

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**GESTÃO SANITÁRIA DO ABORTAMENTO BOVINO: VÍRUS DA
LEUCEMIA BOVINA COMO AGENTE CAUSAL**

Kelly Cristina Santos Montanari

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal

Orientador: Profa. Dra. Claudia Del Fava

SÃO PAULO

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Montanari, Kelly Cristina Santos.

Gestão sanitária do abortamento bovino: vírus da leucemia bovina como agente causal. / Kelly Cristina Santos Montanari.

-- São Paulo, 2013.

105 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: **Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio**

Linha de pesquisa: Gestão sanitária e ambiental na produção animal.

Orientador: Claudia Del Fava.

Versão do título para o inglês: Surveillance of bovine abortion: bovine leukemia virus as casual agent.

1. VLB 2. Fetos bovinos 3. Histopatologia 4. Nested-PCR 5. Filogenia I. Montanari, Kelly Cristina Santos

II. Del Fava, Claudia III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2013/012



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS
AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo – SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: KELLY CRISTINA SANTOS MONTANARI

Título: GESTÃO SANITÁRIA DO ABORTAMENTO BOVINO: VIRUS DA LEUCEMIA BOVINA COMO AGENTE CAUSAL.

Orientadora: Profa. Dra. CLAUDIA DEL FAVA

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:
Profa. Dra. Claudia Del Fava
Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:
Profa. Dra. Rosa Maria Piatti
Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:
Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Dedico este trabalho a Deus que me deu forças, ao meu marido Guilherme e filha linda Pietrinha pela paciência e a os meus pais e irmão que sempre me apoiaram e incentivaram.

Agradecimentos

À Deus pela força, providência e fidelidade.

Ao meu esposo Guilherme pelo amor, amizade, paciência e por acreditar sempre em mim.

À minha amada mãe por ser meu chão e meu exemplo de vida e ao meu pai e irmão por fazer o meu papel quando tantas vezes me ausentei da presença da minha filha.

À Dra. Claudia Del Fava pela orientação, carinho e paciência e confiança. Foi quem me ensinou como amiga e professora. Jamais esquecerei tantas vezes que foi até mim quando eu mais precisei em minha licença maternidade. Obrigada por ser como uma leoa protegendo seu filhote.

Aos meus sogros por cuidar da minha filha quando precisei me ausentar.

À minha família (tios e primos) por torcer pela minha vitória sempre e pelas palavras de incentivo. À prima Gabi pelos telefonemas e mega incentivo.

Aos colegas de pós-graduação pela amizade e carinho. Em especial a Marcinha Mayumi pela paciência.

Minhas amigas irmãs Luciana Bonadio, Gisele Queirolo e Marianna Basilio por todo apoio e carinho.

As meninas do Laboratório de Anatomia Patológica: Dra. Claudia, Alessandra, Lili, Aline, Ariane e Nayra pela amizade e boas risadas. Também do Laboratório de Víruses de Bovídeos que me ajudaram na realização do trabalho experimental, em especial a Marcia, Líria e Dra. Maristela Pituco, e à Dra. Alice Ikuno do Laboratório de Imunologia.

Aos meus queridos professores pela ajuda ao desenvolvimento do senso crítico e grandes ensinamentos, em especial Simone Miyashiro, Camila Maltos Romano, Ricardo Harakava, Rosa Piatti, Lilia Paulin, Eliana S. Pinheiro, Ricardo Jordão e Mario Sato.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto Auxílio à Pesquisa n. 2012/01033-7 e bolsa de Capacitação Técnica TT-3.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que torceram pela minha vitória.

RESUMO

MONTANARI, K. C. S. – GESTÃO SANITÁRIA DO ABORTAMENTO BOVINO: VÍRUS DA LEUCEMIA BOVINA COMO AGENTE CAUSAL. São Paulo. 2013. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

O vírus da Leucemia Bovina (VLB) está disseminado nos rebanhos brasileiros podendo causar sororeatividade, linfocitose persistente e raramente linfossarcoma em bovinos. Apesar de comprovada transmissão transplacentária do VLB, não existem trabalhos pesquisando o agente como causa de abortamento. O presente estudo avaliou a ocorrência do VLB em fetos bovinos abortados e identificação dos genótipos virais, a fim de contribuir com o diagnóstico diferencial causal. Foram analisados 80 fetos bovinos provenientes de diversas regiões brasileiras, encaminhados ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico no período de dezembro/2007 a outubro/2012, para diagnóstico diferencial de causas de abortamento. Amostras em tecidos parafinados de timo, baço, linfonodos, pulmão, coração, fígado, rim, adrenal, medula espinhal, cérebro e placenta foram submetidas à análise histológica utilizando coloração Hematoxilina-Eosina (HE); os líquidos torácico e abdominal foram submetidos ao teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-VLB; frações congeladas de timo, baço, linfonodo, placenta e líquidos tóraco-abdominal foram submetidas à *nested*-PCR para o VLB usando *primers* oriundos do gene *env* (gp51). Nenhum feto foi positivo para o teste de ELISA e 16,25% (13/80) foram positivos à *nested*-PCR. Foi possível fazer o sequenciamento em oito amostras e a análise filogenética revelou os genótipos 1, 5 e 6 do VLB, frequentes em rebanhos bovinos no Brasil, Argentina e Uruguai. Apesar de a amostragem ter sido de conveniência, o VLB foi identificado com maior frequência em fetos abortados nos Estados de São Paulo – 53,85% (7/13) e Minas Gerais – 30,77% (4/13), principalmente no último trimestre da gestação. O timo e o baço foram os órgãos em que mais se detectou o VLB. Em todos os fetos positivos e negativos na *nested*-PCR foram observadas alterações histopatológicas de infiltrado inflamatório mononuclear, indicando um possível abortamento infeccioso. Entre os 13 fetos positivos para o VLB foi observado o mesmo índice de co-infecção 7,69% (1) para *Arcanobacterium pyogenes*, *Klebsiella* e *Streptococcus* spp., isolados em cultura pura. Nos 67 fetos negativos ao VLB e que apresentaram lesões inflamatórias em pelo menos um órgão na histopatologia foram detectados *Arcanobacterium pyogenes* - 1,49% (1), *Brucella abortus* - 1,49% (1), *Neospora caninum* 5,97% (4), BVDV - 4,48% (3), *Escherichia coli* - 2,98% (2), *Staphylococcus aureus* - 1,49% (1) e zero para *Leptospira* spp. e BoHV-1. Pode-se concluir que a transmissão transplacentária do VLB ocorre em um nível considerável nos rebanhos brasileiros, porém mais estudos são necessários a fim de verificar a importância do VLB com agente causal de abortamento bovino, associado ou não a outros patógenos.

Palavras-chave: VLB, fetos bovinos, histopatologia, *nested*-PCR, sequenciamento e filogenia.

ABSTRACT

MONTANARI, K.C.S. - SURVEILLANCE OF BOVINE ABORTION: BOVINE LEUKEMIA VIRUS AS CASUAL AGENT. São Paulo. 2013. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

Bovine leukemia virus (BLV) is widespread in Brazilian herds, and causes seroreactivity, persistent lymphocytosis and rarely lymphosarcoma in bovine. The transplacental transmission of BLV occurs, but no studies have evaluated this virus as a causal agent of abortion. The present study evaluated the occurrence of BLV in aborted bovine fetuses and the identification of viral genotypes, in order to contribute to the differential diagnosis. A total of 80 aborted bovine fetuses were analyzed, they were sent from different Brazilian regions to the Center for Research and Development Institute for Animal Biology in the period December 2007 to October/2012 for differential diagnosis of abortion. Tissue samples (thymus, spleen, lymph nodes, lung, heart, liver, kidney, adrenal gland, brain and placenta) were submitted to histological analysis and stained by hematoxylin-eosin (HE); the thoracic and abdominal fluid were tested by ELISA for anti-BLV antibodies; frozen fractions of thymus, spleen, lymph nodes, placenta, thoracic and abdominal fluid were submitted to nested-PCR using primers for the BLV env gene from (gp51). No fetuses were positive for ELISA BLV and 16.25% (13/80) were positive for nested-PCR. Only the PCR product of eight samples was sequenced and phylogenetic analysis phylogenetic analysis revealed genotypes 1, 5 and 6 of BLV frequently found in cattle in Brazil, Argentina and Uruguay. Although the samples analyzed were a convenience one, the BLV was identified more frequently in aborted fetuses from the state of São Paulo – 53.85% (7/13) and Minas Gerais – 30.77% (4/13), mainly in the last trimester of pregnancy. Thymus and spleen were the organs mostly positive to BLV. In all BLV positive and negative fetus, the histopathology revealed in one or more organs lesions of infectious process characterized by inflammatory mononuclear infiltrate, indicating infectious abortion. Among the 13 BLV positive fetuses, it was identified the same rate of co-infection - 7.69% (1) for *Arcanobacterium pyogenes*, *Klebsiella*, and *Streptococcus* spp., that were isolated in pure culture. In the 67 BLV negative fetuses, and that presented inflammatory lesions at least in one organ it was identified infection by *Arcanobacterium pyogenes* - 1.49% (1), *Brucella abortus* - 1.49% (1), *Neospora caninum* - 5.97% (4), BVDV - 4.48% (3), *Escherichia coli* - 2.98% (2), *Staphylococcus aureus* - 1.49% (1), and zero for *Leptospira* spp. and BoHV-1. It was concluded that the BLV transplacental transmission occurs in a considerable level in the Brazilian herds, but more studies are necessary in order to understand the role of BLV as a causative agent of bovine abortion, associated or not to other pathogens.

Key-Words: BLV; bovine fetuses; nested-PCR, sequencing and phylogeny.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Diagnóstico diferencial de outros patógenos identificados nas amostras fetais positivas e negativas para VLB (São Paulo, 2013).	36
Tabela 2	- Positividade de órgãos do sistema linfático e líquido tóraco-abdominal para a <i>nested</i> -PCR (São Paulo, 2013).....	38
Tabela 3	- Feto positivo à <i>nested</i> -PCR para VLB considerando os órgãos positivos (São Paulo, 2013).....	39
Tabela 4	- Frequência de alterações histopatológicas observadas nos órgãos linfóides de fetos positivos e negativos ao VLB pela <i>nested</i> -PCR (São Paulo, 2013).....	41
Tabela 5	- Frequência de alterações histopatológicas observadas no fígado, pulmão, coração, adrenal, rim e cérebro de fetos positivos e negativos ao VLB pela <i>nested</i> -PCR (São Paulo, 2013).....	42
Tabela 6	- Resultado da <i>nested</i> -PCR associado à presença ou ausência de lesões histopatológicas (São Paulo, 2013).....	43
Tabela 7	- Correlação entre o resultado positivo e negativo a <i>nested</i> -PCR, presença ou ausência de lesões e diferentes aptidões zootécnicas (São Paulo, 2013).....	43
Tabela 8	- Correlação entre o resultado positivo e negativo à <i>nested</i> -PCR, presença ou ausência de lesões e diferentes faixas etárias (São Paulo, 2013).....	44
Tabela 9	- Distribuição de fetos abortados positivos ao VLB pela <i>nested</i> -PCR quanto aos Estados de origem da amostra (São Paulo, 2013).....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Representação de um retrovírus. Legenda: SU (superfície), TM (transmembrana), MA (matriz), IN (integrase), NC (núcleocapsídeo), CA (capsídeo), PR (protease), RT (transcriptase reversa). Fonte: CONFIN et al. (1997).....	8
Figura 2	- Estrutura de um provírus do VLB. Representação dos genes estruturais “gag, env e pol”, RNA transcritos e proteínas codificadas. Fonte: GILLET et al. (2007).....	9
Figura 3	- Replicação do retrovírus. Estágio inicial e posterior da replicação viral e interferência de fatores celulares indicados por Lv1/Ref1, CEM15, também conhecido como APOBEC3G (<i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like-3G</i>), FV2 e FV1. Os pontos de interrogação indicam que a etapa exata afetada pelos fatores de restrição não foram precisamente determinados. Lv1 e Ref1 são as partículas no bloco de entrada antes da transcrição reversa enquanto FV1 FV2 agem em estágio entre transcrição reversa e incorporação ao genoma. Fonte: NISOLE; SAIB (2004).....	10
Figura 4	- Análise externa do feto quanto a sexo, idade, e possíveis lesões..	23
Figura 5	- Coleta de cérebro.....	23
Figura 6	- Coleta de linfonodo.....	23
Figura 7	- Pele rebatida do gradil costal e abdômen para a análise do subcutâneo.....	23
Figura 8	- Abertura das cavidades torácica e abdominal.....	23
Figura 9	- Coleta dos líquidos torácico e abdominal.....	23
Figura 10	- Coleta de timo, coração e pulmão.....	24
Figura 11	- Coleta de fígado.....	24

Figura 12	- Coleta de baço.....	24
Figura 13	- Coleta de adrenal e rim.....	24
Figura 14	- Coleta de conteúdo gástrico.....	24
Figura 15	- Imagem de gel de agarose, representativa de amostras de tecidos fetais submetidas à <i>nested</i> -PCR linhas 1-4. Controle positivo VLB+ (linhagem celular <i>Fetal Lamb Kidney</i> sabidamente infectada com VLB) e Controle negativo VLB- (células VERO negativas ao VLB) e M (marcado de peso molecular 100pb); C- controle negativo (água ultrapura).....	37
Figura 16	Moderada reação de polpa branca esplênica. Baço fetal bovino, positivo para o VLB, com acúmulo de células inflamatórias mononucleares (linfócitos B) em volta da arteríola central esplênica (São Paulo, 2013).....	40
Figura 17	- Hiperplasia linfóide tímica. Timo fetal bovino positivo para VLB com aparente reação de hiperplasia (São Paulo, 2013).....	40
Figura 18	- Timo fetal bovino negativo para VLB sem hiperplasia (São Paulo, 2013).....	40
Figura 19	- Hiperplasia linfóide ganglionar. Linfonodo Fetal Bovino positivo para o VLB, com hiperplasia cortical caracterizando processo infeccioso (São Paulo, 2013).....	41
Figura 20	- Linfonodo Fetal Bovino, negativo para o VLB, sem hiperplasia linfóide (São Paulo, 2013).....	41
Figura 21	- Alinhamento de 8 fragmentos parciais de 356 nucleotídeos do gene <i>env</i> (<i>gp51</i>) do VLB geradas no presente estudo com outras 17 sequências selecionadas no <i>GenBank</i> já publicados até o momento e sete sequências de isolados brasileiros ainda não publicados do Instituto biológico (VLB 05 a 11) representando os genótipos 1, 5 e 6 (São Paulo, 2013).....	46 a 48
Figura 22	Aminoácidos traduzidos a partir das sequências obtidas neste estudo, recuperadas do <i>Genbank</i> e isolados brasileiros (não publicados) (São Paulo, 2013).....	49
Figura 23	Árvore filogenética desenvolvida através do método de Máxima verossimilhança (Software Mega v. 5). Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de <i>bootstrap</i> (São Paulo, 2013).	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Estados brasileiros com ocorrência do VLB, segundo o autor, ano, técnica laboratorial e aptidão zootécnica. Adaptado de Del Fava e Pituco (2004).....	11
Quadro 2	- Ocorrência do VLB segundo o autor, ano, país, técnica laboratorial e aptidão zootécnica.....	13
Quadro 3	- <i>Primers</i> usados na PCR para diagnóstico do BLV (BEIER et al., 2001).....	28
Quadro 4	- Primeira amplificação para o VLB seguindo protocolo de Beier et al. (2001).....	29
Quadro 5	- Segunda amplificação para o VLB seguindo protocolo de Beier et al. (2001).....	29
Quadro 6	- Sequências do VLB recuperadas do <i>GenBank</i> utilizadas para a realização da genealogia, dispondo o número de acesso, país de origem do estudo e o genótipo determinado (CAMARGOS et al. 2002; CAMARGOS et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2009; MORATÓRIO et al., 2010.; D`ANGELINO et al., 2011).....	31
Quadro 7	- Protocolo de desidratação, diafanização e embebição por parafina de órgãos fetais modificado de Prophet et al. (1992).....	32
Quadro 8	- Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização de lâminas de vidro com fragmentos de tecidos cortados em micrótomo, modificado de Prophet et al. (1992).....	33
Quadro 9	- Interpretação dos valores de DO em % das amostras individuais submetidas ao ELISA CHEKIT Leucose serum da Idexx.....	35
Quadro 10	- Sequências geradas neste estudo com similaridade nucleotídica máxima e mínima, quando comparadas entre si e frente às recuperadas no <i>GenBank</i> e isolados brasileiros (não publicados) (São Paulo, 2013).....	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	-	Frequência de alterações histopatológicas observadas nos órgãos linfóides de fetos positivos e negativos ao VLB pela <i>nested</i> -PCR (São Paulo, 2013).....	41
Gráfico 2	-	Frequência de alterações histopatológicas observadas no fígado, pulmão, coração, adrenal, rim e cérebro de fetos positivos e negativos ao VLB pela <i>nested</i> -PCR (São Paulo, 2013).....	42
Gráfico 3	-	Correlação entre o resultado positivo e negativo a <i>nested</i> -PCR, presença ou ausência de lesões e diferentes aptidões zootécnicas (São Paulo, 2013).....	44
Gráfico 4	-	Demonstrativo da idade dos fetos positivos e negativos para VLB pela <i>nested</i> -PCR segundo presença ou ausência de alterações histopatológicas (São Paulo, 2013).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

