

UTILIZAÇÃO DA IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAR (IDGA) NO CONTROLE DA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB)* **

Agar Gel Immunodiffusion Test for the Control of Bovine Leukosis
Virus Infection

Eduardo Furtado Flores***, Rudi Weiblen****, Neite Machado
Pereira*****, Jorge Augusto Brites Portolann*****, Carlos
de Moraes Sanchez***** e Marcos Reis Leal Soares*****

RESUMO

Amostras de sangue de vacas pertencentes a 20 rebanhos leiteiros da região de Santa Maria-RS foram coletadas em duas etapas, com intervalos médios de 90 dias, e testadas pela prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) com antígeno glicoprotéico (gp 51) para a detecção de anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB). Cento e vinte e seis amostras (27,2%) reagiram positivamente no primeiro teste, enquanto no segundo foram identificadas 155 (34,7%) amostras positivas. Todos os animais positivos no teste inicial que foram testados pela segunda vez mantiveram a soropositividade. Trinta e dois animais (6,9%) soroconverteram no período entre coletas e foram identificados como positivos no segundo teste. Os resultados demonstraram que em programas de controle da infecção pelo VLB se faz necessária a realização de um segundo teste de IDGA dois ou três meses após o teste inicial.

UNITERMOS: leucose bovina, controle, imunodifusão em ágar gel.

*Trabalho realizado com o apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE/UFSM) e CNPq.

**Extraído da dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS.

***Médico Veterinário, aluno do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. Bolsista da CAPES.

****Professor Adjunto dos Departamentos de Medicina Veterinária Preventiva e de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria. Pesquisador do CNPq.

*****Médico Veterinário. Bolsista de Aperfeiçoamento do CNPq.

*****Aluno do Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria. Bolsa de Iniciação Científica - CNPq.

*****Médico Veterinário.

SUMMARY

Serum samples from 20 dairy herds of the Santa Maria region were collected twice with a 90 days interval and tested with the agar gel immunodiffusion technic against bovine leukosis virus. One hundred and twenty six (27.2%) serum samples were positive at the first test and in the second 155 (34.7%). All animals that were positive at first test maintained the seropositivity. Thirty two cows (6.9%) that were seronegative at the first time had detectable antibody by AGID at the second test. For control programs of BLV infection it is necessary to use a second test of AGID two or three months as could be concluded in this trial.

KEY WORDS: bovine leukosis, control, agar gel immunodiffusion test.

INTRODUÇÃO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma enfermidade proliferativa do tecido linforreticular dos bovinos, caracterizada por uma linfocitose persistente (LP) de caráter benigno ou pelo desenvolvimento de tumores nos linfonodos e em outros órgãos. A sua forma tumoral, o linfossarcoma dos bovinos adultos, é uma enfermidade altamente fatal e constitui-se na principal neoplasia do gado leiteiro (SORENSEN, 21).

A etiologia da LEB tem sido atribuída a um agente viral (MILLER et alii, 15) denominado de Vírus da Leucose Bovina (VLB) provavelmente associado a uma certa predisposição genética (MARSHAK et alii, 14). Uma vez infectados, os bovinos permanecem portadores e são fontes de disseminação do vírus provavelmente por toda a sua vida (VAN DER MAATEN & MILLER, 23). A persistência da infecção deve-se à habilidade do VLB em incorporar o ácido nucléico ao genoma dos linfócitos (STOCK & FERRER, 22). A infecção pelo VLB é na maioria das vezes inaparente, pois apenas em torno de 30% dos animais infectados desenvolvem a LP, enquanto a ocorrência de linfossarcoma raramente excede a 5% dos animais (FERRER, 7).

