

**EFICÁCIA DA CHAVE LINFOCITÁRIA DE BENDIXEN EM RELAÇÃO À
IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR (IDGA) NO DIAGNÓSTICO DA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB).*, ****

Efficacy of Bendixen's key in relation to agar gel
immunodiffusion (AGID) in the diagnosis of bovine
leukosis of virus (BLV) infection.

Eduardo Furtado Flores***; Rudi Weiblen****;
Sônia Terezinha dos Anjos Lopes*****;
Tatiana Lima Moreira*****

RESUMO

Com o objetivo de comparar os métodos sorológico e hematológico de diagnóstico da infecção pelo vírus da Leucose Bovina (VLB), amostras de sangue de vacas leiteiras pertencentes à rebanhos leiteiros da região de Santa Maria, RS, foram coletadas três vezes com intervalos que variam de 26 a 66 dias. As amostras de sangue foram submetidas à contagem eletrônica e diferencial para a determinação do número de linfócitos/mm³ e sobrepostos à chave hematológica de Bendixen. As amostras de plasma foram testadas pela prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para a detecção de anticorpos contra o VLB. De 157 animais identificados como positivos pela IDGA, 93 (59,8%) foram positivos, 53 (33,7%) suspeitos e 11 (7,0%) negativos pelo método hematológico. Dos 303 animais soronegativos, 61 (20,1%) também foram negativos; 161 (53,1%) suspeitos e 81 (26,7%) positivos pela chave de Bendixen. A técnica de IDGA demonstrou sensibilidade e especificidade superiores à chave hematológica de Bendixen, sendo a mais indicada para o diagnóstico e em programas de controle da infecção pelo VLB. Pelos resultados obtidos, o método hematológico possui pouco valor no diagnóstico da infecção pelo VLB.

UNITERMOS: Leucose Bovina, imunodifusão, chave hematológica, diagnóstico.

SUMMARY

With the objective to compare the serological and hematological methods

-
- * Realizado com o apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) da Universidade Federal de Santa Maria e CNPq.
 - ** Extraído da Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Santa Maria.
 - *** Professor Assistente do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria.
 - **** Médico Veterinário, Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria, RS. 97119. Pesquisador do CNPq.
 - ***** Médico Veterinário, Hospital de Clínicas Veterinárias. Universidade Federal de Santa Maria, RS. 97119.
 - ***** Aluno do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. Bolsa de Jovem Pesquisador, FAPERGS.

for diagnosis of Bovine Leukosis Virus (BLV) infection, blood samples from dairy cows of the Santa Maria region, RS, were collected three times with 26 to 66 days interval. Blood samples were submitted to electronic and differential examination for determination of absolute lymphocyte count and compared with Bendixen's Key. Plasma samples were tested by agar gel immunodiffusion test (AGID) for BLV antibodies. From 157 seropositive cows by AGID, 93 (59.2%) were positive, 53 (33.7%) suspect and 11 (7.0%) negative according to Bendixen's Key. From 303 seronegative cows, 61 (20.1%) were negative; 161 (53.1%) suspect and 81 (26.7%) positive by hematologic method. The AGID showed more sensibility and specificity than Bendixen's Key and it's the method of choice for diagnosis and control measures of BLV infection. According to results obtained the hematological criterion has little value on BLV infection diagnosis.

KEY WORDS: Bovine Leukosis, immunodiffusion, hematologic key, diagnosis.

INTRODUÇÃO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma enfermidade proliferativa do sistema linforreticular dos bovinos caracterizada por uma linfocitose persistente (LP) ou pelo desenvolvimento de tumores nos linfonodos e em outros órgãos. A sua forma tumoral, o linfossarcoma multicêntrico dos animais adultos, é uma enfermidade altamente fatal e constituiu-se na neoplasia mais comum dos bovinos (SORENSEN, 11). A etiologia da LEB é atribuída a um oncovírus RNA (MILLER et al., 7) da família RETROVIRIDAE, denominado de vírus da Leucose Bovina (VLB). Durante muitos anos, antes da determinação da etiologia, a LP era considerada um estágio pré-clínico do linfossarcoma e utilizada como um indicativo para o seu diagnóstico. Para isso, foram elaboradas TABELAS com os valores linfocitários normais para cada faixa etária com a finalidade de se detectar os animais com linfocitose. A TABELA mais conhecida foi a de Bendixen (BENDIXEN, 1), utilizada em programas de controle da enfermidade em diversos países no final da década de 50, na década de 60 até meados dos anos 70.

A partir da determinação do VLB como o agente etiológico da LEB, várias técnicas virológicas e sorológicas foram desenvolvidas para a identificação dos animais infectados. Como virtualmente todos os bovinos infectados desenvolvem anticorpos contra o VLB e ficam portadores por um tempo indeterminado, a detecção desses anticorpos é considerada evidência da infecção (FERREZ, 2). A técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), que detecta anticorpos contra a glicoproteína maior do VLB (MILLER & VAN DER MAATEN, 8) passou a ser a prova sorológica mais utilizada em todo o mundo, tendo sido adotada como o teste oficial de diagnóstico da LEB por órgãos oficiais de vários países.