% = por cento

aa = aminoácidos

CPDSA = Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal

BoHV = Herpesvírus Bovino

BVDV = Vírus da Diarréia Viral Bovina

DNA = ácido desoxirribonucleico

dNTP = deoxinucleosídeo-trifosfato

DO = densidade óptica

ELISA = *Enzyme-linked immunosorbent assay*

et al. = e colaboradores

FLK = *Fetal Lamb Kidney*

g = grama

gp = glicoproteína

HE = Hematoxilina-Eosina

IC = Intervalo de Confiança

IDGA = Imunodifusão em Gel de Ágar

LAP = Laboratório de Anatomia Patológica

LB = Leucose Bovina

LP = Linfocitose Persistente

LTR = *Long Terminal Repeats*

LVB = Laboratório de Viroses de Bovídeos

M = Molar

MAPA = Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

min = minuto de hora

mL = mililitro

mM = milimolar

mRNA = RNA mensageiro

NCBI= *National Center for Biotechnology*

ng = nanograma

NI = não informado

nm = nanômetro

nt = nucleotídeo

NSP = proteína não estrutural

°C = graus Celsius

pb = pares de bases

OIE= office international des epizooties

PBMC= in-vitro cultivation of peripheral blood mononuclear cells

PCR = reação em cadeia pela polimerase

pH = potencial hidrogeniônico

pmol = picomoles

PNCEBT= Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
Animal

RIA = Radioimunoensaio

RNA = ácido ribonucleico

RPB- Reação de polpa branca

rpm = rotações por minuto

RT-PCR = reação em cadeia pela polimerase precedida por transcrição reversa

SEQ. = Sequência

SNC = Sistema Nervoso Central

sRNA = RNA fita simples

TMB= 3, 3',5, 5' tetrametilbenzidina

VERO = células de rim de macaco verde

VLB = Vírus da Leucemia Bovina

µg = micrograma

µL = microlitro

µm = micrômetro

µM = micromolar

UV= Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	li
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE QUADROS	vi
LISTA DE GRÁFICOS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
SUMÁRIO	X
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	06
2.1 INTRODUÇÃO À LEUCOSE BOVINA (LB).....	06
2.2 HISTÓRICO.....	07
2.3 AGENTE ETIOLÓGICO.....	07
2.4 GENOMA DO VLB.....	08
2.5 CICLO DE REPLICAÇÃO DOS RETROVÍRUS E VLB.....	09
2.6 EPIDEMIOLOGIA.....	11
2.7 TRANSMISSÃO.....	13
2.8 PATOGENIA.....	15
2.9 SINAIS E SINTOMAS.....	16
2.10 DIAGNÓSTICO.....	16
2.11 TRATAMENTO E PROFILAXIA.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 AMOSTRAS.....	21
3.1.1 Necropsia fetal.....	21
3.2 EXAMES BACTERIOLÓGICOS - <i>Brucella spp.</i>	25
3.2.1 Isolamento.....	25
3.2.2 PCR.....	25
3.3 EXAMES VIROLÓGICOS VLB	26
3.3.1 Reação em cadeia pela polimerase (<i>nested-PCR</i>) para VLB.....	26
3.3.1.2 Extração do DNA de timo, baço e linfonodo.....	26
3.3.1.3 Extração do DNA de líquido/tóraco abdominal.....	27

3.4 SEQUENCIAMENTO.....	30
3.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	30
3.6 HISTOTÉCNICA.....	31
3.7 IMUNODIAGNÓSTICO FETAL.....	34
3.8 OUTRAS ANÁLISES DIFERENCIAIS DE ABORTAMENTO.....	35
3.8.1 Bactérias aeróbicas.....	35
3.8.2 <i>Neospora caninum</i>	35
3.8.3 Herpesvírus Bovino (HVB) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV).....	35
4.0 RESULTADOS.....	36
4.1 HISTOPATOLOGIA X <i>NESTED</i> -PCR X ELISA.....	36
4.2 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	46
4.2.1 Alinhamento das sequências.....	46
4.2.2 Matrizes de identidade.....	50
4.2.3 Inferência filogenética a partir das sequências nucleotídicas.....	51
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÃO.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8. ANEXOS.....	76
Anexo 1. Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CETEA) número 122/12 , aprovado em 28/março/ 2102.....	76
Anexo 2. Planilha de encaminhamento para fetos ruminantes (LAP- REG-026 revisão 04 de 20/09/12).....	77
Anexo 3. Sequencias Nucleotídicas do VLB.....	78
Anexo 4. Tabela de Similaridade entre as sequencias de VLB.....	80
Anexo 5. Fetos bovinos abortados encaminhados segundo data, registro LAP e TA, sexo, raça, idade, procedência (município/Estado), resultados VLB (ELISA, <i>nested</i> -PCR), exames IBR/BVD/Neospora e bacteriológicos (São Paulo, 2013).....	81

1. INTRODUÇÃO

Abortamento e natimortalidade são causas frequentes de prejuízos econômicos para a pecuária bovina devido às perdas diretas da concepção e à interferência na fertilidade (OKANO et al., 2003). Diversos agentes infecciosos (virais, bacterianos e parasitários) e não infecciosos podem estar envolvidos (PITUCO; DEL FAVA, 2003; ANTONIASSI et al., 2007; DEL FAVA; PITUCO; GENOVEZ, 2007). Entre os fatores não infecciosos citamos os ambientais (alta temperatura), nutricionais, maternos (desequilíbrio hormonal), aberrações cromossômicas (VANROOSE; KRUIF; VAN SOOM, 2000), plantas tóxicas e micotoxinas (RIET-CORREA, 2007). Todos esses fatores relacionados às enfermidades devem ser considerados para que seja feito um diagnóstico diferencial (DEL FAVA; PITUCO; GENOVEZ, 2007).

Do ponto de vista econômico, a morte fetal em rebanhos bovinos é estimada em 5% (LAMBERT; WILLIAMS; LYNCH, 1991), porém surtos de abortamentos com perda significativa dos produtos (aborto de fetos fêmeas que seriam as futuras matrizes de reposição), maior intervalo entre partos, diminuição da produção leiteira e menor índice de prenhez têm sido apontados (RADOSTITS, 2001).

Os trabalhos de Genovez et al. (1993; 2006), Scarcelli et al. (2004) e Cortez et al. (2006) demonstram um elevado percentual, em torno de 70% das amostras fetais com diagnóstico negativo para os principais patógenos causadores de abortamento, justificando a inclusão de outros possíveis agentes não estudados no programa de gestão sanitária de causas de abortamento.

A importância do diagnóstico diferencial mostra que o estado de equilíbrio aparente pode ser rompido em condições adversas como seca, escassez de alimento, doenças intercorrentes, carências metabólicas. Por este motivo deve-se identificar e corrigir os fatores que rompem o equilíbrio entre hospedeiro, agente e ambiente (DEL FAVA; PITUCO; GENOVEZ, 2007).

A avaliação histopatológica de fetos bovinos abortados encaminhados ao Instituto Biológico no período de janeiro de 2006 a julho de 2008 para diagnóstico diferencial de causas de abortamento comprova que, nos materiais negativos microbiologicamente, lesões sugestivas de abortamento infeccioso foram encontradas (CABRAL et al., 2008). Estes autores observaram pela avaliação histopatológica (HE) a presença de infiltrado inflamatório linfocítico em 73,50% (86/117) dos casos em pelo menos um dos órgãos avaliados (coração, sistema nervoso central, pulmão, rim, fígado, baço e placenta), enquanto que em 11,96% (14/117) dos casos não foram

observadas alterações histopatológicas dignas de nota, indicando abortamento não-infeccioso. Okano et al. (2003) detectaram no Paraná, pela histopatologia, 51,6% de 93 fetos abortados com infiltrado de células mononucleares nos diferentes órgãos. Os trabalhos de Okano et al. (2003) e Cabral et al. (2008) demonstram que as alterações histopatológicas indicam a presença de agente etiológico que precisa ser identificado por testes sensíveis e específicos, e que também novos agentes devem ser investigados, além dos reconhecidos causadores de aborto.

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2001) gerencia as ações de combate da brucelose, principal enfermidade que causa abortamento em bovinos no país, além de ser importante zoonose. As principais medidas sanitárias adotadas pelo PNCEBT são: vacinação obrigatória de bezerras de 3-8 meses de idade (vacina B-19), triagem sorodiagnóstica (Teste do Antígeno Acidificado Tamponado) e confirmatório (Soroaglutinação Lenta e 2-Mercaptoetanol), e o abate de animais sororeagentes em frigorífico com inspeção sanitária. O PNCEBT sugere que a pesquisa direta do agente pode ser utilizada para confirmar a doença no rebanho. A vacina da *Brucella abortus* é produzida com a cepa B-19, o antígeno é vivo e de patogenicidade reduzida, causa uma infecção controlada e suscita resposta sérica humoral que decai na idade adulta (TIZARD, 2002).

Os principais objetivos do controle e erradicação da brucelose incluem a interrupção da transmissão do agente causal e medidas inespecíficas no movimento de animais e eventuais reservatórios domésticos. A doença é considerada de grande preocupação, por ser zoonose e pelo fato de que ocasionalmente o leite de animais brucélicos ser vendido *in natura*, sem pasteurização e inspeção sanitária, sendo risco de contaminação ao consumidor (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A taxa de sororeagentes para Brucelose no Estado de São Paulo, obtida por estudo amostral realizado pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária revelou prevalência estimada em 3,8% em um total de 8.761 fêmeas com idade acima de 24 meses, onde as amostras consideradas reagentes ao teste do antígeno acidificado tamponado foram confirmadas pela fixação de complemento (DIAS et al., 2009). No Estado de Minas Gerais, a taxa de sororeagentes para Brucelose revelada pelo teste de triagem antígeno acidificado tamponado e confirmada pelo teste 2-mercaptoetanol foi 1,1% em 20.643 animais testados e 6% focos em 2.204 propriedades avaliadas. Depreende-se por meio destas avaliações indiretas (detecção de anticorpos), que a brucelose está diminuindo nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, graças às

medidas sanitárias adotadas, levando à menor prevalência da doença. Desta forma, outras enfermidades além da brucelose devem ser investigadas nos rebanhos bovinos onde estejam ocorrendo abortamentos.

Com relação ao diagnóstico direto da *B. abortus* em fetos bovinos abortados, em trabalho realizado pelo Instituto Biológico, publicado por Genovez et al. (1993), foram submetidas a isolamento bacteriano 544 amostras de órgãos e anexos fetais provenientes de 282 fetos bovinos, oriundos de rebanhos na sua maioria leiteiros, procedentes de vários estados brasileiros no período de 1985 a 1992. Foram consideradas como possíveis causas de abortamento as bactérias patogênicas e as culturas puras ou preponderantes de bactérias oportunistas, entre as quais *Brucella abortus* (6,2%), *Leptospira* spp (6,2%), *Staphylococcus aureus* (5,4%), *Campylobacter fetus* (4,7%) e *Streptococcus* Beta hemolítico (3,5%).

Posteriormente, Genovez et al. (2006) compilaram dados em uma série histórica de 20 anos (período de 1985 a 2005) e isolaram *Brucella abortus* em 5,6% (70/1.259) dos fetos abortados provenientes de rebanhos leiteiros e de corte de diversos Estados Brasileiros (SP, MG, PR, RS, MS, GO e PE). Foram pesquisadas bactérias aeróbias e microaerófilas causadoras de abortamento (*Leptospira* spp., *Arcobacter cryaerophilus*, enterobactérias e cocos Gram-positivos, *Campylobacter* spp., *Brucella* spp., *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma diversum*, *Histophilus somni*, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum*), considerando-se como possíveis causas de abortamento os microorganismos isolados em cultura pura ou preponderante. Pelo menos uma causa bacteriana relacionada com distúrbio reprodutivo pôde ser identificada em 413/1.259 (32,8%) fetos abortados, sendo 175 (13,9%) devido a bactérias abortivas específicas e 238 (18,9%) referentes a agentes potencialmente abortivas ou oportunistas. A *Brucella abortus* foi o agente predominante nas causas específicas e, entre as bactérias oportunistas, a associação *Streptococcus* spp. e/ou *Escherichia coli* foi a mais frequente. De 846/1.259 (67,2%) fetos, não foi possível identificar a causa, seja infecciosa ou não. Uma vez que foram processados de forma pareada o líquido abomasal e órgãos, eventualmente placenta, de cada feto, 90% dos casos onde o diagnóstico bacteriológico foi concluído, este adveio do conteúdo abomasal, se constituindo, portanto no material de escolha para o isolamento de bactérias, contra apenas 10% dos órgãos analisados.

Cortez et al. (2006) avaliaram pela PCR 114 fetos bovinos abortados e 10 bezerros com mortalidade perinatal, provenientes de diferentes estados brasileiros (AL, GO, MG, MS, MT, RS, SP) durante o período de 1997 a 2004, excetuando-se o ano de 2000. Detectaram 13,7% (17/124) amostras positivas para *Brucella* spp., 3,2%

(4/124) para *Leptospira* spp., 2,4% (3/124) para Herpesvírus bovino (BoHV) e para o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). Em 77,4% (96/124) das amostras não foi possível detectar nenhum dos agentes estudados.

Scarcelli et al. (2004) avaliaram por meio de isolamento, identificação de bactérias aeróbias e microaerófilas e PCR multiplex *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. em amostras de conteúdo abomasal, órgãos e/ou anexos fetais de 67 fetos bovinos de gado de corte e leite brasileiros. No estudo foi possível isolar *B. abortus* em 38,8% (26/67), sendo superior na PCR-multiplex 50,7% (34/67) dos mesmos fetos, confirmando maior sensibilidade analítica da PCR-multiplex do que em relação ao cultivo na brucelose bovina. Outros agentes também foram identificados nos tecidos fetais, tais como *Mycoplasma* spp., *Campylobacter* spp. e *Haemophilus somnus*, bem como outras bactérias oportunistas causadoras de abortamento.

Com a utilização das técnicas moleculares houve um aumento da sensibilidade analítica do diagnóstico direto da brucelose. Por outro lado, com o avanço da campanha de erradicação da brucelose, espera-se obter progressiva diminuição do abortamento por esta enfermidade, incluindo no estudo da casuística do abortamento bovino outras enfermidades da reprodução.

Na gestão sanitária do abortamento bovino, quando o resultado é negativo para brucelose faz-se necessário realizar o diagnóstico diferencial investigando outros patógenos que possam estar envolvidos. A infecção fetal pode ser constatada pela presença de anticorpos no líquido tóraco-abdominal ou de antígeno nos órgãos e placenta, sendo o feto abortado e placenta os principais materiais clínicos a serem submetidos em caso de abortamento bovino (DEL FAVA; PITUCO; GENOVEZ, 2007).

É muito importante o reconhecimento de agentes que ainda não foram identificados, assim evidencia-se que o diagnóstico diferencial das causas de abortamento bovino é de grande importância.

Uma revisão realizada por Del Fava e Pituco (2004) demonstra que a leucose bovina encontra-se disseminada nos rebanhos bovinos de todas as regiões do Brasil, onde elevados índices de soropositividade foram detectados. Não existe legislação sanitária específica para o combate do VLB no país, apesar da Organização Mundial de Saúde Animal incluir no seu Manual de Saúde Animal Terrestre (OIE, 2011) que os países signatários possam exigir na comercialização testes para avaliar a condição sanitária e impor restrições quanto à Leucemia Bovina. Destaca-se que, pela sua relevância e distribuição em todo o território nacional, o VLB poderia ser incluído na pesquisa de agentes causadores do abortamento de fetos bovinos.

Tendo em vista todas estas considerações, o presente trabalho objetivou:

- Verificar nos fetos bovinos abortados por meio do diagnóstico diferencial de causas de abortamento, a frequência de ocorrência de infecção pelo VLB por meio de técnicas moleculares (*nested-PCR*, sequenciamento e filogenia) e ELISA anticorpo.
- Correlacionar lesões histopatológicas sugestivas de abortamento viral com a positividade ou não frente ao VLB e presença ou ausência de co-infecção a outros patógenos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INTRODUÇÃO À LEUCEMIA BOVINA (LB)

O Vírus da Leucemia Bovina (VLB), classificado na família *Retroviridae* (VAN REGENMORTEL et al., 2000) é o agente causador da leucemia bovina. Esta enfermidade caracteriza-se por um curto período de viremia pós-infecção e longo período de latência antes do aparecimento de sinais clínicos. Cerca de 10 a 12 dias após a infecção, as partículas virais são encontradas na circulação sanguínea e desencadeiam resposta imune humoral e celular (PORTETELLE et al., 1978). Trata-se de uma enfermidade neoplásica, de caráter crônico, que possui como alvo o tecido linfóide e pode ter um período de incubação de dois a cinco anos, após o qual é maior a chance do animal desenvolver sintomas aparentes (JONES, 2000).

A associação tumor-vírus teve início quando Gross (1961) conseguiu transmitir, por meio de extratos livres da célula, a leucemia linfática de camundongos- AK para camundongos C3H, quando após o processo de inoculação apareciam sempre tumores nos animais. Concluiu-se que o material inoculado continha vírus com propriedades de formação de tumores (*apud* GUERREIRO; MAYR, 1988).