A transmissão do VLB ocorre principalmente de forma horizontal, através do contato entre os animais (PIPER et alii, 18). Apenas em torno de 5 a 18% dos terneiros filhos de vacas positivas já nascem portadores do vírus (VAN DER MAATEN et alii, 25). A maioria dos animais adquire a infecção a partir dos dois anos, quando por questões de manejo passam a conviver com o rebanho adulto infectado (PIPER et alii, 18). A transmissão do VLB ocorre principalmente através de sangue contaminado (EVERMANN et alii, 6). Essa transmissão pode ocorrer através

de procedimentos propositais, como transfusões e premunicação (EVERMANN et alii, 5; ROMERO & ROWE, 20), ou acidentais, através de agulhas ou instrumentos cirúrgicos contaminados (EVERMANN et alii, 5), aplicadores de brincos (LUCAS et alii, 12), descornadores (DIGIACOMO et alii, 4) e de luvas sujas de sangue na palpação retal (HOPKINS et alii, 10). A transmissão através de insetos hematófagos tem sido considerada importante em regiões onde há uma alta infestação desses insetos (BECH-NIELSEN et alii, 1; BUXTON et alii, 3). Virtualmente, todos os bovinos infectados respondem imunologicamente ao VLB e a detecção dos anticorpos em animais com idade superior a seis meses é considerada como evidência da infecção (FERRER, 7). Segundo ROBERTS et alii (19), os anticorpos podem ser detectados no soro a partir da terceira ou quarta semana após a infecção.

A infecção pelo VLB é distribuída mundialmente e tem sido também identificada em várias regiões do Brasil (ROMERO & ROWE, 20; KANTEK et alii, 11; GOMES et alii, 9; FLORES et alii, 8). A difusão relativamente lenta da infecção entre a população susceptível e a existência de técnicas sorológicas eficazes na identificação dos animais infectados são fatores que favorecem e tornam viáveis programas de controle e erradicação da infecção (VAN DER MAATEN & MILLER, 24). A prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) com o antígeno glicoprotéico (gp 51) (MILLER & VAN DER MAATEN, 14) é a prova imunológica mais utilizada em inquéritos sorológicos e em programas de controle da infecção em todo o mundo, tendo sido adotada como o teste oficial de diagnóstico por órgãos sanitários de vários países (MILLER & VAN DER MAATEN, 17). Essa prova, no entanto, pode apresentar falhas em detectar títulos baixos de anticorpos, sobretudo em infecções recentes (FERRER, 7), mas também em vacas nas proximidades do parto (BEIER et alii, 2). Por isso, em programas de controle são necessários dois ou três testes, com intervalos não inferiores a dois meses, para a identificação de praticamente a totalidade dos animais infectados (FERRER, 7). VAN DER MAATEN & MILLER (24) relataram várias tentativas bem sucedidas de erradicação da infecção de rebanhos mediante a realização de testes sorológicos periódicos e a eliminação ou segregação dos reagentes. WILLES MITH et alii (26) relataram uma soroconversão média de 5,8% em animais de um rebanho que foram testados em intervalos de aproximadamente três meses. Já MAMMERICKX et alii (13) relataram a erradicação da infecção de rebanhos com índices moderados de positividade através de dois testes seguidos da eliminação dos positivos. Segundo EVERMANN et alii (6), além da eliminação dos reagentes identificados periodicamente, apenas animais de

rebanhos soronegativos devem ser introduzidos no rebanho. Medidas que minimizem a transmissão através de sangue contaminado também são fundamentais para o controle da infecção (EVERMANN et alii, 6).

O objetivo do presente trabalho foi determinar a soroconversão ocorrida nos intervalos considerados para avaliar a importância e a repercussão da realização de um segundo teste em programas de controle da infecção pelo VLB.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue de vacas pertencentes a 20 propriedades leiteiras da região de Santa Maria-RS foram coletadas em duas oportunidades, com intervalos que variaram entre dois e quatro meses. Quatrocentos e sessenta e três amostras foram coletadas na primeira oportunidade e 446 coletadas na segunda etapa. Por ocasião da segunda coleta foram considerados somente os animais que já haviam sido coletados na primeira vez, excluindo-se os animais anexados aos rebanhos nos intervalos das coletas. O sangue foi obtido dos vasos caudais através de agulhas acopladas a tubos de ensaio com vácuo contendo anticoagulante. O plasma foi obtido pela centrifugação dos tubos a 1500 rpm por 10 minutos e conservado a uma temperatura de -18°C até ser processado. As amostras de plasma foram submetidas à prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para a detecção de anticorpos contra a glicoproteína maior (gp 51) do envelope do VLB (MILLER & VAN DER MAATEN, 16), em técnica descrita com algumas modificações por FLORES et alii (8). O antígeno utilizado no experimento foi cedido pela EMBRAPA/CNPISA-Concórdia/SC e o soro controle positivo foi obtido de um animal identificado como reagente ao VLB através de identidade de reação da IDGA com um soro controle positivo obtido da República Federal da Alemanha.