O desenvolvimento dessa técnicas tornou possível o estudo detalhado da infecção e de suas manifestações clínicas. Vários estudos demonstraram que a LP não era uma manifestação constante da infecção e nem uma forma

pré-clínica do linfossarcoma (FERRER et al., 3). O desenvolvimento da LP ou do linfossarcoma frente à infecção parece ter influência genética (MARSHAK et al., 6). Além da LP ser uma manifestação inconstante, muitas vezes ocorre somente tardiamente no curso da infecção (RESSANG et al., 9). Essas observações colocaram em dúvida a validade das chaves linfocitárias para a identificação dos animais infectados pelo VLB.

Entretanto, devido à dificuldade de produção do antígeno glicoprotéico para a IDGA em escala mundial e aos altos custos de importação, alguns diagnósticos continuam sendo feitos pelo método hematológico. Por outro lado, as chaves linfocitárias foram elaboradas com base em valores linfocitários de bovinos do continente europeu, não tendo necessariamente o mesmo valor prático quando usadas em bovinos nas condições do Brasil. Esses bovinos estão expostos à fatores mesológicos e patológicos diferentes que podem influenciar nos valores hemáticos (FERREIRA et al., 4).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade da chave linfocitária de Bendixen em relação à IDGA na identificação de bovinos portadores do VLB em condições subtropicais e sujeitos aos fatores ambientais locais.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sangue com anticoagulante foram coletadas de vacas com idade superior a três anos pertencentes à 20 rebanhos leiteiros da região de Santa Maria, RS, em três etapas, com intervalos de 26 a 66 dias. Na primeira e terceira coleta foi obtido o plasma e submetido à prova de imunodifusão de gel de ágar (IDGA), com antígeno glicoprotéico (MILLER & VAN DER MAATEN, 8), com algumas modificações descritas por FLORES et al. (5). As amostras de sangue obtidas nas três coletas foram submetidas à contagem eletrônica de leucócitos em um aparelho Coulter Counter (Coulter Electronics, Rio de Janeiro - RJ.) e diferencial para a determinação do número absoluto de linfócitos/mm³. Para isso foram preparados esfregaços, corados pela técnica de MAY GRÜNWARD e analisados em objetiva de imersão (1000 X) segundo recomendações de SCHALM et al. (10).

Foram considerados positivos no método hematológico os animais que apresentaram pelo menos duas contagens linfocitárias acima dos limites estabelecidos para a sua faixa etária pela "chave de Bendixen". Para verificar a associação entre a IDGA e o método hematológico, os resultados foram submetidos ao teste do Qui quadrado.

Chave de Bendixen para classificar bovinos com linfocitose persistente (BENDIXEN, 1).

| Idade (anos) | Contagem linfocitária absoluta por mm ³ de sangue | | |
|--------------|--|-----------------|----------|
| | Negativo | Suspeito | Positivo |
| 0 - 1 | < 10.000 | 10.000 - 12.000 | > 12.000 |
| 1 - 2 | < 9.000 | 9.000 - 11.000 | > 11.000 |
| 2 - 3 | < 7.500 | 7.500 - 9.500 | > 9.500 |
| 3 - 4 | < 6.500 | 6.500 - 8.500 | > 8.500 |
| > 4 | < 5.000 | 5.000 - 7.000 | > 7.000 |

RESULTADOS

Os valores linfocitários dos animais soronegativos ao VLB com idade entre três e quatro anos atingiram a média de 8.007 linfócitos/mm³ (4.094-12.628), enquanto nos soropositivos esse valor foi de 9.994/mm³ (6.960-16.302). Nos animais soronegativos com idade superior a quatro anos a média foi de 6.988 linfócitos/mm³ (1.811-14.925), enquanto nos animais soropositivos dessa faixa etária a média foi de 10.105 linfócitos/mm³ (3.996-33.995).

Na Tabela 1 estão os resultados dos testes sorológicos e hematológicos realizados em vacas pertencentes à rebanhos leiteiros da região de Santa Maria, RS.

Dos 157 animais diagnosticados como positivos ao VLB pela IDGA, 93 (59,2%) também foram positivos, 53 (33,7%) suspeitos e 11 (7,0%) negativos pela chave de Bendixen. Dos 303 animais soronegativos, 61 (20,1%) também foram negativos; 161 (53,1%) suspeitos e 81 (26,7%) positivos pela técnica hematológica.