A doença possui evolução crônica e frequentemente os animais são assintomáticos e importantes transmissores do vírus. Em média de 30 a 70% dos animais infectados apresentam linfocitose persistente (aumento no número de linfócitos B circulantes) e de 2 a 5 % dos animais portadores podem desenvolver linfossarcomas de evolução fatal (DOMENECH et al., 2000), geralmente animais adultos. A probabilidade do desenvolvimento de um tumor ser devida à falha do sistema imunológico é pequena (TIZARD, 2002) e o estágio tumoral é frequentemente observado em animais na faixa etária de 4 a 8 anos de idade (FERRER, 1979). Foi também observado por Garcia et al. (1995) maior frequência de mastite bovina nos portadores de VLB.

A LB também pode ser chamada de “Linfomatose”, “Linfoma maligno”, “Linfossarcoma”, “Linfocitose persistente” e “Leucemia linfática”. Muitos inquéritos sorológicos indicam que a enfermidade está com percentuais de infecção maiores em rebanhos leiteiros de manejo intensivo (DEL FAVA; PITUCO, 2004). Também avaliada por Barros et al. (2007), a doença acomete em menor proporção rebanhos de corte.

2.2 HISTÓRICO

O continente Europeu pode ser considerado o berço do VLB. A doença foi relatada pela primeira vez na Alemanha por Leisering em 1871 e sua possível origem na região de Memel (Prússia Oriental), tendo sido, com o passar do tempo disseminada para a região oeste do planeta (JOHNSON; KANEENE, 1992; SCHOTTLER; SCHOTTLER, 1934).

No Brasil, o primeiro relato da LB ocorreu no Estado de Minas Gerais, quando linfossarcomas foram diagnosticados em quatro bovinos (RANGEL; MACHADO, 1943).

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO

O Vírus da Leucemia Bovina (VLB) encontra-se classificado na Família *Retroviridae*, Subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Deltaretrovirus*; possui envelope glicoproteico, nucleóide e um nucleocapsídeo (ICTV, 2012) conforme a Figura 1. Os retrovírus possuem a enzima transcriptase reversa, que sintetiza a partir do RNA viral cópias de DNA pró-viral que se integram aos linfócitos (MURPHY et al., 1999). O agente pode infectar linfócitos B, linfócitos T ou monócitos (GATEI et al., 1989).

O VLB pode ser amplificado em linhagem contínua de células FLK (*foetal lamb kidney* – rim de feto ovino) (VAN DER MAATEN, 1974), e sua replicação também pode ser possível por meio de linhagem de células pulmonares de morcego (BLV-*bat*) (GRAVES; FERRER, 1976).

O VLB é esférico, com capsídeo viral envelopado e icosaédrico. Possui uma variação de 80 a 100 nanômetros, sua superfície apresenta pequenas projeções, nucleóide concêntrico e núcleo (ICTV, 2012).

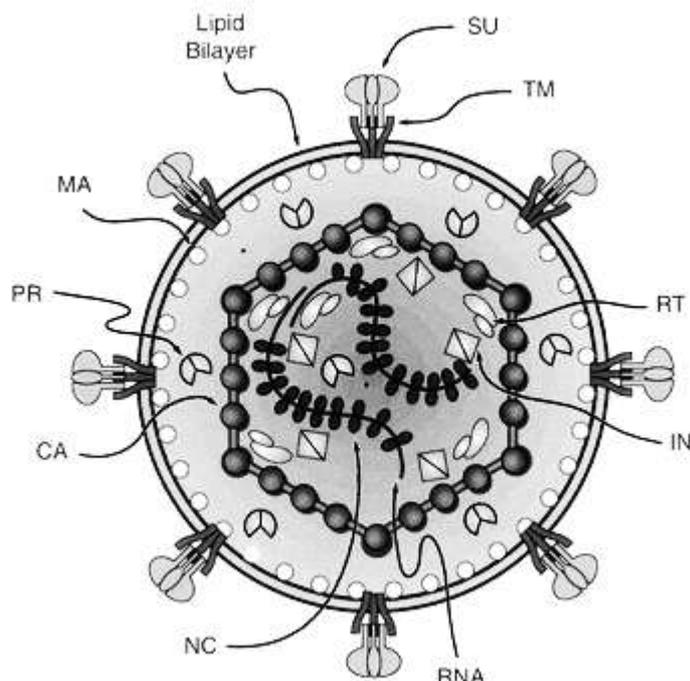


Figura 1 – Representação de um retrovírus. Legenda: SU (superfície), TM (transmembrana), MA (matriz), IN (integrase), NC (núcleocapsídeo), CA (capsídeo), PR (protease), RT (transcriptase reversa). Fonte: CONFIN et al. (1997).

2.4 GENOMA DO VLB

É diplóide, possui assim, duas fitas simples de RNA linear em sentido positivo (FENNER; GIBBS; MURPHY, 1993). Segundo Vogt (1997), seu genoma possui aproximadamente 8300 nucleotídeos, constituindo assim aproximadamente 2 % do peso total do vírion, com terminações repetidas de 550 a 750 nucleotídeos que regulam e interferem na replicação do vírus e expressão gênica na indução de patologias.

O VLB caracteriza-se por acometer principalmente os linfócitos B e ser lentamente oncogênico, pois não possui “v-oncs” (oncogenes que levam ao aumento celular anormal). Pode induzir a formação de linfomas (B e T) e leucemias mielóides (MURPHY et al., 1999) e pode causar alterações na atividade fagocitária e no metabolismo oxidativo de monócitos, alterando sua funcionabilidade (AZEDO et al., 2011).

O VLB possui uma região chamada X em seu genoma, localizada entre o envelope e a extremidade 3' da LTR (*long terminal repeat*) e possui também os genes estruturais “*pol*”, “*gag*”, e “*env*”. Na região X são encontrados os genes R3, G4, REX e

TAX. De acordo com estudos, o gene TAX está associado à suspeita de ser indutor de carcinogênese (GILLET et al., 2007). Segundo Fenner, Gibbs e Murphy (1993), além das três regiões “gag”, “pol” e “env” existe uma quarta região, que possui capacidade de transformação do gene “*sarc*” ou “*onc*”. A região “gag” é capaz de produzir proteínas estruturais, a região “pol” é responsável pela transcriptase reversa, a região “env” na produção de glicoproteína e “*sarc*” (“*onc*”) tem fatores relacionados à alteração celular. A Figura 2 mostra um provírus do VLB, destacando proteínas codificadas, os genes e RNA transcritos.

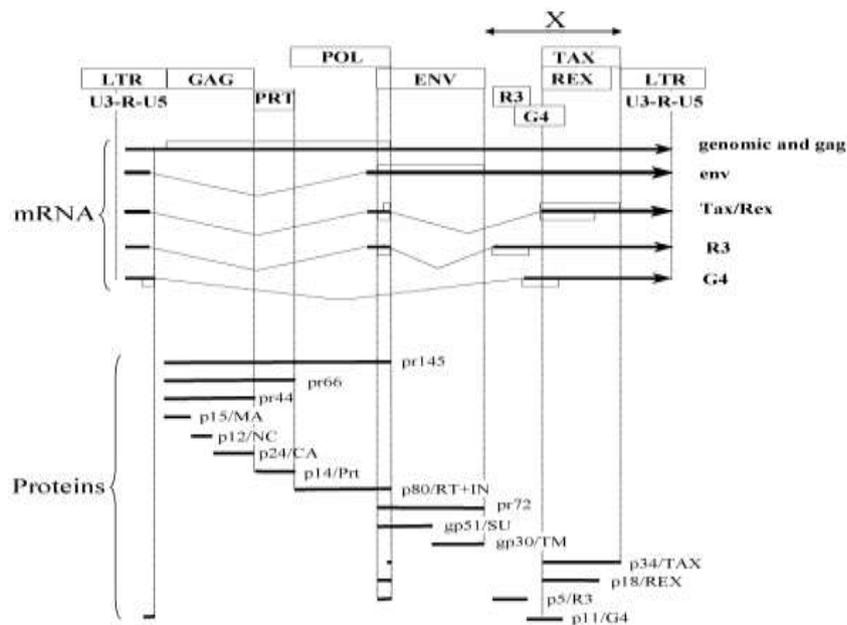


Figura 2 - Estrutura de um provírus do VLB. Representação dos genes estruturais “gag, env e pol”, RNA transcritos e proteínas codificadas. Fonte: GILLET et al. (2007).

2.5 CICLO DE REPLICAÇÃO DOS RETROVÍRUS E VLB

A replicação do VLB inicia-se pela ligação do vírion a membrana da célula do hospedeiro. Essa membrana possui receptores a partir dos quais é possível sua incorporação ao genoma do hospedeiro, após a qual ocorre a expressão gênica do vírus e sua maturação (NISOLE; SAIB, 2004).

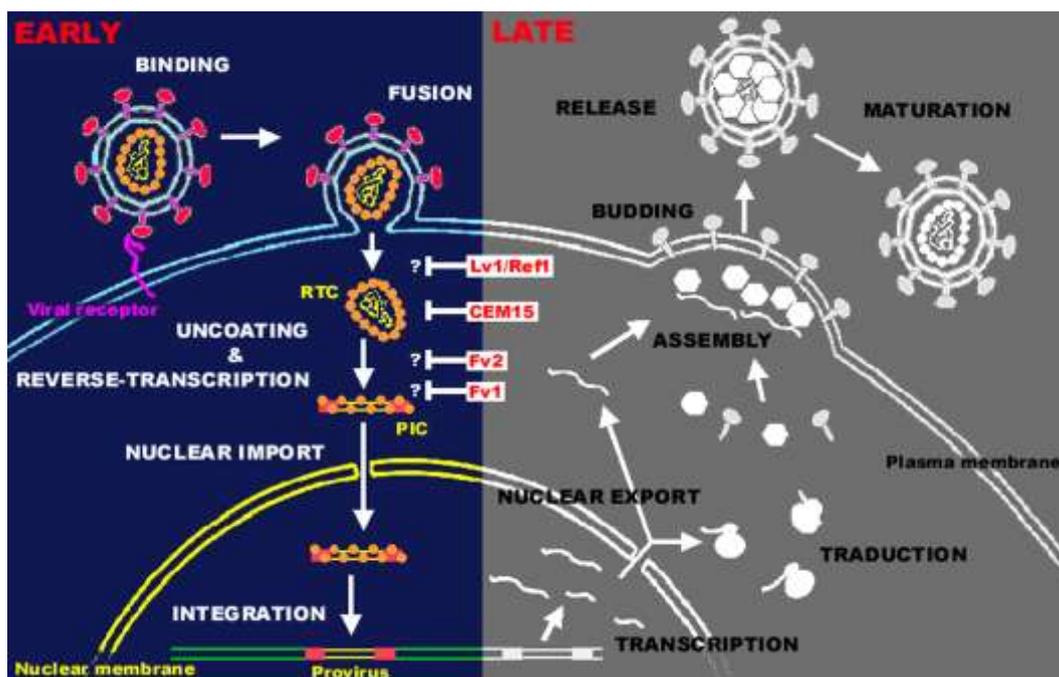


Figura 3 - Replicação do retrovírus. Estágio inicial e posterior da replicação viral e interferência de fatores celulares indicados por Lv1/Ref1, CEM15, também conhecido como APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like-3G*), FV2 e FV1. Os pontos de interrogação indicam que a etapa exata afetada pelos fatores de restrição não foram precisamente determinados. Lv1 e Ref1 são as partículas no bloco de entrada antes da transcrição reversa enquanto FV1 FV2 agem em estágio entre transcrição reversa e incorporação ao genoma. Fonte: NISOLE; SAIB (2004).

A ligação do vírus à célula ocorre através da superfície da célula, e as glicoproteínas do envelope viral (gp51 e gp30) se originam da proteína precursora Pr72 (ALTANER et al., 1993). A gp51 possui peso molecular de 51.000 daltons e é o sítio de ligação do vírus ao linfócito B, sendo responsável pela sua infectividade (SUZUKI; IKEDA, 1998). Segundo Wu et al. (1999), o VLB infecta células B, T e monócitos, porém a sua transcrição só ocorre nas células B. Animais infectados pelo VLB, com linfocitose persistente, apresentam leucócitos circulantes com função fagocítica reduzida (AZEDO et al., 2008).

A infecção pelo VLB pode ser separada em duas etapas, na primeira, o vírus após ligar-se ao linfócito, libera todo o seu conteúdo dentro do citoplasma da célula hospedeira. A enzima transcriptase reversa transcreve uma das fitas de RNA em fita dupla de DNA, esta migra até o genoma do linfócito com ajuda da integrase viral. Após

se ligar ao genoma da célula hospedeira, o provírus passa a utilizar os comandos celulares para transcrição de RNA genômico e a produzir RNAm, que posteriormente é traduzido em proteínas virais no citoplasma. O vírus é liberado da superfície do linfócito revestido externamente pela membrana celular (SEIKI et al., 1984).

2.6 EPIDEMIOLOGIA

No Brasil, diversos relatos comprovam que a leucemia bovina encontra-se disseminada em quase todos os Estados (Quadro 1).

Quadro 1 – Estados brasileiros com ocorrência do VLB, segundo o autor, ano, técnica laboratorial e aptidão zootécnica. Adaptado de Del Fava e Pituco (2004).

Autores	Ano	UF	n° Amostras	Positivos (%)	Técnica	Aptidão Zootécnica ou raça
Região Norte						
ABREU; ARAUJO;BIRGEL	1990	RO	1.060	23,0	IDGA	Carne, leite, misto
		AC	1.060	9,7	IDGA	
MOLNÁR et al.	1999	PA	668	26,0	IDGA	Leite e corte
			721	49,8	ELISA	
CARNEIRO et al.	2003	AM	604	9,6	IDGA	Leite
FERNANDES	2009	TO	881	37	IDGA	Leite
Região Nordeste						
TÁVORA;BIRGEL	1991	BA	1.084	16,1	IDGA	Leiteira
MELO et al.	1991	PE	195	23,1	IDGA	Holandesa Mestiço Holandês x Zebu
			323	8,4		
ABREU et al.	1994	CE	3430	24,5	IDGA	Zebu x raças taurinas
SIMÕES	1998	PB	780	8,3	IDGA	Leiteira
SILVA et al.	2001	PI	1.976	16,9	IDGA	Leite e corte
SILVA FILHO et al.	2011	PE	4.758	0,5	IDGA	Leite e corte
Região Centro-oeste						
ANDRADE; ALMEIDA	1991	GO	63	46,0	IDGA	Holandês
			416	36,5		Mestiço Holandes
			45	37,9		Zebu
			87	39,2		Gir
			53	13,2		Nelore

Autores	Ano	UF	n° Amostras	Positivos (%)	Técnica	Aptidão Zootécnica ou raça
Sudeste						
ALENCAR FILHO	1978	SP	40	60,0	IDGA	Holandesa
ALENCAR FILHO et al.	1979	SP	1.013	5,64	IDGA	Leiteira e corte
ROMERO; ROWE	1981	RJ	1.444	53,3	IDGA	Leiteira
CUNHA et al.	1982	RJ	746	26,9	IDGA	Mestiço Holandês x Zebu
BIRGEL et al.	1983	SP	292	53,8	IDGA	Leiteira
LEITE et al.	1984	MG	230	70,9	IDGA	Leiteira
MODENA et al.	1984	MG	1.274	40,6	IDGA	Leiteira
			1.652	15,6		Corte
SANTOS et al.	1985	MG	317	28,4	IDGA	Não informada
BIRGEL et al.	1988a	SP	462	52,6	IDGA	Leiteira tipo B
BIRGEL et al.	1988b	SP	1.722	44,9	IDGA	Leiteira
BIRGEL et al.	1991	SP	2.708	42,9	IDGA	Leiteira
ARITA et al.	1992	SP	2.187	16,2	IDGA	Leiteira
BIRGEL et al.	1994	SP	482	4,15	IDGA	Nelore
BIRGEL JUNIOR et al.	1995	SP	709	49,2	IDGA	Jersey
OLIVEIRA et al.	1997	SP	1.448	31,8	IDGA	Holandesa
MEGID et al.	2003	SP	1.193	47,4	IDGA	Leite e corte
Sul						
SCARCI et al.	1980	RS	385	18,9	IDGA	Não foi citado
KANTEK; KRUGER,; WELTE	1983	PR	695	20,7	IDGA	Leiteira
GOMES et al.	1985	RS	702	32,6	IDGA	Leiteira
FLORES et al.	1988	RS	639	14,2	IDGA	Leiteira
FLORES; WEIBLEIN; REBELATTO	1990	RS	135	27,2	IDGA	Leiteira
MORAES et al.	1996	RS	39.799	9,2	IDGA	Leiteira
CARVALHO et al.	1996	PR	374	18,4	IDGA	Holandesa
			611	0,0	IDGA	Nelore
VAN DER LAAN et al.	1999	RS	19.774	16,3	IDGA	Leiteira
LEUZZI JÚNIOR et al.	2003	PR	624	40,7	IDGA	Leiteira tipo B
BARROS FILHO	2010	PR	268	56,34	IDGA	Leite

IDGA – Imunodifusão em Gel de Agar; ELISA – Ensaio Imunoenzimático.

O VLB foi erradicado em alguns países, como na Finlândia, Holanda, Grã-Bretanha, Alemanha, França, Dinamarca, Áustria e Bélgica (KNAPEN et al., 1993; NUOTIO et al., 2003). O Quadro 2 apresenta a ocorrência do VLB em outros países.