RESULTADOS

Os resultados dos testes de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) com antígeno glicoprotéico (gp 51) realizados em duas oportunidades em vacas pertencentes a propriedades leiteiras da região de Santa Maria - RS estão descritos na Tabela 1.

A segunda coleta de material para os exames sorológicos, realizada em média 90 dias após, revelou 32 (6,9%) reagentes a mais em relação ao teste inicial. Em sete propriedades (A, B, D, G, J, K e P) nenhum animal tornou-se soropositivo no intervalo das coletas em outras sete propriedades (C, E, I, L, M, N e O) apenas um animal soroconverteu

TABELA 1 - Resultados dos testes de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) realizados em duas etapas em vacas de 20 rebanhos leiteiros da região de Santa Maria - RS.

Rebanho	Nº de animais	1ª coleta IDGA positiva Nº	2ª coleta IDGA positiva Nº	Soro-conversão		Intervalo entre as coletas (meses)
				Nº	%	
A	6	4	4	0	0,0	3
B	6	4	4	0	0,0	4
C	7	2	3	1	14,3	3
D	8	2	2	0	0,0	4
E	8	3	4	1	12,5	3
F	8	3	5	2	25,0	4
G	9	3	2*	0	0,0	3
H	12	3	5	2	16,7	4
I	12	8	9	1	8,3	4
J	13	4	4	0	0,0	4
K	14	3	3	0	0,0	4
L	16	2	3	1	6,3	3
M	17	2	3	1	5,9	4
N	21	2	3	1	4,8	3
O	24	7	8	1	4,2	2
P	28	5	5	0	0,0	3
Q	38	29	33**	5	12,2	4
R	45	14	20**	7	15,6	3
S	85	15	20	5	5,9	3
T	86	11	15	4	4,6	3
Total	463	126	155	32	6,9	-

*Um animal soropositivo morreu.

**Um animal soropositivo foi vendido.

em cada uma, nesse período. A propriedade que apresentou o maior percentual de soroconversão foi a F (25%), enquanto as propriedades R (7), S e Q (5) e T (4) foram as que apresentaram o maior número de animais que se tornaram positivos na segunda coleta. Todos os animais identificados como positivos no teste inicial mantiveram a positividade por ocasião da segundo exame.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O segundo teste sorológico, realizado em média 90 dias após, revelou 32 (6,9%) reagentes a mais em relação ao teste inicial. Por outro lado, todos os animais que foram positivos no primeiro teste e que foram coletados e testados pela segunda vez mantiveram a soropositividade. A persistência da infecção, caracterizada pela detecção dos

anticorpos (FERRER, 7), é devida à habilidade do VLB em incorporar seu RNA ao genoma dos linfócitos (STOCK & FERRER, 22).

O acréscimo de soropositivos foi semelhante aos índices de 5,8% relatados por WILLESMTIH et alii (26) com intervalos semelhantes aos do presente trabalho, aproximadamente de três meses. Devido à baixa infectiosidade do VLB, a sua difusão entre a população susceptível é relativamente lenta (VAN DER MAATEN & MILLER, 24) e depende muitas vezes da intervenção do homem. Essa intervenção ocorre através de procedimentos que proporcionam, propositada ou acidentalmente a transferência de sangue contaminado entre animais. Por isso a velocidade de difusão da infecção parece estar diretamente relacionada à presença e à interação desses meios iatrogênicos de transmissão. A alta soroconversão observada no rebanho Q (15,1%) pode ser explicada pela existência das condições propícias para a difusão do vírus (alta lotação de animais, presença efetiva dos meios iatrogênicos de transmissão e o grande número de animais infectados).

