Agropecuário - UFPA.

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos índices de prevalência variarem amplamente entre os continentes e países, o vírus da leucose dos bovinos (VLB) possui distribuição mundial. Na Nova Zelândia a prevalência encontrada foi de 36% (Parrish et al., 1982), na Austrália, 30% (Eaves et al., 1994), na Tanzânia, 36% (Schoepf et al., 1997), nos Estados Unidos da América, 23% (Sargeant et al., 1997) e no Chile, 35,9% (Villout et al., 1994).

A prevalência da leucose enzootica dos bovinos (LEB) mudou muito nos últimos 20 anos, em virtude disso, vários países da Europa deram início a programas de erradicação. Os seguintes países conseguiram a erradicação total da LEB ou a ocorrência mínima de infecção, em 1976, na Bélgica e Alemanha, em 1978 na Áustria, em 1979 na Holanda e em 1982 na Hungria. O combate da LEB começou mais cedo na Dinamarca (1959) a partir de exames para linfocitose persistente, e esse país passou a utilizar, desde 1976, a imunodifusão em gel de ágar (IDAG), para a detecção de anticorpos contra o VLB (Tekes, 1994). Em outros países a situação mostrou-se diferente. Entre 1983 e 1991, na região de Wroclaw (Polônia) a prevalência da infecção variou de 7% a 27% nos rebanhos, individualmente. Em 1991, foi introduzido o exame obrigatório de todos os animais e a percentagem de soropositividade foi de 5,8%; 3,6%; 1,7% e 1,6% nos anos de 1992, 1993, 1994 e 1995, respectivamente (Otachel-Hawranek, 1997). Na província de Buenos Aires, Argentina, entre 1979 e 1981, cerca de 95,65% dos rebanhos examinados estavam livres da infecção, e em 1994 e 1995 descobriu-se que 68,5% dos rebanhos

leiteiros foram infectados em diferentes níveis: em 49,4% dos rebanhos encontrou-se o nível da infecção entre 1% e 15%; em 17,8%, entre 16% e 30% e em 1,3% dos rebanhos a ocorrência da doença foi mais que 30% (Ghezzi et al., 1997).

No Brasil, em vários Estados foram realizados levantamentos sorológicos pela prova de IDAG. Os resultados desses exames foram sumariados por Birgel Júnior et al. (1995). Em São Paulo e Minas Gerais a prevalência de anticorpos séricos contra VLB variou entre 4,1% e 70,1% nos animais, e 31,6% e 106% nos rebanhos (Birgel et al., 1994; Leite et al., 1980; Santos et al., 1985; Birgel Júnior et al., 1995).

Após a descoberta do VLB por Miller et al. (1969), foram elaborados métodos de diagnóstico para a demonstração de anticorpos contra a LEB, dentre os quais se destacam a imunofluorescência indireta, imunodifusão em gel de ágar, fixação do complemento, soroneutralização, radioimunoensaio, ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação em cadeia de polimerase (PCR). No entanto, nos últimos 15 anos a IDAG e o ELISA têm sido usados amplamente para detectar anticorpos contra o VLB no mundo inteiro (Tekes, 1994). Embora vários artigos refiram ser o teste ELISA o mais sensível que a IDAG (Fechner et al., 1996), ambas as provas são aceitas atualmente como método padrão, tanto na emissão de atestados sanitários como comerciais, quer para fins de exportação e importação de animais, aspectos forenses, para uso em programas de erradicação desta enfermidade (Hoff-Jorgensen, 1989; Johnson & Kaneene, 1992; Lucas, 1996).

O objetivo do presente estudo é de verificar a ocorrência da infecção pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos em animais criados no Estado do Pará, utilizando o teste ELISA indireto, inédito para o diagnóstico desta enfermidade no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A amostragem utilizada nesta pesquisa foi obtida de 514 bovinos procedentes de 18 municípios, distribuídos nas seis mesorregiões que compõem o Estado do Pará (Tabela 1). Os animais pertenciam às seguintes raças: Jersey, Simental, Pardo Suiço, Guzerá, Limousin, Holandesa

variedade branca, vermelha e preta, Marchigiana, Gir, Nelore, Mestiço zebú e um composto de raças denominado de Fênix, de diferentes idades e ambos os sexos. Os animais eram destinados à produção de leite e carne e para a reprodução, criados em sistemas semi-intensivo e extensivo, e de conformidade com o manejo de cada região. Do total, oito rebanhos eram constituídos de animais importados da Alemanha e Dinamarca em dezembro de 1994. Além disso, todos os animais utilizados no estudo foram submetidos à inspeção clínica para verificar a presença de lesões compatíveis com a forma tumoral da LEB.