Quadro 2 – Ocorrência do VLB segundo o autor, ano, país, técnica laboratorial e aptidão zootécnica.

Autores	Ano	País	n° amostras	Positivos (%)	Técnica	Aptidão zootécnica
WANG et al.	1991	Taiwan	6313	4,8	IDGA	leite
TRONO et al.	2001	Argentina	339	32,85	ELISA	leite
SCOTT et al.	2006	Canadá	288	26,9	ELISA	leite
VANLEEuwEN et al.	2006	Canadá	1.204	60,8	ELISA	leite
			1.425	10,3	ELISA	corte
MURAKAMI et al.	2011	Japão	3.966	34,7	ELISA IDGA	leite
			1.454	24,2		corte
MOHAMMADI et al.	2011	Iran	137	29,9	ELISA	leite
GHANEM; AHMED; ABDELKADE	2011	Somália	468	1,5	ELISA	leite

2.7 TRANSMISSÃO

A principal forma de transmissão do VLB é iatrogênica, pelo uso de fômites contaminados como agulhas, material cirúrgico, luva de palpação, tatuador ou qualquer outro procedimento que possa transmitir linfócitos de um animal para outro (DIMMOCK; CHUNG; MACKENZIE, 1991). Em casos de intensa manipulação dos animais é comum perceber a utilização da mesma luva de palpação e a falta de higiene quando ausente a desinfecção das mãos e braços, o que leva a maior contaminação (LASSAUZET et al., 1990; HOPKINS; DIGIACOMO, 1997; KOHARA; KONNAI; ONUMA, 2006). A transmissão indireta pode ocorrer por meio de secreções contendo linfócitos infectados, ou na forma transplacentária (vertical), porém o contato animal-animal pode ocorrer, mas requer um íntimo e prolongado contato físico (STRAUB, 1978). A monta natural também pode ser uma via de infecção (WHITTIER, 1990). A transmissão vertical por meio de leite e colostro contaminados pode ocorrer, apesar de ser menos frequente que pelo sangue (JOHNSON; KANEENE, 1992).

Um estudo realizado por Divers et al. (1995) demonstrou em 167 animais negativos para VLB que a palpação retal sem troca de luva é um fator de significância na transmissão indireta do vírus. Neste estudo a separação de dois grupos de animais, um com troca alternada e outro sem troca de luvas. Após palpar um animal sabidamente positivo, repetiu-se o procedimento em animais negativos, tendo sido infectados 18,6% (31/167) animais, onde 24 animais infectaram-se sem a troca de luvas e 7 com a troca alternada de luvas. O procedimento sem a troca de luvas demonstra ser um fator de risco de 2,8 vezes maior na transmissão iatrogênica do VLB.

Autores não comprovaram diferenças estatísticas entre animais infectados e não infectados para os seguintes parâmetros reprodutivos: idade no primeiro parto (D'ANGELINO; GARCIA; BIRGEL, 1998) e número de serviços (REINHARDT et al., 1988).

Diversos estudos realizados com sêmen, óvulos, ou embriões de bovinos infectados indicam que esses são materiais biológicos com pouca importância epidemiológica na transmissão do VLB (DIGIACOMO, 1992a,b), porém, para a movimentação internacional de sêmen as autoridades podem exigir a apresentação de um certificado em que o touro residia em rebanho livre de BLV, ou que é filho de mãe soronegativa em caso de idade inferior a dois anos (OIE, 2011).

É possível diminuir a probabilidade de infecção de embriões se os protocolos de produção aprovados internacionalmente forem utilizados (CHOI; MONKE; STOTT, 2002; WRATHALL; SIMMONS; VAN SOOM, 2006).

A transmissão por via uterina (vertical) ocorre frequentemente no primeiro trimestre de gestação em até 8% das gestações de animais sororeagentes, principalmente em vacas com alta concentração do vírus e baixos títulos de anticorpos (JACOBSEN, 1983). Kono et al. (1983) verificaram que a transmissão vertical em bezerros, antes que o neonato ingerisse o colostro foi de 20%, utilizando a imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Hübner et al. (1997) encontraram em rebanhos leiteiros 4,8% bezerros congenitamente infectados, sorologicamente positivos antes de mamar o colostro, pela IDGA. Klimentowski (1991) encontrou em dois rebanhos, 10 e 13% de terneiros positivos para o VLB, realizando sorologia pela IDGA antes do consumo do colostro, e 15 e 22% com ELISA. Agresti, Ponti e Rocchi (1993) verificaram que bezerros infectados intrauterinamente (sorologia fetal positiva pela IDGA) nasceram de mães com linfocitose persistente.

A transmissão pode ocorrer pelo leite de vacas infectadas, por meio da amamentação (POLLARI et al., 1993; NAGY; TYLER; KLEIBOEKER, 2006).

Partículas do vírus podem ser encontradas no colostro e leite das fêmeas infectadas (BUEHRING; KRAMME; SCHULTZ, 1994).

Casal, Learte e Torre (1990) realizaram estudo em 93 fazendas, a fim de verificar as portas de entrada da doença no rebanho. Observaram que em 88% dos casos a principal entrada da doença deu-se pela inclusão de animais infectados no rebanho, o que auxiliou na disseminação da doença.

2.8 PATOGENIA

Os animais acometidos pela leucemia bovina geralmente não apresentam sintomas após a infecção, já que a doença é de carácter crônico e o aparecimento de anticorpos ocorre a partir da segunda semana (KLINTEVALL; FUXLER; FOSSUM, 1997). Cockerell e Reyes (2000) relatam que os animais apresentam uma infecção de carácter persistente, que pode ser avaliada pela detecção de anticorpos anti-VLB.

A produção persistente de anticorpos se deve a uma constante ou periódica estimulação do sistema imunológico por agentes virais (HEENEY et al., 1992), porém os retrovírus podem causar instabilidade no sistema imunológico e imunossupressão, tornando o animal susceptível à outras doenças (FERRER, 1980; AZEDO et al., 2008, 2011).

Geralmente os linfócitos B são as células mais acometidas pelo VLB (AIDA et al., 1989; SCHWARTZ et al., 1994), onde o animal neste período inicial passa a ser apenas transmissor, sem desenvolver os sintomas da doença. O desenvolvimento da linfocitose persistente (LP) ou do linfossarcoma tem determinação a partir da constituição genética do bovino acometido (RADOSTITS et al., 2002). A linfa é a principal via de disseminação do linfoma (YOON et al., 2005). A LP pode ser descrita como o aumento excessivo de linfócitos B circulantes no sangue e é considerada a forma benigna da doença. Ferrer (1979) considera que grande parte dos animais infectados pelo VLB não apresentam o desenvolvimento de linfossarcoma e LP. De acordo com Gatei et al. (1989), a proliferação de linfócitos B (linfocitose) diminui o número de células T circulantes, sugerindo que as células T tenham um papel na progressão da infecção viral.

Segundo Parodi (1987), o desenvolvimento de linfossarcoma ocorre geralmente em órgãos onde existe tecido linfóide como abomaso, baço, coração, linfonodos, fígado, útero e rins. O linfossarcoma em animais adultos é uma doença fatal e acomete 5% a 10% dos animais infectados (FERRER, 1979; BARROS, 2007). Porém, Silva et al. (2008) observaram em uma vaca de apenas três anos de idade

linfossarcoma, exoftalmia, aumento de linfonodos superficiais, paresia dos membros posteriores, massa endurecida palpável no útero e massas esbranquiçadas em diferentes órgãos, sugerindo que este animal adquiriu a doença na sua vida intrauterina ou nos primeiros meses de vida.

2.9. SINAIS E SINTOMAS

Os sinais clínicos estão relacionados à localização dos linfossarcomas, com aumento dos linfonodos superficiais e viscerais. Além de menor produção de leite, pode ocorrer incoordenação motora, caquexia e adenomegalia (MILLER; VAN DER MAATEN, 1979). Silva Filho et al. (2011) verificaram que os animais infectados apresentavam sinais clínicos como linfonodos superficiais palpáveis, diminuição da produção de leite, hiporexia, emagrecimento, diminuição do escore corporal, desidratação, dispnéia e aumento do volume uterino. Frequentemente há invasão do sistema digestivo resultando em anorexia, timpanismo recorrente e perda de peso. As neoplasias situadas na medula espinhal podem originar alterações neurológicas e paralisia dos membros posteriores. As lesões no miocárdio geralmente levam a falência cardíaca (JOHNSON; KANEENE, 1992). Além das formações tumorais nos linfonodos superficiais, o VLB pode causar exoftalmia devido ao aumento de linfonodos da região retrobulbar (BARROS; FLORES, 1989). A susceptibilidade a essas variadas formas clínicas está associada ao controle genético do hospedeiro, havendo variações consideráveis de um rebanho para outro (FERRER, 1979).

As portas de entrada do VLB, comprovadas por inoculação experimental são a intradérmica, intramuscular, subcutânea, intravenosa (EVERMAN et al., 1986), oral, intraperitoneal (MILLER; MILLER; OLSON, 1972), intratraqueal, intra-uterina (ROBERTS et al., 1982) e intra-retal (HOPKINS et al., 1988).

Reis et al. (2002), em um estudo realizado para verificação dos aspectos morfológicos dos linfomas, atestaram que estes apresentam à macroscopia, consistência firme e com aumento de volume, exsudação linfática, aspecto amarelado acinzentado ou esbranquiçado, hemorragia originária da ação destrutiva de processo neoplásico e localização geralmente cervical superficial e sub-ilíaco.

2.10 DIAGNÓSTICO

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para diagnosticar a leucemia bovina. Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) é possível a detecção por

meio de testes sorológicos como IDGA e o ELISA anticorpo, isolamento do vírus em cultivo de células mononucleares sanguíneas periféricas e detecção DNA pró-viral pela PCR (OIE, 2011).

Camargos et al. (2005) realizaram um trabalho para comparar a sensibilidade e especificidade de diferentes técnicas IDGA, ELISA, PCR e *nested*-PCR. O ELISA anticorpo demonstrou ser uma técnica sorodiagnóstica mais sensível que a IDGA. Com relação às técnicas moleculares, a *nested*-PCR conseguiu amplificar o DNA pró-viral de 12 amostras negativas, na PCR convencional demonstrando maior sensibilidade. MAMMERICKX et al. (1980) também verificaram que o ELISA apresenta maior sensibilidade que a IDGA.

Após a exposição, o período de incubação pode levar dias até meses, gerando resultados falsos negativos (JOHNSON; KANEENE, 1992). Em um experimento realizado por Braga et al. (1997), após o diagnóstico de 188 animais pela técnica de IDGA com resultado negativo, passado o período de aproximadamente um ano, houve soroconversão de alguns animais apresentando-se fracamente positivos a esta técnica.

Em 1989, Onuma realizou trabalho em abatedouro à procura de antígeno específico ao tumor causado pelo VLB em células monoclonais cl 43, sugerindo ser a pesquisa deste uma ferramenta útil no diagnóstico da leucemia bovina, bem como para a rastreabilidade de possíveis desenvolvimentos tumorais.

No período pré e pós-parto ocorre à passagem de anticorpos anti-VLB do sangue para o colostro, o que pode gerar resultados sorológicos falsos negativos. Por este motivo, fêmeas gestantes devem ser avaliadas para anticorpos contra o VLB até seis semanas antes e após o parto (BURRIDGE et al., 1982; JOHNSON; KANEENE, 1992).

O diagnóstico dessa enfermidade pode ser realizado por técnicas indiretas para pesquisa de anticorpos, como a IDGA, ELISA e radioimunoensaio (RIA) (EVERMANN, 1992). Testes diretos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) detectam o DNA pró-viral (DOLZ; MORENO, 1999). O exame histopatológico é utilizado como diagnóstico complementar aos outros testes (OHSHIMA et al., 1984).

É possível por meio do ELISA anticorpo monoclonal anti-gp51 detectar antígeno viral em um pool de amostras (1 amostra positiva e 5 negativas), demonstrando ser um teste eficiente na procura do VLB em amostras de leite comercializado (FLORENT; DELGOFFE; ZYGRAICH, 1988).

A escolha entre o diagnóstico direto e indireto para o VLB deve considerar a sensibilidade e especificidade. A OIE (2011) preconiza ELISA e IDGA como

sorodiagnóstico e a PCR para detecção do DNA pró-viral. O estudo de Martin et al. (2001) revelou que a PCR detectou 6% a mais de animais positivos que o ELISA, além de diagnosticar a infecção antes da soroconversão, se comparado ao ELISA e IDGA.

A avaliação histopatológica demonstra as características dos tumores de acordo com a idade do animal, sendo que os indivíduos com mais de três anos de idade apresentam lesões típicas, definidas como linfoma ou linfossarcoma, com o desenvolvimento de tumores volumosos e nodulosos em áreas relacionadas ao sistema linfático, envolvimento de baço e infiltrado de leucocitário no fígado de animais acometidos em manifestações leucêmicas, e raramente há envolvimento da medula óssea. Em animais jovens ocorre neoplasia linfóide, caracterizada por uma proliferação neoplásica em órgãos hematopoiéticos, linfonodos, medula óssea, fígado (principalmente na tríade do espaço porta), baço, timo e tonsilas palatinas (YAMAMOTO et al., 1982). Lesões tumorais foram observadas na parede uterina em 30 a 40% dos casos tumorais (OHSHIMA et al., 1982).

Ohshima et al. (1982) observaram lesões histopatológicas neoplásicas em dois fetos obtidos de vacas positivas ao VLB e com linfossarcoma, que foram sacrificadas *in extremis*. Em geral havia nos linfonodos fetais hiperplasia folicular do centro germinativo, e o córtex com proliferação de células reticulares e células neoplásicas nos linfonodos, com alguns eosinófilos e neutrófilos. Foram encontrados nódulos tumorais em tecido adiposo perirenal e no pulmão (tecido interlobular e alvéolo), no músculo esquelético e na leptomeninge. Observou-se acúmulo de células neoplásicas em tecido subcutâneo, na placenta fetal e na gelatina de Wharton ao longo do cordão umbilical em um dos fetos. Ainda lesões neoplásicas foram observadas nos cotilédones através do âmnio transparente, o qual não apresentava alterações macroscópicas e com fluido amniótico límpido. A avaliação sorológica fetal pela IDGA revelou 33,3% (5/15) fetos soroeagentes, entre idade de cinco a nove meses de gestação. Como não há a passagem de imunoglobulinas através da placenta em ungulados e os fetos bovinos são incapazes de produzir anticorpos antes dos 100 dias de gestação, a resposta humoral observada nos fetos foi decorrente da reação de seu próprio sistema imune contra o VLB. Os autores sugerem que as lesões tumorais encontradas nos fetos tenham sido de origem materna (metástase).

Estudos de polimorfismo e sequenciamento do VLB realizados no Instituto Biológico evidenciaram heterogeneidade na população estudada, utilizando como critério a presença de sítios de restrição enzimáticos ou a análise da sequência gênica (AKAMATSU et al., 2003; GREGORY et al., 2004; IKUNO et al., 2003; IKUNO et al., 2005).

A técnica da PCR é recomendada como um teste alternativo no comércio internacional OIE (2011) onde se caracteriza por ser um teste direto na procura do DNA pró-viral, além de confirmar teste sorológico fraco positivo ou suspeito, diferenciar tumores como linfoma esporádico e infeccioso. A PCR pode ser realizada a partir de amostras de sangue, sêmen, tumores, placenta, órgãos, linfonodos e líquidos das cavidades torácica e abdominal.

Em um trabalho realizado por Martin et al. (2001), a PCR demonstrou ser mais eficiente que o ELISA, pois detectou 6% a mais de positivos, enquanto que a técnica de ELISA, quando comparada à IDGA, detectou 12% a mais de sororeagentes.

Comparando as técnicas de ELISA, IDGA e PCR, pode-se inferir que a PCR apresenta um limiar de detecção da infecção mais precoce (NAIF et al., 1992; KLINTEVALL et al., 1994).

2.11 TRATAMENTO E PROFILAXIA

As medidas preventivas contra a LB são fundamentais para seleção de animais de cria, recria e reprodução, pois não existe tratamento eficiente.

O controle para a enfermidade é baseado principalmente em práticas de manejo, porque não existe imunização eficaz (LUIZ JUNIOR; ALFIERI; ALFIERI, 2001). É necessário implantar medidas para a prevenção da transmissão iatrogênica e cuidados na administração do colostro e leite (transmissão vertical). O programa de controle se resume na realização de exame sorológico para diagnóstico dos animais sororeagentes, e esses devem ser isolados e/ou substituídos por animais não reagentes, pois a eliminação de todos os animais sororeagentes muitas vezes não é viável, devido ao custo econômico elevado da alta prevalência, em especial nos rebanhos leiteiros (JOHNSON; KANEENE, 1992). Devido à doença não possuir tratamento e o linfossarcoma ter prognóstico desfavorável, é imprescindível que haja sensibilização das autoridades e instituições de pesquisa para implantação de programas profiláticos e controle específico da doença, tendo em vista que no Brasil são inexistentes (SILVA et al., 2008).

Braga et al. (1997) sugerem medidas preventivas ao combate do VLB, ao verificarem que a eliminação de animais sororeagentes causa uma eficiência imediata, enquanto que o isolamento de bovinos infectados pode gerar uma economia naquela propriedade que não pretende descartar imediatamente os animais reagentes. Por outro lado, não foi satisfatório manter animais reagentes e não reagentes juntos (manejo misto) e submetê-los ao reteste em um curto espaço de tempo.