É provável que muitos dos 32 animais que soroconverteram tenham realmente adquirido a infecção no intervalo das coletas e sido então detectados por ocasião do segundo teste. O tempo de aparecimento de anticorpos detectáveis pela IDGA, de três a quatro semanas após a infecção (ROBERTS et alii, 19), é compatível com essa hipótese. É possível também que alguns desses animais já estivessem infectados por ocasião da primeira coleta de material. Nesse caso não teriam sido então detectados por possuírem títulos baixos de anticorpos, não detectáveis pela IDGA. Esses títulos baixos podem ser encontrados em infecções recentes (FERRER, 7) e em vacas nas proximidades do parto (BEIER et alii, 2). A falha em detectar esses animais representa uma séria restrição da utilização da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) em programas de controle da infecção pelo VLB. Mesmo que o número de animais já infectados que não são detectados pela IDGA seja pequeno, a permanência dos mesmos como supostamente negativos nos rebanhos representa um sério risco aos demais animais e compromete o sucesso dos programas de controle. Como o VLB é transmitido principalmente por contato (PIPER et alii, 18), a pronta remoção dos positivos constitui-se em medida fundamental para o controle da infecção nos rebanhos.

No presente trabalho não foi possível determinar quantos animais realmente foram infectados no intervalo entre as coletas e quantos já eram portadores do vírus e não foram detectados por ocasião do primeiro teste. Objetivamente deve-se observar que o segundo teste, realiza-

do em média três meses após, revelou 6,9% a mais de reagentes. Isto revela a importância da realização de mais de um teste de IDGA em programas de controle de infecção, conforme proposto por FERRER (7) e MAMMERICKX et alii (13).

Portanto, se para inquéritos sorológicos a realização de apenas um teste de IDGA traz resultados satisfatórios, para o controle e erradicação da infecção pelo VLB isto parece insuficiente devido aos possíveis falsos negativos. Para que a IDGA constitua-se em um método eficaz é necessário que se cubra as lacunas de sensibilidade do teste. Isto parecer ser satisfatoriamente conseguido pela realização de um segundo teste, dois a três meses após. Para o sucesso desses programas é indispensável também que os animais identificados como positivos sejam imediatamente removidos do rebanho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECH-NIELSEN, S.; PIPER, C.E. & FERRER, J.F. Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: Role of bloodsucking insects. *Am. J. Vet. Res.*, 9:1089-92, 1978.
2. BEIER, V.D.; BEIER, D.; EBERTUS, R.; ANDRES, A. Zum nachweis von leukoseantikörpern in blutserum und euterseret in geburstnahem seitraum - in beitrage zur diagnostik der enzootischen rinderleukose (eRL). *Mh. Vet. Med.* 40:557-69, 1985.
3. BUXTON, B.A.; HINKLE, N.C.; SCHULTZ, R.D. Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potencial for transmission by stable flies and tabanids. *Am. J. Vet. Res.*, 46:123-6, 1985.
4. DIGIACOMO, R.F.; DARLINGTON, R.L.; EVERMANN, J.F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy calves by dehorning *Canad. J. Comp. Med.* 49:340-2, 1985.
5. EVERMANN, J.F.; DIGIACOMO, R.F.; PARISH, S.M. Transmission of bovine leukosis virus by blood inoculation. *Am. J. Vet. Res.* 47:1885,87, 1986.
6. EVERMANN, J.F.; DIGIACOMO, R.F.; HOPKINS, S.G. Bovine leukosis virus: understanding viral transmission and the methods of control. *Vet. Med.* 18(10): 1051-58, 1987.
7. FERRER, J.F. Bovine leukosis: Natural mode of transmission and principles of control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 175(12):1281-6, 1979.
8. FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; PEREIRA, N.M.; PORTOLLAN, J.A.B.; CHIELLE, L.L. Prevalência de anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) no rebanho leiteiro de Santa Maria/RS. *Rev. Centro de Ciências Rurais*, Santa Maria, 18(1):67-73, 1988.
9. GOMES, M.; MOOJEN, V.; FERNANDES, J.C.T. & FERREIRO, L. Detecção de anticorpos séricos contra o vírus da Leucose Enzootica Bovina (VLEB) em bovinos do Estado do Rio Grande do Sul. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, 13:15-22, 1985.
10. HOPKINS, S.G.; EVERMANN, J.F.; DIGIACOMO, R.F.; FERRER, J.F.; SMITH, S.; BANGERT, R.L. Experimental transmission of bovine leukosis