Tabela 1 - Distribuição dos rebanhos estudados, de acordo com a mesorregião, microrregião e municípios do Estado do Pará, 2000.

Mesorregião	Microrregião	Município	Número de rebanhos	
Metropolitana de Belém	Castanhal	Castanhal	4	
		Igarapé-Açu	2	
		Sta. Izabel do Pará	2	
Marajó	Arari	Ponta de Pedras	1	
		Sta. Cruz do Arari	1	
Nordeste paraense	Bragantina	Capanema	2	
		Tailândia	1	
Sudeste paraense	Paragominas	Paragominas	2	
		Dom Eliseu	1	
		Rondon do Pará	2	
	São Félix do Xingú	Bannach	1	
		Marabá	2	
		Rio Maria	1	
Sudoeste paraense	Conceição do Araguaia	Conceição do Araguaia	1	
		Itaituba	3	
		Altamira	2	
		Monte Alegre	1	
Baixo Amazonas	Santarém	Monte Alegre	1	
		Santarém	2	
Total	6	13	18	31

As amostras de sangue foram coletadas através da punção na veia jugular e mantidas à temperatura ambiente até a coagulação, para posterior separação do soro por centrifugação a 3 000 rpm, durante 10 minutos, sendo transferido, conservado e armazenado a uma temperatura de -20°C até o momento da realização do exame.

Foi utilizado para o diagnóstico sorológico o teste ELISA indireto "BLV ELISA kit" preparado pela Animal Production Unit, FAO/IAEA, Agriculture and Biothecnology Laboratory, Agency's Laboratories Division, Seibersdorf, Áustria, sendo usado como antígeno a glicoproteína gp51, soros controles negativo, fraco e fortemente positivo. O conjugado foi preparado a partir de anticorpo monoclonal de camundongo anti IgG1 bovina, ligado a uma enzima de raiz forte (Horseradish peroxidase, HRPO). Como substrato foi utilizado o peróxido de hidrogênio e como cromógeno o TMB (SIGMA). A prova foi executada de acordo com o recomendado pela firma produtora do kit, sendo utilizadas microplacas (NUNC) e a leitura foi realizada em densidade óptica (DO) 450 nm no espectrofotômetro (BDSL, Immunscan). Os soros testados e os soros controles foram diluídos a 1:26.

3 RESULTADOS

De 514 amostras de soro oriundas de 31 rebanhos distribuídos em 18 municípios do Estado do Pará, 364 (70,81%) foram positivas para a LEB. Com exceção de um, todos os outros rebanhos encontravam-se infectados. Em sete dos 31 rebanhos, a proporção da infecção foi de 100%, e em apenas dois rebanhos a infecção atingiu

percentuais de soropositividade baixos (rebanho 13, com 5% e rebanho 5, com 6,25%). Os resultados obtidos se encontram sumariados na Tabela 2.

A maioria das amostras era de procedência de vacas na faixa etária de três a doze anos de idade e apenas 37 soros de bovinos machos foram examinados. A porcentagem de sororeagentes entre as fêmeas foi de 347/477 (71,9%), e machos, 21/37 (56,7%). Em virtude da pequena quantidade de amostras de animais com menos de três anos de idade, não foi possível neste estudo relacionar o fator idade com a ocorrência da LEB, o mesmo com relação às diferentes raças dos animais examinados.

4 DISCUSSÃO

Após a infecção, o VEB permanece no organismo do bovino por toda a vida, estes animais infectados produzem anticorpos contra o vírus, em quantidade demonstrável sorologicamente entre três a seis semanas após a exposição ao germe, havendo, assim, diferenças nas provas sorológicas quanto à sensibilidade e especificidade ao VLB (Johnson & Kaneene, 1992; Tekes, 1994; Hubner et al., 1996). O resultado da infecção pode variar amplamente em função da falta por vários anos de sinais clínicos ou com a morte devido ao linfossarcoma (Johnson & Kaneene, 1992).

Para avaliar os resultados obtidos nas provas sorológicas, comumente são usados os termos: positivo, suspeito e negativo para identificar os animais reativos, duvidosos e não reativos, respectivamente. Uma reação sorológica pode ser forte ou fraca e a intensidade da reação é expressa como título

da amostra examinada (Burgess, 1994). Isso é válido especialmente no caso dos testes de ELISA indireto que podem ser configurados de várias maneiras para alcançar diferentes níveis de sensibilidade e especificidade (Burgess, 1994; Nielsen et

al., 1995). Por essa razão, a determinação do valor discriminante é muito importante, pois, aumentando este valor, a especificidade também aumenta, porém diminui em sensibilidade (Nielsen et al., 1995).

Tabela 2 - Resultados sumariados do teste de ELISA indireto em amostras de soro sanguíneos de bovinos para a detecção do VLB. Estado do Pará, 2000.