Johnson, Gibson e Kaneene, (1985) fizeram um estudo em uma propriedade de elevada concentração de sororeagentes ao VLB (95%). Os animais foram separados em dois grupos: sororeagentes e não reagentes. Medidas de higiene tais como o uso de materiais estéreis, orientação aos funcionários e controle de vetores resultaram, sem gerar o sacrifício de nenhum animal infectado, ao declínio de 95% para 35% de sororeagentes.

Del Fava e Pituco (2004) relatam que não existem no Brasil exigências de certificação de propriedades livres do VLB, sendo necessária a realização de diagnósticos laboratoriais, tais como PCR ou sorodiagnóstico para diminuir a possibilidade da compra de um animal infectado.

A PCR possibilita detectar animais positivos no período de incubação, quando ainda não existem sinais aparentes da doença. Em bezerros que mamaram o colostro, a PCR detecta o DNA pró-viral sem sofrer a interferência de anticorpos maternos adquiridos pelo colostro (KUZMAK; KOZACZYNSKA; BICKA, 1999; PAVLENKO et al., 2002).

Markiewicz, Rulakax e Kamisk (2003), ao analisarem 14 animais não reagentes ao ELISA, detectaram pela *nested*-PCR o DNA pró-viral do VLB em dois animais, comprovando ser o diagnóstico molecular mais sensível que a sorologia e fornecer diagnóstico confiável.

Segundo Romero et al. (1983), os bezerros amamentados por vacas infectadas e ou leite contaminado pelo VLB podem se infectar. Uma forma de proceder a inativação do VLB do leite é a pasteurização lenta a 56°C por 30 min (FERRER, 1979). A forma ideal para evitar a transmissão oral pela ingestão do leite seria a amamentação de bezerros apenas em vacas não portadoras do VLB (JOHNSON; KANEENE, 1992).

A fim de evitar a transmissão iatrogênica por fômites, ao utilizar materiais cirúrgicos, tatuadores, luvas de palpação retal ou qualquer instrumento que possa ser fonte de infecção ao VLB o ideal seria a utilização de materiais descartáveis (DEL FAVA; PITUCO, 2004), porém em caso de reutilização de materiais é necessária a prévia esterilização dos mesmos com produtos a base de cloro ou iodo, já que o VLB é sensível a estes (JOHNSON; KANEENE, 1992).

O descarte dos animais infectados pelo VLB pode ser gradual, para que não tenham grandes impactos econômicos para o pecuarista (DEL FAVA; PITUCO, 2004).

Segundo Tostes (2005), a leucemia bovina é caracterizada como uma das doenças mais importantes e que geram impactos negativos na pecuária brasileira e requerem medidas de combate de extrema urgência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Este trabalho foi aprovado em 28 de março de 2012 pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB), estando registrado sob número 122/12 e atende aos princípios éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) (Anexo 1).

O laboratório de Anatomia Patológica e de Doenças Bacterianas da Reprodução, onde foram realizadas as análises anatomopatológicas e microbiológicas são certificados pela ISO 9001:2008 para o escopo: “Diagnóstico de enfermidades animais por meio de técnicas de microscopia eletrônica, anatomopatológicas, bacteriológicas e sorológicas”.

Foram encaminhados 80 fetos bovinos abortados ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico (CPDSA-IB) no período de dezembro/2007 a outubro/2012, provenientes de diferentes Estados brasileiros, para diagnóstico diferencial de causas de abortamento.

3.1.1 Necropsia Fetal

Os fetos foram registrados em livro de necropsia e preenchidas as informações de identificação (número de registro, sexo, idade aproximada, comprimento atlanto-sacral, raça), o estado de conservação (refrigerado, autolisado, congelado, mumificado), em planilha de encaminhamento para fetos ruminantes (REG-POP-026) segundo o Anexo 2.

A idade fetal foi estimada segundo Barr et al. (1990) considerando-se o comprimento atlanto-sacral seguindo a relação: 13-21cm (3 meses), 21-31cm (4 meses), 32-43cm (5 meses), 44-57cm (6 meses), 59-67cm (7 meses), 68-85cm (8 meses) e mais de 86 cm (9 meses).

As necropsias foram realizadas na sala de necropsia multiusuário do CPDSA-IB. O instrumental cirúrgico e frascos coletores estéreis para armazenagem de órgãos e líquidos foram devidamente identificados antes de qualquer procedimento. A necropsia de fetos pequenos (até três meses de gestação) foi realizada em cabine de segurança biológica previamente higienizada com álcool etílico 70% e mantida com a luz UV ligada por 15 minutos. Quando o feto era grande (mais de três meses de

gestação), o procedimento foi realizado em mesa de necropsia previamente higienizada com hipoclorito 5% (10 minutos) e enxaguada posteriormente para remoção do produto.

A avaliação macroscópica (Figura 4) foi realizada, e as alterações das mucosas, pele, subcutâneo, umbigo e períneo, malformações congênitas, traumas (fraturas, luxações ou ulcerações), eviscerações e lacerações foram descritas no REG-POP-026 (Anexo 2).

No segundo momento o animal foi colocado em decúbito lateral direito expondo a porção esquerda do corpo. A calota craniana foi rompida com serrote ou cizalha, e o SNC foi retirado com pinça e tesoura estéreis (Figura 5). Para retirada dos linfonodos cervicais superficiais foi feita incisão sobre a região pré-escapular (Figura 6). Posteriormente retirou-se com ajuda de bisturi ou faca a pele sobre o gradil costal e abdômen (Figura 7). A abertura da cavidade torácica (Figura 8) foi realizada com auxílio de uma cizalha e coletado líquido torácico (Figura 9), fragmentos de timo, coração e pulmão (Figura 10). A abertura da cavidade abdominal foi realizada com auxílio de tesoura ou bisturi e imediatamente coletado o líquido, na sequência apresentada das Figuras 11 a 13: fígado, baço, adrenal e rins. Posteriormente, com auxílio de uma seringa e agulha estéreis foi retirado o conteúdo gástrico (Figura 14).

Ao fim da necropsia, os restos fetais foram devidamente autoclavados (121°C por 15 minutos) e descartados em lixo biológico. Os órgãos e conteúdo gástrico para análise bacteriológica e os órgãos e líquidos tóraco/abdominal para análise virológica foram refrigerados e os materiais para histopatologia foram armazenados em frascos com formol 10% tamponado.



Fig. 4 - Análise externa do feto quanto a sexo, idade e possíveis lesões.

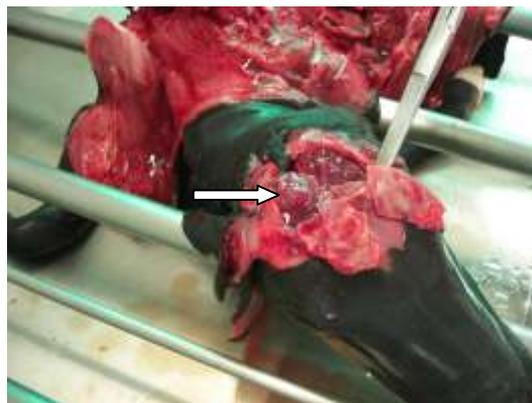


Fig. 5 - Coleta de cérebro

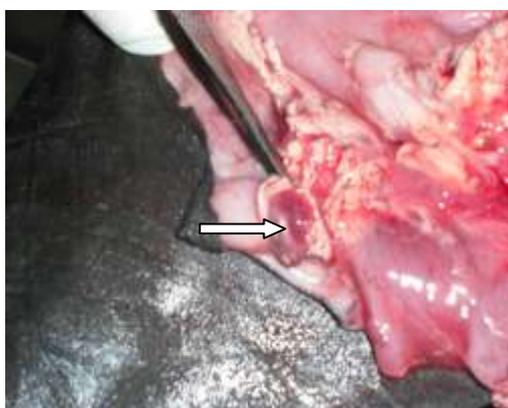


Fig. 6 - Coleta de linfonodo



Fig. 7 - Pele rebatida do gradil costal e abdômen para análise do subcutâneo



Fig. 8 - Abertura das cavidades torácica e abdominal

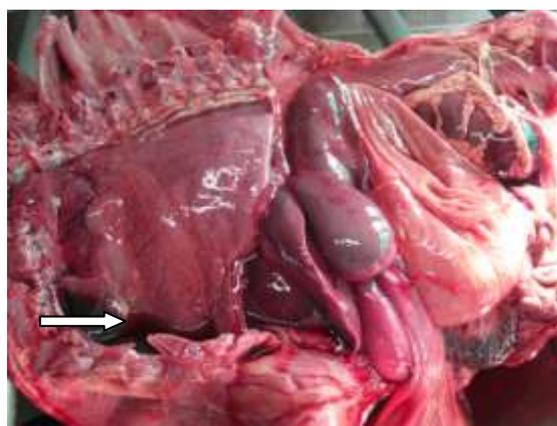


Fig. 9 - Coleta dos líquidos torácico e abdominal.



Fig. 12 - Coleta de baço

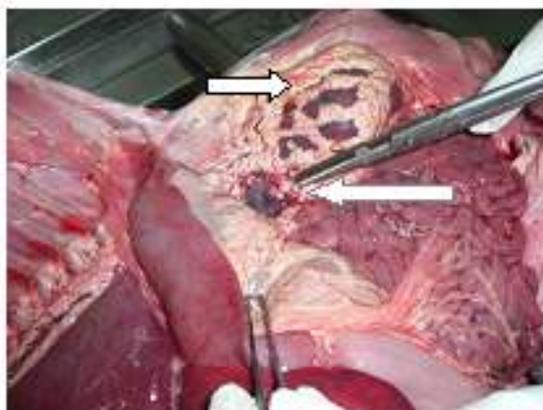


Fig. 13 - Coleta de adrenal e rim

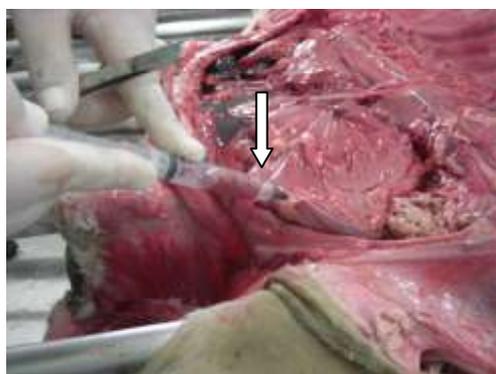


Fig. 14 - Coleta de conteúdo gástrico

3.2 EXAMES BACTERIOLÓGICOS - *Brucella* spp.

3.2.1 Isolamento

Foram semeados em duplicata 100 µL do conteúdo gástrico e 100 µL do *pool* de órgãos em meio de ágar *Brucella* (Difco®) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas por até 10 dias, a temperatura de 37°C, em estufa de aerobiose e em estufa de CO₂ (5%). Após o período de incubação, as colônias suspeitas foram identificadas pela coloração de Gram e por provas bioquímicas específicas para *Brucella* spp. Como controle positivo foi utilizado estirpe padrão *Brucella abortus* ATCC 544 (HOLT et al., 1994; OIE, 2012).

3.2.2 PCR

As amostras de conteúdo gástrico (1,0 mL) foram conservadas a -20°C até o momento da extração do DNA.

Fragmentos de rim, pulmão, baço e fígado (aproximadamente 2 gramas de cada) foram macerados conjuntamente no homogeneizador (*Stomacher* 80) de forma a obter-se um *pool* e este ressuspendido em tampão TE (10% p/v) e armazenados a -20°C até o momento da extração do DNA.

A extração do DNA foi realizada empregando-se o kit reagente DNAzol (Invitrogen®), seguindo as especificações do fabricante. O DNA extraído foi submetido à amplificação pela PCR utilizando-se de *primers* da região conservada do gene da proteína periplasmática imunogênica BCSP31 de *Brucella* spp., que corresponde a um fragmento de 223 pb (BAILY et al., 1992; CORTEZ et al., 2001).

Os *primers* empregados na amplificação do DNA, segundo Baily et al. (1992) foram: B4 (5' TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA3') e B5 (3' CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG5'). Para o volume final de reação de 50 µL, adicionados de 15 µL de água ultra-purificada (MilliQ), 5 µL de tampão 10 X (500 mM de KCL, 15 mM de MgCl₂, 100 mM de TRIS-HCL, pH 9,0); 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 8 µL da mistura de dNTPs (200 mM de cada nucleotídeo dCTP, dATP, dGTP, dTTP), 5 µL dos *primers* (B4 e B5 –10 pmol/mL de cada), 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5 U) e 10 µL da amostra de DNA extraído. No termociclador, o ciclo de amplificação foi precedido de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação divididos em quatro fases: desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento 60°C por 60 segundos, extensão 72°C por 60 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos. Como controle positivo foi utilizado estirpe padrão *Brucella abortus*, ATCC 544. Como

controle negativo foi utilizada água ultra-purificada.

A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0% com tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045 M TRIS-Borato e 1 mM de EDTA, pH 8,0) e o gel submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm. O padrão de peso molecular empregado foi de 100 bp (Invitrogen®).

O gel foi corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta (300-320 nm) pelo sistema de foto-documentação (Câmera Kodak® Digital DC/120 Zoom) e analisado com o software 1D Image Analysis (Kodak® Digital Science).

3.3 EXAMES VIROLÓGICOS- VLB

3.3.1 Reação em cadeia pela polimerase (*nested*-PCR) para o VLB

As amostras foram coletadas em *Eppendorf*® esterilizados e armazenados em freezer a -20°C.

3.3.1.2 Extração do DNA de timo, baço e linfonodo

A extração do DNA foi feita a partir de amostras de timo, baço e linfonodos utilizando o *Kit DNeasy Blood & Tissue* QIAGEN® (cat.# 69506). As extrações foram realizadas em Cabine de Biossegurança Classe II tipo B2 em sala exclusiva. Aplicou-se solução de isopropanol 70% (v/v) na superfície interna da cabine, que foi mantida com a luz ultravioleta (UV) ligada por 15 minutos. Em um tubo cônico de 1,5 mL (*Eppendorf*®) foram adicionados 25 mg dos tecidos em pedaços pequenos e acrescidos 180 µL de tampão ATL e 20 µL de proteinase K. Cada amostra foi incubada à 56°C por aproximadamente 1-3 horas, ou até que a amostra estivesse digerida. Após o período de incubação, as amostras foram agitadas em vórtex para homogeneizar a amostra. Após o período de incubação foram adicionados 200 µL de tampão AL agitado em vórtex. Em seguida, foram acrescidos 200 µL de etanol absoluto (96-100%) passando novamente por agitação. O conteúdo do tubo *Eppendorf*® foi aplicado na coluna (*DNeasy Mini Spin Column*), incluindo também o precipitado, se houvesse e centrifugado a 12.000 rpm por 2 min. A coluna foi colocada em um novo tubo de 2 mL onde foram adicionados 600 µL de tampão AW1 e centrifugado a 12.000 rpm/2 min. Após o período de centrifugação, o filtrado foi desprezado. A coluna foi novamente trocada para um tubo limpo de 2 mL e acrescidos 600 µL de tampão AW2 e submetida a centrifugação a 12.000 rpm/4 min. e descartado

o filtrado. Para que a secagem da coluna fosse evidente, foi feita uma nova centrifugação a 12.000 rpm/2 min. A coluna seca foi passada para um novo tubo de 1,5 mL e adicionados 200 µL de tampão AE diretamente na membrana da coluna DNeasy. Após a aplicação do tampão, as colunas ficaram incubando por 5 min. a temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 rpm/2 min, para eluição do DNA.

3.3.1.3 Extração do DNA líquido tóraco/abdominal

A extração do DNA foi feita a partir de amostras de líquido tóraco/abdominal utilizando o *Kit DNeasy Blood & Tissue* QIAGEN® (cat.# 69506). Em um tubo cônico de 1,5 mL (*Eppendorf*®) foram adicionados 20 µL de proteinase K, 100 µL de líquido tóraco/abdominal, 100 µL de PBS e acrescidos 200 µL de tampão AL. Cada amostra foi agitada em vórtex e incubada à 56°C por aproximadamente por 10 minutos. Após o período de incubação, foram adicionadas 200 µL de etanol absoluto (96-100%) e as amostras foram agitadas em vórtex. O conteúdo do tubo *Eppendorf*® foi aplicado na coluna (*DNeasy Mini Spin Column*), e centrifugado a 8.000 rpm por 1 min. A coluna foi colocada em um tubo limpo de 2 mL onde foram adicionados 500 µL de tampão AW1 e centrifugado a 8.000 rpm/1 min. Após o período de centrifugação, o filtrado foi desprezado. A coluna foi novamente trocada para um tubo limpo de 2 mL e acrescidos 500 µL de tampão AW2 e submetida a centrifugação a 14.000 rpm/3 min. e descartado o filtrado. Para que a secagem da coluna fosse evidente, foi feita uma nova centrifugação a 12.000 rpm/2 min. A coluna seca foi passada para um novo tubo de 1,5 mL e adicionados 200 µL de tampão AE diretamente na membrana da coluna DNeasy. Após a aplicação do tampão, as colunas ficaram incubando por 5 min. a temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 rpm/2 min, para eluição do DNA.