- virus by simulated rectal palpation. *Vet. Rec.*, 122:389-90, 1988.
11. KANTEK, C.E.; KRUGER, E.R. & WELTE, J.R. Prevalência do vírus da leucose enzoótica-bovina no rebanho leiteiro do Paraná. *Pesq. Vet. Bras.*, 3(4):110-2, 1983.
 12. LUCAS, M.H.; ROBERTS, D.A.; WIBBERLEY, A. Ear tattooing as a method of spread of bovine leukosis virus infection. *Br. J. Vet.*, 141: 647-9, 1985.
 13. MAMMERICKX, M.; CORMANN, A.; BURNY, A. Erradication of enzootic bovine leukosis based in the detection of disease by the gp immunodiffusion test. *Ann. Rech. Vet.*, 9:885-94, 1978.
 14. MARSHAK, R.R.; ABT, D.A. & FERRER, J.F. Hematology in the diagnosis of bovine leukosis. In: BOVINE LEUKOSIS SYMPOSIUM, Maryland, May 22nd-23rd. *Proceedings...* College Park, USA, 1979. p.67-75.
 15. 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.*, 43:1297-305, 1969.
 16. MILLER, J.M. & VAN DER MAATEN, M.J. Use of glicoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur. J. Cancer.*, 13:1369-77, 1977.
 17. MILLER, J.M. & VAN DER MAATEN, M.J. Bovine leukosis-its importance to the dairy industry in the United States. *J. Dairy Sci.*, 65: 2194-2203, 1982.
 18. PIPER, C.E.; FERRER, J.F.; ABT, D.A. & MARSHAK, R.R. Postnatal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 62:165-8, 1979.
 19. ROBERTS, D.H.; LUCAS, M.H.; WIBBERLEY, G. & CHASEY, D. An investigation into the susceptibility of cattle to bovine leukosis virus following inoculation by various routes. *Vet. Rec.*, 110:222-4, 1982.
 20. ROMERO, C.H. & ROWE, C.A. Enzootic bovine leukosis in Brasil. *Trop. Anim. Health. Prod.*, 13:107-11, 1981.
 21. SORENSEN, D.K. Clinical manifestations of bovine leukosis. In: BOVINE LEUKOSIS SYMPOSIUM. Maryland, May 22rd-3rd. *Proceedings ...* College Park, Maryland, U.S.A. 1979. p.5-15.
 22. STOCK, N.D. & FERRER, J.F. Replicating C-type virus in phytohemagglutinin-treated buffy-coat cultures on bovine origin. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 48:985-96, 1972.
 23. VAN DER MAATEN, M.J. & MILLER, J.M. Susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection by various routes of exposure. In: *Advances in Comparative Leukemia Research*. Amsterdam, Elsevier/North Holland, U.S.A., 1977. p.118-23.
 24. VAN DER MAATEN, M.J. & MILLER, J.M. Appraisal of control measures for bovine leukosis. *J. Am. Vet. Res. Assoc.*, 175:1287-90, 1979.
 25. VAN DER MAATEN, M.J.; MILLER, J.M. & SCHMERR, M.J.F. In utero transmission of bovine leukemia virus. *Am. Vet. Res.*, 42(6): 1052-4, 1981.
 26. WILLESMTIH, J.; STRAUB, O. & LORENZ, R. Some observations on the epidemiology of bovine leukosis virus infection in a large dairy herd. *Res. Vet. Sci.*, 28:10-16, 1980.