Municípios	Número de rebanhos	Número de amostras	Positivo	
			Nº	%
Castanhal	6*	7	7	100
	7*	10	9	90
	8	20	4	20
	9*	13	13	100
Igarapé-Açu	12*	37	-	-
	13*	20	1	5
Sta. Izabel do Pará	27	22	20	90,9
	28	16	13	81,2
Ponta de Pedras	22	13	12	92,3
Sta. Cruz do Arari	26	15	15	100
Capanema	4	16	13	81,2
	5	16	1	6,2
Tailândia	31	20	16	80
Paragominas	20	25	17	68
	21	25	19	76
Dom Eliseu	11	15	14	93,3
Rondon do Pará	24	15	7	46,6
	25	15	11	73,3
Bannach	3	18	17	94,4
Marabá	17	24	20	83,3
	18	15	15	100
Rio Maria	23	16	15	93,7
Conceição do Araguaia	10	15	15	100
Itaituba	14*	7	7	100
	15*	10	9	90
	16*	11	9	81,8
Altamira	1	15	8	53,3
	2	15	10	66,6
Monte Alegre	19	16	16	100
Santarém	29	16	15	93,7
	30	16	16	100
Amostras	31	514	364	70,81

Nota: Sinais convencionais utilizados:

* Rebanho composto de animais importados da Alemanha e Dinamarca.

- Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

Molnár et al. (1999) examinando amostras de soro sanguíneo de bovinos criados no Estado do Pará, a prevalência encontrada da infecção pelo VLB foi de 49,8% no ELISA indireto e 26% na IDAG. Na presente pesquisa, a percentagem da infecção foi de 70,81%, constituindo-se o nível de soropositividade mais alto verificado no país. Dados semelhantes foram constatados somente em um rebanho, em Minas Gerais, com 70,1% (Leite et al., 1980).

As diferenças de prevalência encontradas nos diversos Estados brasileiros podem ser explicadas pelos diferentes tipos de manejo e tecnologias empregadas (Birgel Júnior et al., 1995). Existem várias vias para a difusão do VLB, entretanto, acredita-se que no Brasil a prática de pré-imunização contra hemoparasitas (*Anaplasma* sp e *Babesia* sp) tem se revelado a mais importante forma de disseminação da infecção, fato já demonstrado no início da década de 80 (Romero et al., 1982; Birgel, 1982). Posteriormente, isto foi verificado por Flores et al., (1992), que, de 47 animais destinados à doação de sangue, encontraram 21 (48,9%) bovinos soropositivos e Beutemüller et al. (1996) verificaram que 94,8% (17/18) dos bovinos de leite manifestaram-se positivos em Londrina, no Estado do Paraná.

Oito rebanhos examinados nesta pesquisa eram procedentes da Alemanha e Dinamarca, e na Tabela 2 verifica-se que os animais procedentes de três rebanhos encontravam-se 100% infectados, e em outros três encontraram-se 81,8% a 90% de animais soropositivos. No rebanho 12 não

se encontrou animal soropositivo, apesar da maioria das amostras examinadas tenha sido proveniente deste rebanho.

Com relação à presença de sinais clínicos da LEB, praticamente não se dispõe de comentários sobre os mesmos, pois, visitando as 31 fazendas, não foram encontrados animais com sintomas característicos que poderiam ser atribuídos à forma tumoral da LEB. Apesar da alta ocorrência da infecção pelo VLB (70,81%), todos os proprietários consultados sobre esta enfermidade, bem como quanto à forma tumoral, foram unânimes em afirmar total desconhecimento sobre a questão.

Não foram tratados, detalhadamente, os resultados de acordo com a sensibilidade de raças e a ocorrência da soropositividade segundo as faixas etárias dos animais. Em conformidade com a maioria dos dados apresentados na literatura consultada, praticamente, não existe diferença importante, concernente à sensibilidade, entre as raças estudadas.