Após a extração do DNA das amostras de timo, baço, linfonodo e líquido tóraco/abdominal foram realizadas a primeira e segunda amplificação da *nested*-PCR.

As amostras foram submetidas à amplificação do segmento que codifica a gp51 do gene *env* de VLB pela técnica de *nested*-PCR, empregando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos que amplificam um segmento de 444 pares de base (pb), descritos por Beier et al. (2001) (Quadro 3).

Para o controle positivo utilizou-se uma amostra de cultivo de linhagem celular contínua FLK (*Fetal Lamb Kidney*) persistentemente infectada pelo VLB, e para controles negativos da reação, foram utilizados em colunas separadas cultura de células de linhagem contínua VERO (células de rim de macaco verde) sabidamente negativas ao VLB e água ultra-pura.

Para a amplificação, os reagentes e as amostras extraídas foram mantidas em banho de gelo durante todo o procedimento. As condições da *nested*-PCR na primeira e segunda amplificação estão descritas nos Quadros 4 e 5, respectivamente.

Na primeira amplificação foi utilizado para um volume de 20 μL de mix 6,5 μL de *Nuclease-Free Water*, 12,5 μL de tampão PCR (Master Mix – Promega® cat. # M7502), 0,5 μL de *primer* VLB1 e 0,5 μL de *primer* VLB2 para 5 μL de DNA. Os tubos foram colocados no termociclador programado com o ciclo (Quadro 4).

Na 2ª amplificação de acordo com as instruções do fabricante, para cada amostra foram utilizados 22 μL de mix contendo 9,0 μL de *Nuclease-Free Water*, 12,5 μL de tampão PCR (*GoTaq Green Master Mix* – Promega® cat. # M7122), 0,25 μL de *primer* VLB3, 0,25 μL de *primer* VLB4 e 3 μL do produto da primeira amplificação. Os tubos foram colocados no termociclador programado com o ciclo (Quadro 5).

Depois do fim do ciclo, o material foi armazenado a -20°C , por até no máximo uma semana quando a eletroforese não foi feita no mesmo dia.

Quadro 3 - *Primers* usados na PCR para diagnóstico do VLB (BEIER et al., 2001)

<i>Primers</i>	Sequência de nucleotídeos (5'- 3')	Posição e orientação na sequência alvo	Fragmento amplificado (pb)
Externos: VLB1 VLB2	TCT GTG CCA AGT CTC CCA GAT A AAC AAC AAC CTC TGG GAA GGG T	<i>env</i> 5035 => 5055 <i>env</i> 5442 <= 5462	598
Internos: VLB3 VLB4	CCC ACA AGG GCG GCG CCG GTT T GCG AGG CCG GGT CCA GAG CTG G	<i>env</i> 5065 => 5094 <i>env</i> 5377 <= 5400	444

Para a análise dos produtos amplificados foi realizada a eletroforese (100V/60min) em gel de agarose *low melting* (Cat. # V 31125 Promega® Corporation a 1,5% em tampão TAE 1x (Tris-acetate-EDTA; Cat. #V4281 pH 8,2-8,4). As amostras de DNA foram coradas com 1 μL de gel *red* (Biotium®) diluído em água ultra-pura a 1:150 e 2 μL de *Loading (6X) Thermo Scientific*®. Por fim, foi utilizado o marcador de 100pb (Fermentas®). O gel foi visualizado sob luz UV (320nm) e registrado em fotodocumentador *Alphamager™ 1220 Documentation & Analysis System* (Alpha Innotech Corporation®).

Quadro 4 - Primeira amplificação para o VLB seguindo protocolo de Beier et al. (2001)

1ª Amplificação		Beier et al. (2001)	
Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
1 ciclo	desnaturação inicial	94	2 min
40 ciclos	desnaturação	95	30 seg
	anelamento	62	30 seg
	extensão	72	1 min
1 ciclo	extensão final	72	4 min
Hold	manter	4	∞

Quadro 5 – Segunda amplificação para o VLB seguindo protocolo de Beier et al.(2001)

2ª Amplificação		Beier et al., 2001	
Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
1 ciclo	desnaturação inicial	94	2 min
40 ciclos	desnaturação	95	30 seg
	anelamento	70	30 seg
	extensão	72	1 min
1 ciclo	extensão final	72	4 min

3.4 SEQUENCIAMENTO

As amostras positivas para a *nested*-PCR foram sequenciadas. Inicialmente foram purificadas com KIT QIAQUICK (Qiagen ®, PCR Purification Kit 250 – cat. #28106) e sequenciadas pelo método de terminação de cadeia com dideoxynucleotídeos marcados com fluoróforos. Utilizou-se 50 µL do produto de PCR, 4 µL de cada um dos *primers* utilizados na PCR (concentração final de 3,2 µM), para um volume total de 10 µL, 3 µL *sequencing buffer* 5 (concentração 5X) e 1 µL do reagente *BigDye* 3.1 (Applied Biosystems®). Em cada amostra foi realizado o sequenciamento com os *primers forward* e *reverse*, ou seja, em ambos os sentidos. Cada amostra foi incubada em termociclador (*Mastercycler* da *Eppendorf*®) por 35 ciclos de 95°C/10s - 60°C/4 min. O produto da amostra do sequenciamento foi precipitado pela adição de 40 µL de isopropanol 75% e submetido à centrifugação em centrífuga refrigerada (Herolab®) a 3.220 G (3.000 rpm) por 40 min. à temperatura ambiente. Após a centrifugação foi feito o descarte do sobrenadante e a placa foi envolvida em papel absorvente e submetida à centrifugação a 3.000 r.p.m. por 90 segundos para retirar isopropanol residual. Em seguida foram acrescentados 100 µL de isopropanol 75% para lavagem do precipitado, e novamente feito o descarte do sobrenadante sem necessidade de nova centrifugação.

O precipitado foi seco pela incubação em estufa a 37°C por 10 min e ressuspenso em 10 µL de formamida Hi-DI (*Applied Biosystems*®) desnaturado a 95°C por 2 min. e submetido à eletroforese capilar em Sequenciador 3500 XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®).

3.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Dos materiais positivos a *nested*-PCR, no total oito amostras (sete amostras de órgãos fetais e uma placenta) tiveram DNA suficiente para fazer o sequenciamento. As amostras foram analisadas no programa Bioedit v.7.0.9 (HALL, 1999) para a geração de sequência única a partir dos dados e depois submetidas ao *Blast* da NCBI para comparar às sequências depositadas no *GenBank*. Posteriormente foram alinhadas utilizando-se o software ClustalW versão 1.8.3 (HALL, 1999). Para construção da árvore filogenética e distância utilizou-se o programa MEGA versão 5.0.

As sequências recuperadas do *GenBank* e de isolados brasileiros encontram-se dispostas no Quadro 6 e foram incluídas para determinação de matrizes de identidade nucleotídica, utilizando o software Bioedit v.7.0.9 (HALL, 1999).

Para a construção da árvore utilizou-se o método de Máxima Verossimilhança para a região parcial (356 nt) do gene env gp 51 dos VLB empregando *bootstrap* de 1000 réplicas no *software* MEGA v. 5.0.

Quadro 6 – Sequências do VLB recuperadas do *GenBank* utilizadas para a realização da genealogia, dispondo o número de acesso, país de origem do estudo e o genótipo determinado (CAMARGOS et al. 2002; CAMARGOS et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2009; MORATÓRIO et al., 2010.; D'ANGELINO et al., 2013).

Número de acesso	Origem	Genótipo
FJ808576.1	Argentina	1
FJ808575.1	Argentina	1
FM209469.1	Uruguai	1
FM209475.1	Uruguai	1
JN254640.1	Brasil	1
JN254636.1	Brasil	1
AY228480.2	Brasil	1
FJ808578.1	Argentina	1
AF399702.3	Brasil	5
JN254634.1	Brasil	5
JN254633.1	Brasil	6
JN254635.1	Brasil	6
JN254637.1	Brasil	6
JN254638.1	Brasil	6
JN254639.1	Brasil	6
FJ808582.1	Argentina	6
AY185360.2	Brasil	6

3.6 HISTOTÉCNICA

Após a fixação das amostras fetais em formalina 10% tamponada, os órgãos materiais foram cortados em fragmentos menores e submetidos a exames histopatológicos, segundo Prophet et al. (1992).

Os fragmentos de timo, baço, linfonodos, pulmão, coração, fígado, rim, adrenal, medula espinhal e SNC foram submetidos à desidratação em soluções de álcool etílico em concentrações crescentes, diafanização pelo xilol e embebição em parafina (Quadro 7) adaptado de Prophet et al. (1992). Por fim os fragmentos foram emblocados em cassetes histológicos e parafina e identificados.

Quadro 7 - Protocolo de desidratação, diafanização e embebição por parafina de órgãos fetais modificado de Prophet et al. (1992).

Reagente	Tempo
1. Álcool 70% I	1 hora
2. Álcool 80% I	1 hora
3. Álcool 95% I	0,5 hora
4. Álcool 95% II	0,5 hora
5. Álcool absoluto I	1 hora
6. Álcool absoluto II	1 hora
7. Xilol I	1 hora
8. Xilol II	1 hora
9. Xilol III	1 hora
10. Parafina líquida a 63°C	1 hora
11. Parafina líquida a 63°C	1,5 hora

As amostras emblocadas nos cassetes foram cortadas em micrótomo (4µm de espessura), estendido em banho-maria a 63°C e colocado em lâmina de vidro que estava previamente tratada com albumina, que ajuda o tecido cortado a aderir a lâmina. As lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em estufa a 63°C *overnight* e posteriormente segundo o protocolo de Prophet et al. (1992) com modificações foram submetidas a desparafinização (xilol), hidratação em álcoois e água, coloração pela HE, desidratação em álcoois e diafanização em xilol (Quadro 8). Depois do processo de coloração foi feita a montagem de lâmina e lamínula com auxílio de resina sintética (Entellan – Merck®). Por fim as lâminas foram analisadas em microscópio óptico comum (Leica®).

Quadro 8 - Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização de lâminas de vidro com fragmentos de tecidos cortados em micrótomo, modificado de Prophet et al. (1992).

Reagente	Tempo
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Álcool absoluto	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 80%	2 minutos
Álcool 70%	1 minuto
Água corrente	Imergir rapidamente
Hematoxilina	30 segundos
Água corrente	Lavar 15 minutos em água corrente
Eosina	2 minutos
Água corrente	Imergir rapidamente
Álcool 70%	Imergir rapidamente
Álcool 80%	1 minuto
Álcool 90%	1 minuto
Álcool absoluto I	5 minutos
Álcool absoluto II	5 minutos
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos

3.7 IMUNODIAGNÓSTICO FETAL

O teste de ELISA indireto empregou o *Chekit* Leucose Serum Iddexx® Laboratories* que é um ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos contra o VLB nos fluídos das cavidades pleural e ou peritoneal.

Antes de começar a reação, todos os reagentes foram retirados da geladeira para alcançarem temperatura ambiente (18-25°C) e foram agitados delicadamente por movimentos circulares ou com um aparelho de vórtex.

Em uma placa comum as amostras foram diluídas em uma razão de 1:10 para fluído das cavidades torácica/abdominal com diluente do kit. Foram transferidos 100µL de cada amostra diluída para uma placa de 96 cavidades revestida de antígeno. O controle negativo foi colocado nas cavidades A1 e B1 e o controle positivo nas cavidades C1 e D1. Agitou-se a placa lentamente e depois foi incubada durante 60 min. à temperatura de 37°C. A placa foi selada para evitar a evaporação. Após a incubação ocorreu o processo de lavagem onde primeiramente todo o conteúdo foi descartado e cada cavidade foi lavada com aproximadamente 300µL de solução tampão de lavagem por três vezes, seguida pela secagem sobre papel absorvente de modo delicado, a fim de eliminar todo o resíduo.

Após lavagem e secagem da placa, em cada cavidade foram acrescentados 100µL de conjugado CHEKIT *Anti-Ruminant-IgG-PO* e a placa foi incubada novamente durante 60 minutos à 37°C. Repetiu-se o mesmo processo de lavagem e acrescentou-se 100µL de substrato cromógeno 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) em cada cavidade da placa, que novamente foi incubada por 15 minutos de temperatura ambiente (18°C - 25°C). Por fim, adicionou-se 100µL de solução de interrupção (*stop solution*) em cada cavidade da placa para finalizar a reação e a placa foi levada a uma leitora de ELISA (Modelo Multiskan Ascent, Thermo Labsystems®), que indicou os valores de absorbância de cada amostra, selecionando filtro para comprimento de onda 450 nm. Para validar o ensaio, a densidade óptica (DO) do controle positivo não pode exceder 2,0 e a DO para o controle negativo não deve exceder 0,5 e a diferença entre o controle positivo e o negativo deve ser $\geq 0,3$.

Para interpretar o resultado da amostra (negativo, suspeito ou positivo), a leitora de ELISA está conectada a um computador que possui um *software*. Este programa analisa a DO de cada amostra individualmente, em relação aos controles positivo e negativo por meio da fórmula:

$$\text{Valor (\%)}: \frac{\text{DO amostra} - \text{DO}_{\text{neg}}}{\text{DO}_{\text{pos}} - \text{DO}_{\text{neg}}} \times 100\%$$

O resultado final da análise é emitido em % e interpretado segundo o Quadro 9:

Quadro 9 - Interpretação dos valores de DO em % das amostra individuais submetidas ao ELISA CHEKIT Leucose serum da Idexx®.

Valor	< 30%	≥30% a <40%	≥40%
Interpretação	Negativo	Suspeito	Positivo

3.8 OUTRAS ANÁLISES DIFERENCIAIS DE ABORTAMENTO

3.8.1 Bactérias aeróbicas

No exame bacteriológico diferencial para outros agentes que não a *B. abortus* foram processados conteúdo abomasal e órgãos de fetos bovinos abortados, que foram submetidos às técnicas bacteriológicas para isolamento e identificação de bactérias aeróbias (Enterobactérias e cocos gram-positivos) e microaerófilas (*Campylobacter* spp., *Histophilus somni* e *Listeria monocytogenes*), segundo Kirkbride (1990), Scarcelli et al. (2004) e OIE (2012). Para *Leptospira* spp. foi realizada PCR segundo Scarcelli et al. (2004). Foram considerados como possíveis causas de abortamento os microrganismos isolados em cultura pura ou preponderantes.

3.8.2 *Neospora caninum*

O diagnóstico do *N. caninum* foi realizado em órgãos fetais abortados pela técnica da *nested*-PCR segundo Cabral et al. (2009).

3.8.3 Herpesvírus Bovino (BoHV) e Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)

O diagnóstico do BoHV foi realizado em órgãos fetais abortados pela técnica da *nested*-PCR segundo Rocha et al. (1998).

O diagnóstico do BVDV foi realizado em órgãos fetais abortados pela técnica da PCR segundo Weinstock; Bhudevi; Castro (2008).

4.0 RESULTADOS

4.1 Histopatologia X *nested*-PCR X ELISA

O diagnóstico diferencial de causas de abortamento bovino foi realizado em 80 fetos e os dados foram tabulados levando em consideração positividade e negatividade ao VLB (Tabela 1).

A co-infecção do VLB com outros patógenos ocorreu em 23,07% (3/13), especificamente para *Klebsiella* spp. – 7,69% (1/13), *Arcanobacterium pyogenes* – 7,69% (1/13) e *Streptococcus* spp. -7,69% (1/13) em cultura pura. Por outro lado, em 17,91% (12/67) dos fetos negativos para o VLB foi diagnosticado outro patógeno possível causador de abortamento, e considerando todos os fetos abortados (positivos e negativos ao VLB) foi identificado qualquer patógeno em 18,75% (15/80), sendo que na maior parte dos fetos abortados - 81,25% (65/80) não se conseguiu identificar um patógeno associado (Tabela 1).

Tabela 1– Diagnóstico diferencial de outros patógenos identificados nas amostras fetais positivas e negativas para VLB (São Paulo, 2013).

Patógenos	POSITIVO VLB % (subtotal /total)	NEGATIVO VLB % (subtotal /total)	% (subtotal /total)
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	7,69 (1/13)	1,49 (1/67)	2,50 (2/80)
<i>Brucella abortus</i>	0	1,49 (1/67)	1,25 (1/80)
<i>Klebsiella</i> spp.	7,69 (1/13)	0	1,25 (1/80)
<i>Streptococcus</i> spp.	7,69 (1/13)	0	1,25 (1/80)
<i>Neospora caninum</i>	0	5,97 (4/67)	5,00 (4/80)
BVDV	0	4,48 (3/67)	3,75 (3/80)
<i>Escherichia coli</i>	0	2,98 (2/67)	2,50 (2/80)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	1,49(1/67)	1,25 (1/80)
BoHV	0	0	0
<i>Leptospira</i> spp.	0	0	0
TOTAL	23,07 (3/13)	17,91 (12/67)	18,75 (15/80)

As 80 amostras negativas para brucelose foram submetidas ao diagnóstico do VLB como segue: todos os órgãos que foram coletados na necropsia foram avaliados pela histopatologia, os órgãos linfáticos (timo, baço e linfonodo) foram avaliados pela *nested*-PCR, e líquido tóraco-abdominal foi avaliado por ELISA e *nested*-PCR.