TABELA 1 - Comparação entre a técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e a chave hematológica de Bendixen no diagnóstico da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB) em vacas pertencentes a rebanhos leiteiros da região de Santa Maria - RS.

| IDGA | Chave de Bendixen | | | | | | Total |
|-----------|-------------------|------|-----------|------|-----------|------|-------|
| | Positivos | | Suspeitos | | Negativos | | |
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | |
| Positivos | 93 | 59,8 | 53 | 33,7 | 11 | 7,0 | 157 |
| Negativos | 81 | 26,7 | 161 | 53,1 | 61 | 20,1 | 303 |
| Total | 174 | 37,8 | 214 | 46,5 | 72 | 15,6 | 460 |

(p < 0,01).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A comparação entre os métodos de diagnóstico da infecção pelo VLB demonstrou a superioridade da IDGA em relação à chave de Bendixen. O método hematológico detectou apenas 93(59,2%) dos animais identificados como positivos ao VLB pela técnica sorológica, sendo outros 53(33,7%) considerados suspeitos. Isso permite concluir que entre negativos e suspeitos, a hematologia falhou em detectar 40,1% dos animais portadores do vírus. Esses "falsos nega-

tivos" representam a maior restrição à utilização das contagens linfocitárias no diagnóstico da infecção para fins de comercialização e em programas de controle e erradicação. A baixa sensibilidade do método hematológico deve-se ao fato da LP não ser uma manifestação constante da infecção (FERRER et al., 3), manifestar-se muitas vezes tardiamente no seu curso (RESSANG et al., 9) e ser influenciada também por fatores genéticos (MARSHAK et al., 6).

Outra importante restrição à utilização da hematologia no diagnóstico da infecção pelo VLB são os "falsos positivos" identificados por esse método em relação à sorologia. Dos 303 animais sorologicamente negativos pela IDGA, 81(26,7%) foram positivos e 161(53,1%) suspeitos pela chave de Bendixen. Quadros de linfocitose persistente não são específicos da infecção pelo VLB, podendo ser encontrados em uma diversidade de afecções, como infecções ou inflamações crônicas, protozooses, etc... As chaves linfocitárias foram elaboradas com base em valores hematológicos de bovinos no continente europeu, que não estão expostos a certos fatores mesológicos e patológicos presentes em regiões subtropicais. Esses fatores podem induzir a respostas linfocitárias complexas que podem ser erroneamente interpretadas como sendo devidas à infecção pelo VLB (FERREIRA et al., 4). A elaboração de uma TABELA linfocitária adaptada às condições locais esbarra na dificuldade de se indentificar e excluir da população estudada as outras causas de linfocitose.

Além disso, a IDGA permite a obtenção dos resultados com 24, 48 ou no máximo 72 horas de incubação, enquanto a caracterização da LP exige no mínimo dois exames com intervalos não inferiores a dois meses. Diagnósticos hematológicos feitos com base em um único exame estão sujeitos a um erro ainda maior, pois além das outras causas de linfocitose persistente, podem detectar elevações transitórias do número absoluto de linfócitos.

Por essas considerações, os métodos de contagens linfocitárias possuem pouco ou nenhum valor na identificação de animais infectados pelo VLB com vistas à seleção para a comercialização e em programas de controle e erradicação. Os exames hematológicos podem constituir-se, isto sim, em um meio auxiliar no estudo da enfermidade, sobretudo quando a doença clínica já está presente no animal.

Nesse sentido, a IDGA constitui-se no método mais indicado para estudos soro-epidemiológicos e em programas de controle da infecção pelo VLB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENDIXEN, H.J. Undersogelser over kvaegets leukose: III Om Kontrollen med leukosebesaetninger ved haematologiske undersogelsmetader. *Nord. Vet. Med.*, vol.11, p.733-8, 1959.
2. FERRER, J.F. Bovine loukosis: Natural mode of transmission an principles of control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol.175, n. 12, p.1281-6, 1979.
3. FERRER, J.F.; MARSHAK, R.R.; ABT, D.A. & KENYON, S.J. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol.175, n. 7, p.705-8, 1979.
4. FERREIRA, M.I.C.; ROMERO, C.H. & ROWE, C.A. Contagem Linfocitária e Anticorpos Contra o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina em Rebanhos do Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.*, vol. 2, n. 3, p.99-104, 1982.

5. 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, vol. 18, p.167-73, 1988.
6. MARSHAK, R.R.; ABT, D.A. & FERRER, J.F. Hematology in the diagnosis of bovine leukosis. In: *BOVINE LEUKOSIS SYMPOSIUM*. College Park, Maryland, May 22nd-23rd. *Proceedings..* 1979. p.111-7.
7. 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.*, vol.43, p.1297-305, 1969.
8. MILLER, J.M. & VAN DER MAATEN, M.J. Use of glicoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur. J. Cancer*, vol. 13, p.1369-77, 1977.
9. RESSANG, A.A.; ELLENS, D.J.; MASTENBROEK, N.; QUAK, J.; MILLER, J.M. & VAN DER MAATEN, M.J. Studies on Bovine Leukaemia. II - Haematological, Serological and Electron Microscopical diagnosis. *Zbl. Vet. Med.* vol. 23, p.566-79, 1976.
10. SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. *Veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975. 807p.
11. SORENSEN, D.K. Clinical manifestations of bovine leukosis. In: *BOVINE LEUKOSIS SYMPOSIUM*. Maryland, U.S.A., 1979. p.5-84.