5 CONCLUSÃO

- a) ELISA indireto comprovou ser uma prova sensível e apta para diagnóstico da LEB em massa.
- b) A infecção pelo VLB está bastante difundida nos rebanhos bovinos criados no Estado do Pará.
- c) Apesar do alto índice de infecção pelo VLB encontrado nos rebanhos estudados, não foi observada a forma tumoral da LEB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEUTTEMÜLLER, E. A.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A.F.; MÉDICE, K.C. Leucose enzoótica bovina: frequência de sororeagentes em grupos de animais com e sem sintomas clínicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24., 1996, Goiânia. *Resumo de temas livres...* Goiânia: Sociedade Goiana de Veterinária, 1996. 251 p.
- BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnósticos In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. (Ed). *Patologia clínica veterinária*. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 249-260.
- _____; BENESI, F.J.; D'ANGELINO, J.L.; AYRES, M.C.C.; COSTA, J.N.; BARROS FILHO, J.R.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Prevalência da leucose enzoótica dos bovinos em raça Nelore, criados no Estado de São Paulo. *Arquivo da Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia*. Salvador, v. 17, n. 1, p. 55-56, 1994.
- BIRGEL JUNIOR, E.H.; D'ANGELINO, J.L.; BIRGEL, E.H. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos, em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.15, p.93-99, 1995.
- BURGESS, G.W. *Serological monitoring of infectious diseases*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1994 (IAEA. Tec. Doc., 736).
- EAVES, J.W.; MOLLOY, J.B.; DIMMOCK, C.K.; EAVES, L.E. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Veterinary Microbiology*. v. 39, p.313-21, 1994.
- FECHNER, H.; KURG, A.; GEUE, L.; BLANKSTEIN, P.; MEWES, G.; EBNER, D., BEIER, D. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection of naturally infected cattle. *Journal of Veterinary Medical B*. v.43, p.621-30, 1996.
- FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; OLIVEIRA, C.; KREUTZ, L.C. Anticorpos contra vírus da Leucose bovina (VLB) em soros de bovinos provenientes da República Oriental do Uruguai. *A Hora Veterinária*, v. 12, n. 68, p. 5-8, 1992.
- GHEZZI, P.C.; DOLCINI, G.L.; GUTIÉRREZ, E.N. Bovine leukemia virus (BVL): Prevalence in the Cuenca Lechera Mar y Sierras from 1994 to 1995. *Revista Argentina de Microbiologia*, v. 29, n. 3, p. 137-146, 1997.
- HOFF-JORGENSEN, R. An international comparison of different laboratory tests for the Diagnosis of bovine leukosis: suggestions for international standardization. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.22, p. 293-297, 1989.
- HUBNER, S.O.; WEIBLEN, R.; TOBIAS, F.L.; CANCIAN, N.; BOTTON, S.A.; OLIVEIRA, M., Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 16, p. 87-90, 1996.
- JOHNSON, R.; KANEENE, J.B. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis. *Veterinary Bulletin*, v. 62, p. 287-312, 1992.
- LEITE, R.C.; MODENA, C.M.; MOREIRA, E.C.; ABREU, J.J. Leucose enzoótica bovina em Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 1980, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza, 1980. p. 207.
- LUCAS, M.H. Enzootic bovine leukosis. In: OIE. *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. Paris, 1996. p. 276-280.
- MILLER, J.M.; MILLER, L.D.; OLSON, C.; GILLETE, 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.; SILVA A.O.A.; VALE, W.G. Ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos no Estado do Pará, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.19, n.1, p. 7-11, 1999.

- NIELSEN, K.H.; KELLY, L.; GALL, D.; NICOLETTI, P.; KELLY, W. Improved competitive enzyme immuno assay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 46. p. 285-291, 1995.
- OTACHEL-HAWRANEK, J. Erradication of enzootic leukaemia in dairy herds in the Wroclaw Region. *Veterinary Bulletin*, v. 67, n. 5, p. 2636, 1997.
- PARRISH, C.R.; OLIVER, R.E.; WEDDELL, W.; CORRIN, K.C. Bovine leukaemia virus infection in New Zealand cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 30, p. 56-58, 1982.
- ROMERO, C.H.; ZANOCCHI, H.G.; AGUIAR, A.A.; ABARACON, D.; SILVA, A.G.; ROWE, C.A. Experimental transmission of enzootic bovine leucosis virus with blood and milk in the tropics. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.2, p. 9-15, 1982.
- SANTOS, J.L.; FARIA, J.E.; RIBEIRO, M.F.B.; SALGADO, J.H.P. Epidemiologia da leucose enzoótica bovina no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos na zona da mata. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, v. 37, p. 359-368, 1985.
- SARGEANT, J.M.; KELTON, D.F.; MARTIN, S.W.; MANN, E.D. Associations between farm management practices, productivity and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 3/4, p. 211-221, 1997.
- SCHOEPF, K.C.; KAPAGA, A.M.; MSAMI, H.M.; HYERA, J.M.K. Serological evidence of the occurrence of enzootic bovine leukosis (EBL) virus infection in cattle in Tanzania. *Veterinary Bulletin*, v. 67 n. 8, p. 4642, 1997.
- TEKES, L. Influence of management technology and parturition on antibody levels in cows with bovine leucosis. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 42, p. 57-67, 1994.
- VILLOUT, G.; DURÁN, Y.; CÉSPED, W.; MONTES, G. Dinámica de la infección com el virus de la leucosis bovina en un predio lechero de Chile. *Archives of Medicine Veterinary*, v. 26, p. 2, 1994.