Dentre os 80 fetos submetidos à *nested*-PCR - 16,25% (13/80) foram positivos ao VLB. A reação da *nested*-PCR positiva ao VLB apresentou bandas de amplificação em 444pb conforme ilustrado na figura 15:

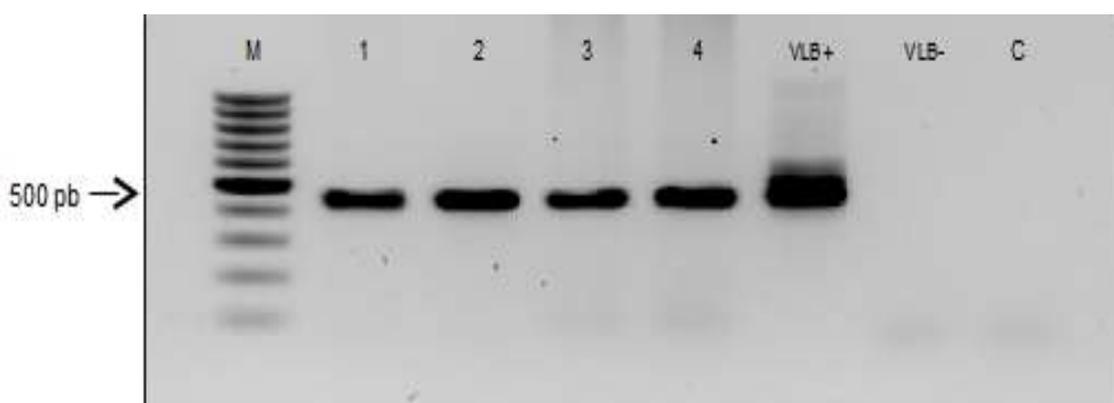


Figura 15 - Imagem de gel de agarose, representativa de amostras de tecidos fetais submetidas à *nested*-PCR linhas 1-4. Controle positivo VLB+ (linhagem celular *Fetal Lamb Kidney* sabidamente infectada com VLB) e Controle negativo VLB- (células VERO negativas ao VLB) e M (marcado de peso molecular 100pb); C- controle negativo (água ultrapura).

Nenhuma amostra de líquido tóraco-abdominal foi positiva no ELISA, demonstrando que o uso desta técnica neste material foi ineficaz para o imunodiagnóstico fetal. Porém foi possível detectar DNA pró-viral em duas destas amostras e nos órgãos do sistema linfático fetal (Tabela 2).

Considerando isoladamente cada órgão linfóide, os órgãos que apresentaram maior frequência de positividade ao VLB pela *nested*-PCR foram o timo - 40,00% (8/20) e o baço - 35,00% (7/19), e também foram os órgãos mais frequentes enviados para análise - 95,00% (76/80) (Tabela 2).

Tabela 2 – Positividade de órgãos do sistema linfático e líquido tóraco-abdominal para a *nested*-PCR (São Paulo, 2013).

Material	% (amostras encaminhadas/total fetos)	% (subtotal amostras positivas /total amostras positivas)
Líquido tóraco-abdominal	72,50 (58/80)	10,00 (2/20)
Linfonodo	70,00 (56/80)	15,00 (3/20)
Baço	95,00 (76/80)	35,00 (7/20)
Timo	95,00 (76/80)	40,00 (8/20)
TOTAL	(266 / 80)	100,00% (20/20)

Considerados os órgãos e líquido tóraco-abdominal de cada feto que foi enviado para análise, a positividade em um ou mais órgãos linfóides na *nested*-PCR ocorreu apenas no timo - 30,77% (4/13), seguida pelo baço - 23,08 % (3/13), e menor frequência nas associações líquido tóraco-abdominal e baço - 15,39% (2/13), sendo iguais para as associações líquido tóraco-abdominal+baço+timo, linfonodo+timo e baço+timo, com a frequência - 7,69% (1/13). Depreende-se que, ao necropsiar o feto, aumenta-se a chance de diagnosticar o VLB quando se coletam todos estes materiais, porque em pouco mais da metade dos fetos - 53,85% (7/13) o vírus foi detectado somente no timo ou no baço e esta possibilidade aumentou com as associações, como demonstrado na frequência acumulada (Tabela 3).

Tabela 3 - Fetos positivos à *nested*-PCR para VLB considerando os órgãos positivos (São Paulo, 2013).

Materiais analisados por feto	Fetos positivos % (subtotal/total)	Frequência acumulada %
Líquido tóraco-abdominal	0 (0/13)	0
Linfonodo	0 (0/13)	0
Baço	23,08 (3/13)	23,08
Timo	30,77 (4/13)	53,85
Liq. Tóraco-abdominal+ linfonodo	0 (0/13)	53,85
Liq. Tóraco-abdominal+ baço	15,39 (2/13)	69,24
Liq. Tóraco-abdominal + timo	0 (0/13)	69,24
Liq. Tóraco-abdominal + linfonodo + baço + timo	0 (0/13)	69,24
Liq. Tóraco-abdominal + baço + timo	7,69 (1/13)	76,93
Linfonodo + baço	0 (0/13)	76,93
Linfonodo + timo	7,69 (1/13)	84,62
Baço + timo	7,69 (1/13)	92,31
Baço + timo + linfonodo	0 (0/13)	92,31
Timo+ linfonodo	7,69 (1/13)	100,00
TOTAL	100,00 (13/13)	100,00 (13/13)

Foi possível evidenciar um elevado número de amostras dos tecidos fetais com infiltrado inflamatório mononuclear, sugerindo processo infeccioso a esclarecer nos fetos negativos para VLB. Estes agentes puderam ser identificados conforme dados da Tabela 1: *Arcanobacterium pyogenes* – 1,49% (1/67), *Brucella abortus* – 1,49% (1/67), *Neospora caninum* – 5,97% (4/67), BVDV – 4,48% (3/67), *Escherichia coli* – 2,98% (2/67) e *Staphylococcus aureus* – 1,49% (1/67), e zero para BoVH-1 e *Leptospira* spp. Por outro lado, as alterações histopatológicas nos fetos positivos ao VLB, que foram confirmadas pela *nested*-PCR são de padrão mononuclear, sugerindo haver um agente etiológico envolvido.

As amostras positivas e negativas ao VLB apresentaram achados característicos de infiltrado inflamatório mononuclear em diversos órgãos, reação de polpa branca esplênica e hiperplasia linfóide ganglionar (Figuras 16, 17,18,19 e 20):

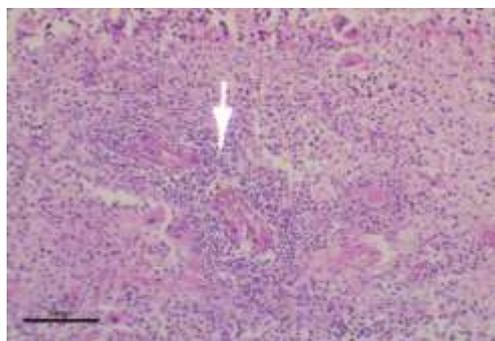


Figura 16 - Moderada reação de polpa branca esplênica. Baço fetal bovino, positivo para o VLB, com acúmulo de células inflamatórias mononucleares (linfócitos B) em volta da arteríola central esplênica (São Paulo, 2013).

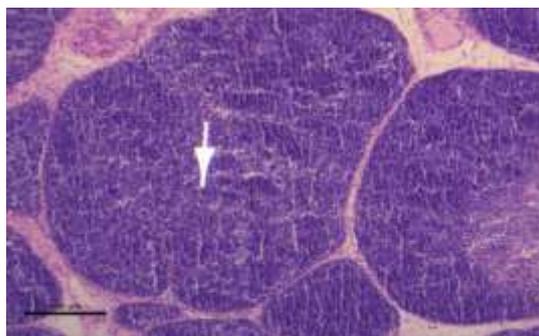


Figura 17 - Hiperplasia linfóide tímica. Timo fetal bovino positivo para VLB com aparente reação de hiperplasia (São Paulo, 2013).

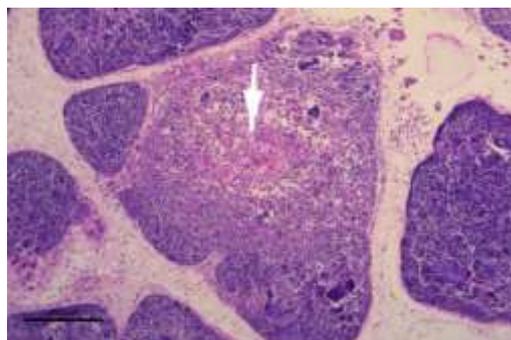


Figura 18 - Timo fetal bovino negativo para VLB, sem hiperplasia (São Paulo, 2013).

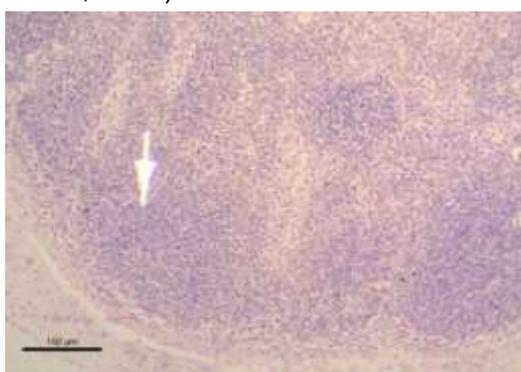


Figura 19 - Hiperplasia linfóide ganglionar. Linfonodo Fetal Bovino positivo para o VLB, com hiperplasia cortical caracterizando processo infeccioso (São Paulo, 2013).

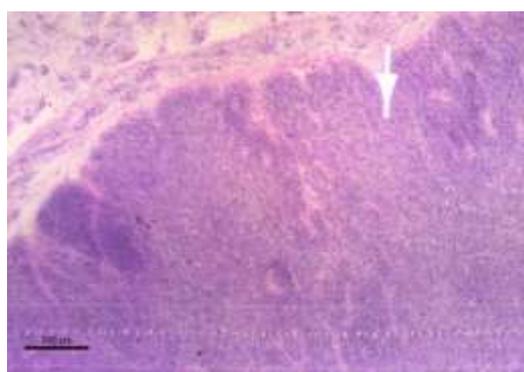


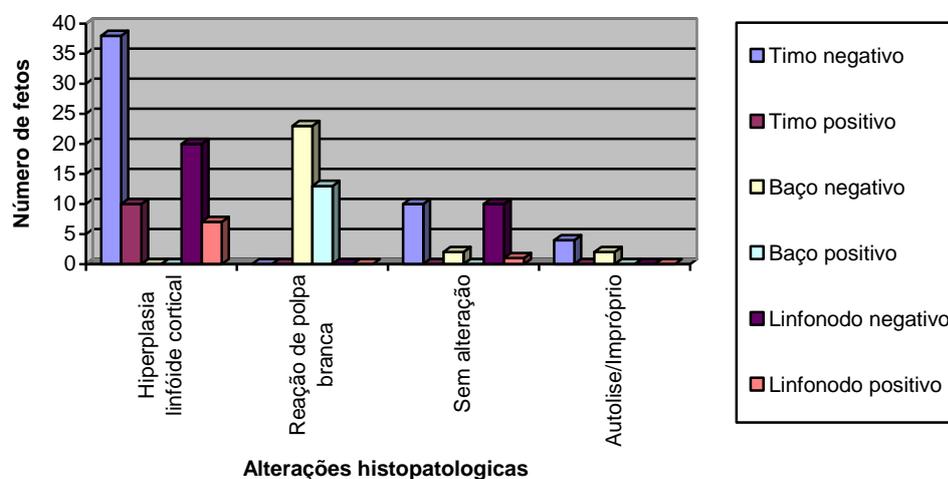
Figura 20 - Linfonodo Fetal Bovino, negativo para o VLB, sem hiperplasia linfóide (São Paulo, 2013).

Todos os fetos negativos e positivos à *nested*-PCR para o VLB apresentaram algum tipo de alteração nos órgãos linfóides (Tabela 4). Nos fetos positivos para VLB, foi observada no timo hiperplasia linfóide cortical em 15,88% (10/63), no linfonodo hiperplasia linfóide cortical em 21,05% (7/38) e no baço hiperplasia de polpa branca em 31,71% (13/41).

Tabela 4 – Frequência de alterações histopatológicas observadas nos órgãos linfóides de fetos positivos e negativos ao VLB pela *nested*-PCR (São Paulo, 2013).

Lesão	Timo		Baço		Linfonodo	
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
Hiperplasia Linfóide Cortical	38	10	-	-	20	7
Reação polpa branca	-	-	23	13	-	-
Sem alteração	11	0	3	0	10	1
Autólise/impróprio	4	0	2	0	0	0
Total	63		41		38	
%	84,12	15,88	68,29	31,71	78,95	21,05

Gráfico 1- Frequência de alterações histopatológicas observadas nos órgãos linfóides de fetos positivos e negativos ao VLB pela *nested*-PCR (São Paulo, 2013).

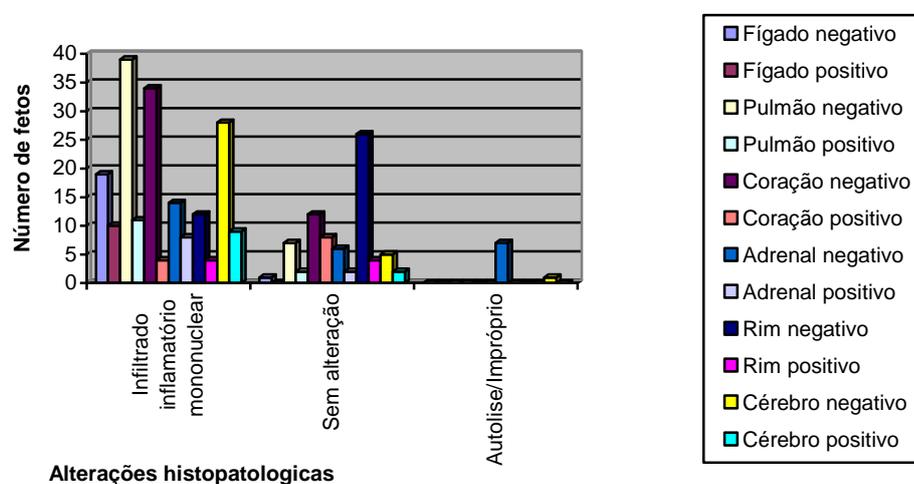


Observou-se pela histopatologia, infiltrado inflamatório mononuclear em outros órgãos além do linfático, como fígado, pulmão, coração, adrenal, rim e cérebro de fetos positivos e negativos à *nested*-PCR para o VLB, sugerindo abortamento infeccioso por outros agentes (Tabela 5).

Tabela 5 – Frequência de alterações histopatológicas observadas no fígado, pulmão, coração, adrenal, rim e cérebro de fetos positivos e negativos ao VLB pela *nested*-PCR (São Paulo, 2013).

Lesão	Fígado		Pulmão		Coração		Adrenal		Rim		SNC	
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
Autólise/impróprio	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	1	-
Sem alterações	2	---	8	2	13	8	7	2	27	4	6	2
Infiltrado inflamatório mononuclear	19	10	39	11	34	4	14	8	12	4	28	9
TOTAL	31		60		59		38		47		46	
%	67,74	32,26	78,33	21,67	79,66	20,34	73,68	26,32	82,97	17,03	76,08	23,92

Gráfico 2 – Frequência de alterações histopatológicas observadas no fígado, pulmão, coração, adrenal, rim e cérebro de fetos positivos e negativos ao VLB pela *nested*-PCR (São Paulo, 2013).



A presença de alterações histopatológicas (infiltrado mononuclear) foi observada em 100,00% dos fetos positivos ao VLB pela *nested*-PCR, enquanto que 95,52% (64/67) dos fetos negativos ao VLB apresentaram lesões (Tabela 6), sugerindo aborto infeccioso por outros agentes.

Tabela 6 – Resultado da *nested*-PCR associado à presença ou ausência de lesões histopatológicas (São Paulo, 2013).

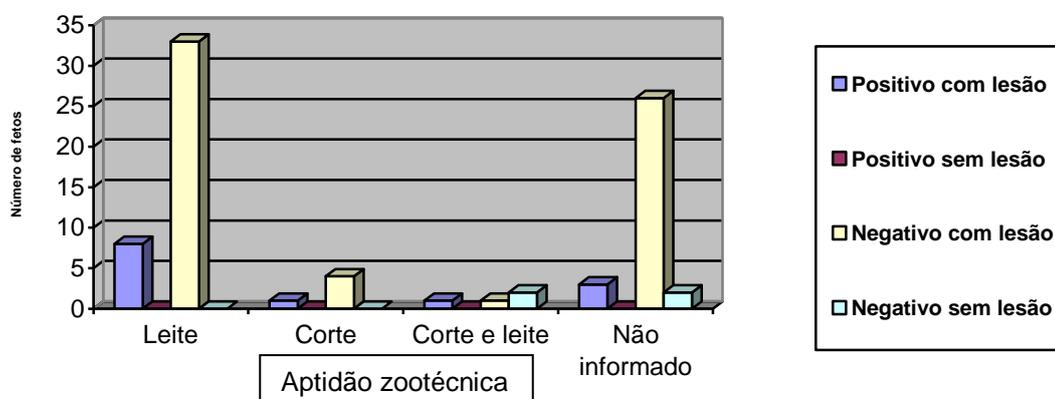
Resultado <i>nested</i> -PCR	Histopatológico		% (Subtotal)
	Com lesão % (subtotal)	Sem lesão % (subtotal)	
Positivo	100,00 (13/13)	0	16,25 (13/80)
Negativo	95,52 (64/67)	4,48 (3/67)	83,75 (67/80)
Total	77	3	80

Quando considerada a aptidão do rebanho que originou a amostra, observou-se que a maioria dos fetos foi de origem leiteira – 51,25% (41/80) e que o maior número de fetos positivos ao VLB (todos apresentavam lesão) pertencia a esta categoria – 61,54% (8/13). Em um número considerável de amostras não foi informada a aptidão - 38,75% (31/80), havia um número reduzido de aptidão de corte - 7,50% (6/80) e baixa amostragem de fetos considerados como aptidão corte/leite -2,50% (2/80) (Tabela 7, Gráfico 3).

Tabela 7 - Correlação entre o resultado positivo e negativo a *nested*-PCR, presença ou ausência de lesões e diferentes aptidões zootécnicas (São Paulo, 2013).

Aptidão	Fetos		Fetos		% (subtotal/total)
	Positivos <i>nested</i> -PCR		Negativos <i>nested</i> -PCR		
	Com lesão % (subtotal/total)	Sem lesão	Com lesão % (subtotal/total)	Sem lesão	
Leite	61,54 (8/13)	0	51,56 (33/64)	0	51,25 (41/80)
Corte	7,69 (1/13)	0	6,25 (4/64)	33,33 (1/3)	7,50 (6/80)
Corte e Leite	7,69 (1/13)	0	1,56 (1/64)	0	2,50 (2/80)
Não Informado	23,08 (3/13)	0	40,62 (26/64)	66,66 (2/3)	38,75 (31/80)
Total	100,0% (13)	0% (0)	100,0% (64)	100,0% (3)	100,0% (80)

Gráfico 3 - Correlação entre o resultado positivo e negativo a *nested*-PCR, presença ou ausência de lesões e diferentes aptidões zootécnicas (São Paulo, 2013).

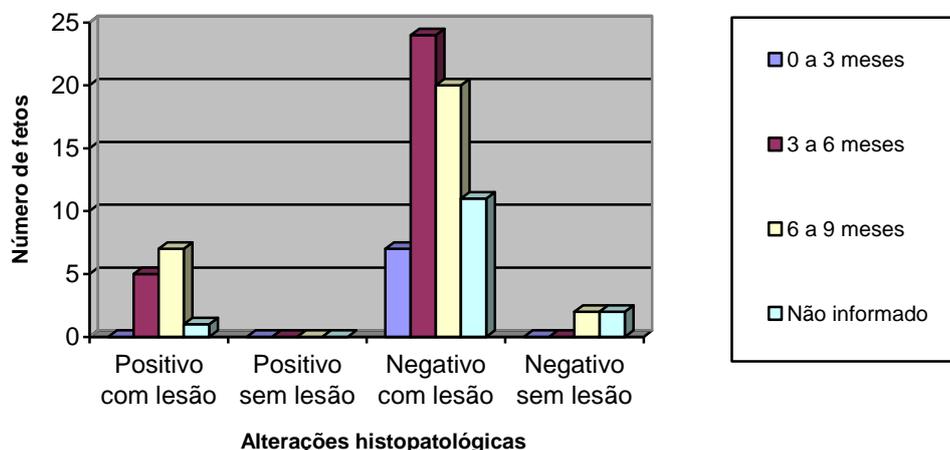


Quando considerada a idade aproximada dos fetos abortados em faixas etárias, observou-se que a maioria dos fetos abortados positivos à *nested*-PCR situaram-se na faixa etária de 3 a 6 meses – 38,46% (5/13) seguido por 6 a 9 meses – 53,85% (7/13), todos com lesões na histopatologia (Tabela 8, Gráfico 4).

Tabela 8 - Correlação entre o resultado positivo e negativo à *nested*-PCR, presença ou ausência de lesões e diferentes faixas etárias (São Paulo, 2013).

Faixa etária	Fetos		Fetos		%(subtotal/total)
	Positivos <i>nested</i> -PCR		Negativos <i>nested</i> -PCR		
	Com lesão %(subtotal/total)	Sem lesão	Com lesão %(subtotal/total)	Sem lesão	
0 a 3	0	0	10,94 (7/64)	0	8,75 (7/80)
3 a 6	38,46 (5/13)	0	39,06 (25/64)	0	37,50 (30/80)
6 a 9	53,85 (7/13)	0	32,81 (21/64)	75,00 (2/3)	37,50 (30/80)
Não informado	7,69 (1/13)	0	17,19 (11/64)	25,00 (1/3)	16,25 (13/80)
Total	100,00% (13)	0% (0)	100,00% (64)	100,00% (3)	100,00% (80)

Gráfico 4 – Demonstrativo da idade dos fetos positivos e negativos para VLB pela *nested*-PCR segundo presença ou ausência de alterações histopatológicas (São Paulo, 2013).



A amostragem de fetos bovinos abortados foi de conveniência, sendo oriunda de rebanhos bovinos de oito Estados Brasileiros. A maior parte dos materiais originou-se do Estado de São Paulo – 48,75% (39/80) e Minas Gerais – 30,00% (24/80), onde também foi verificada a maior taxa de positividade para o VLB pela *nested*-PCR em São Paulo - 8,75% (7/80) e Minas Gerais – 5,00% (4/80) (Tabela 9).

Tabela 9 – Distribuição de fetos abortados positivos ao VLB pela *nested*-PCR quanto aos Estados de origem da amostra (São Paulo, 2013).

ESTADOS	Amostras encaminhadas % (subtotal)	Amostras positivas <i>nested</i> -PCR % (subtotal)
Bahia	3,75 (3)	1,25 (1)
Distrito Federal	1,25 (1)	0,00 (0)
Espírito Santo	1,25 (1)	0,00 (0)
Goiás	6,25 (5)	1,25 (1)
Minas Gerais	30,00 (24)	5,00 (4)
Mato Grosso	1,25 (1)	0,00 (0)
Paraná	5,00 (4)	0,00 (0)
São Paulo	48,75 (39)	8,75 (7)
Não informado	2,50 (2)	0,00 (0)
TOTAL	100,00% (80/80)	16,25% (13/80)

4.2 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Das 13 amostras de órgãos fetais positivas ao VLB pela *nested*-PCR foi possível realizar a reação de sequenciamento em sete delas e uma placenta, totalizando oito amostras sequenciadas. As oito sequências obtidas apresentaram aproximadamente o tamanho de 356pb cada.

4.2.1 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

Na figura 21 está representado o alinhamento de nucleotídeos parcial (356 nt) do gene env (gp51). A amostragem obtida no presente estudo: LAP 54363B (Baço), LAP 55150T (Timo), LAP 55704L (Linfonodo), LAP 56089T, LAP56089L, LAP 57020T, LAP 57474B e LAP 57095PL (Placenta) foi comparada com as sequências depositadas no *Genbank* e de isolados brasileiros previamente identificados no Instituto Biológico (dados não publicados), conforme Quadro 6. Na figura 22 está representada a sequência de aminoácidos.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
LAP 54363B	GAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGACAACGCCCTCCCGGGCCGATCAAGGATCCCTTTATGTGATCATCAGA									
LAP 56089T									
AF399702.3									
JN254634.1									
LAP 57474B				R.	Y.			Y.	
AY228480.2				T.	A.				
LAP 56089L				T.	A.			A.	
LAP 57020T				T.	A.			A.	
VLB-05				T.	A.			A.	
VLB-07				T.	A.			A.	
VLB-09				T.	A.			A.	
VLB-10				T.	A.			A.	
VLB-11				T.	A.			A.	
FJ808576.1				T.	A.			A.	
JN254640.1				T.	A.			A.	
JN254636.1				T.	A.			A.	
FJ808575.1				T.	A.		G.	A.	
LAP 55704L				T.	A.	A.	T.	A.	
FJ808578.1				T.	A.	A.	T.	A.	
FM209475.1				T.	A.	A.	T.	A.	
FM209469.1				T.	A.	A.	T.	A.	
AY185360.2	A.			T.	A.		G.	A.	
LAP 551570				T.	A.		G.	A.	
LAP 57095P				T.	A.		G.	A.	
VLB-06				T.	A.		G.	A.	
VLB-08				T.	A.		G.	A.	
JN254639.1				T.	A.		G.	A.	
JN254633.1		T.		T.	A.	AT.	G.	A.	
JN254635.1		T.		T.	A.	AT.	G.	A.	
JN254637.1		T.		T.	A.	AT.	G.	A.	
JN254638.1		T.		T.	A.	AT.	G.	A.	
FJ808582.1		T.		T.	A.	AT.	G.	A.	

```

111      112      113      114      115      116      117      118      119      120
LAP 54363B TTTTATTCCTGATCTCAACCAATGTCATGGACHTTTCACCCCTAACCTGGGAGATGGGGATATGATGCCCCTGCTCCTTTTCTTACATAAATGCC
LAP 56089T .....
AP399702.3 .....
JN254634.1 .....
LAP 57474B ..... K ..... R .....
AY228480.2 ..... A ..... T ..... G .....
LAP 56089L ..... A ..... T ..... G .....
LAP 57020T ..... A ..... T ..... G .....
VLB-05 ..... A ..... T ..... G .....
VLB-07 ..... A ..... T ..... G .....
VLB-09 ..... A ..... T ..... G .....
VLB-10 ..... A ..... T ..... G .....
VLB-11 ..... A ..... T ..... G .....
FJ808576.1 ..... A ..... T ..... G .....
JN254640.1 ..... A ..... T ..... G .....
JN254636.1 ..... A ..... T ..... G .....
FJ808575.1 ..... A ..... T ..... G .....
LAP 55704L ..... C ..... A ..... T ..... G .....
FJ808578.1 ..... C ..... A ..... T ..... G .....
FM209475.1 ..... C ..... A ..... T ..... G .....
FM209469.1 ..... C ..... A ..... T ..... G .....
AY185360.2 ..... C ..... T ..... A ..... T ..... A .....
LAP 551570 ..... C ..... T ..... A ..... T ..... A .....
LAP 57095P ..... C ..... R ..... A ..... T ..... A .....
VLB-06 ..... C ..... T ..... A ..... T ..... A ..... C .....
VLB-08 ..... C ..... T ..... A ..... T ..... A .....
JN254639.1 ..... C ..... T ..... A ..... T ..... A .....
JN254633.1 ..... C ..... A ..... T ..... T ..... A .....
JN254635.1 ..... C ..... A ..... T ..... T ..... A .....
JN254637.1 ..... C ..... A ..... T ..... T ..... A .....
JN254638.1 ..... C ..... A ..... T ..... T ..... A .....
FJ808582.1 ..... C ..... A ..... T ..... T ..... A .....

```

```

211      212      213      214      215      216      217      218      219      220
LAP 54363B TGTATCCCTCACCCTGACTTCCTTCAGCTGAACAGTGCCTGGGTTCCCTCTGTCAAGATCATGGGCCCTGCTTCTAARTCAACCGGCACGGGCCCTTCCCC
LAP 56089T .....
AP399702.3 .....
JN254634.1 .....
LAP 57474B ..... R ..... R ..... R ..... K .....
AY228480.2 ..... T ..... T ..... A ..... A .....
LAP 56089L ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
LAP 57020T ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
VLB-05 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
VLB-07 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
VLB-09 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
VLB-10 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
VLB-11 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
FJ808576.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
JN254640.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
JN254636.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
FJ808575.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
LAP 55704L ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
FJ808578.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
FM209475.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
FM209469.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
AY185360.2 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
LAP 551570 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
LAP 57095P ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
VLB-06 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
VLB-08 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
JN254639.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
JN254633.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
JN254635.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
JN254637.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
JN254638.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....
FJ808582.1 ..... C ..... T ..... C ..... T ..... T ..... A ..... A .....

```

```

          310       320       330       340       350
LAP 54963B  GACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCCTGGGCTCCAGAAATATTACTATA
LAP 56089T  .....
AF399702.3 .....C.....
JN254634.1 .....
LAP 57474B .....K.....
AY228480.2 .....C.....
LAP 56089L .....C.....
LAP 57020T .....C.....A.....
VLB-05 .....C.....
VLB-07 .....C.....
VLB-09 .....C.....
VLB-10 .....C.....
VLB-11 .....C.....
FJ808576.1 .....C.....
JN254640.1 .....C.....
JN254636.1 .....C.....
FJ808575.1 .....C.....
LAP 55704L .....C.....
FJ808578.1 .....C.....
FM209475.1 .....C.....
FM209469.1 .....C.....
AY185360.2 .....C.....
LAP 551570 .....C.....
LAP 57095P .....C.....
VLB-06 .....C.....
VLB-08 .....G.....C.....
JN254639.1 .....C.....
JN254633.1 .....C.....
JN254635.1 .....C.....
JN254637.1 .....C.....
JN254638.1 .....C.....
FJ808582.1 .....C.....

```

Figura 21 – Alinhamento de 8 fragmentos parciais de 356 nucleotídeos do gene *env* (gp51) do VLB geradas no presente estudo com outras 17 sequências selecionadas no *GenBank* já publicados até o momento e sete sequências de isolados brasileiros ainda não publicados do Instituto biológico (VLB 05 a 11) representando os genótipos 1, 5 e 6 (São Paulo, 2013).

A figura 22 representa o alinhamento das sequências geradas no presente estudo relacionando-as com os isolados brasileiros (não publicados) e sequências do *GenBank*.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
LAP 54363B  ESRCE V DR DCPE D SR EQ S VDRCE LEMQCH L TCE EC DPLIT BLEKEDPPKE EQL SD VGRRE ILL CI R P
LAP 56089T  .....
AF999702.3 .....
JN254634.1 .....
LAP 57474B  ..... X X ..... X X ..... X X ..... X X
AY228480.2 ..... Q ..... I .....
LAP 56089L  ..... Q ..... I .....
LAP 57020T  ..... Q ..... I .....
VLB-05     ..... Q ..... I .....
VLB-07     ..... Q ..... I .....
VLB-09     ..... Q ..... I .....
VLB-10     ..... Q ..... I .....
VLB-11     ..... Q ..... I .....
FJ808576.1 ..... Q ..... I .....
JN254640.1 ..... Q ..... I .....
JN254636.1 ..... Q ..... I .....
FJ808575.1 ..... Q R ..... I .....
LAP 55704L  ..... Q ..... S ..... I .....
FJ808578.1 ..... Q ..... S ..... I .....
FM209475.1 ..... Q ..... S ..... I .....
FM209469.1 ..... Q ..... S ..... I .....
AY185360.2 ..... Q ..... T ..... I .....
LAP 551570  ..... Q ..... T ..... I .....
LAP 57095P  ..... Q ..... T X ..... I .....
VLB-06     ..... Q ..... T ..... I .....
VLB-08     ..... Q ..... T ..... I .....
JN254639.1 ..... Q ..... T ..... I .....
JN254633.1 ..... QD ..... T ..... I .....
JN254635.1 ..... QD ..... T ..... I .....
JN254637.1 ..... QD ..... T ..... I .....
JN254638.1 ..... QD ..... T ..... I .....
FJ808582.1 ..... QD ..... T ..... I .....

```

113

```

LAP 54363B  DC IC ESRIP EBLV
LAP 56089T  .....
AF999702.3 .....
JN254634.1 .....
LAP 57474B  ..... X .....
AY228480.2 .....
LAP 56089L  .....
LAP 57020T  ..... B
VLB-05     .....
VLB-07     .....
VLB-09     .....
VLB-10     .....
VLB-11     .....
FJ808576.1 .....
JN254640.1 .....
JN254636.1 .....
FJ808575.1 .....
LAP 55704L  .....
FJ808578.1 .....
FM209475.1 .....
FM209469.1 .....
AY185360.2 .....
LAP 551570  .....
LAP 57095P  .....
VLB-06     .....
VLB-08     .....
JN254639.1 .....
JN254633.1 .....
JN254635.1 .....
JN254637.1 .....
JN254638.1 .....
FJ808582.1 .....

```

Figura 22 – Aminoácidos traduzidos a partir das sequências obtidas neste estudo, recuperadas do *Genbank* e isolados brasileiros (não publicados) (São Paulo, 2013).

4.2.2 Matrizes de identidade

Estão apresentados no Quadro 10 os valores de similaridade nucleotídicas das amostras deste estudo frente a elas mesmas e frente às amostras retiradas do *GenBank* e isolados do IB.

Quadro 10 - Sequências geradas neste estudo com similaridade nucleotídica máxima e mínima, quando comparadas entre si e frente às recuperadas no *GenBank* e isolados brasileiros (não publicados) (São Paulo, 2013).

Similaridade	Identidade Nucleotídica
Entre as sequências deste estudo	<p>Máxima (100%)</p> <p>LAP 54363B, LAP 56089T e LAP56089L</p> <p>Mínima (95,2%)</p> <p>LAP 54363B e LAP 55704B</p> <p>LAP 57474B e LAP 55704 L</p> <p>LAP 55704L, LAP54363B e LAP 56089L</p>
Entre as sequências deste estudo frente as demais recuperadas do <i>GenBank</i> e isolados do IB	<p>Máxima (100%)</p> <p>LAP 54363B e JN254634</p> <p>LAP 55150T e JN 254639</p> <p>LAP 56089T e JN254634</p> <p>LAP 56089L e VLB5, VLB 9, VLB 10, VLB 11, VLB 7, FJ808576, JN 254640 e JN 254636</p> <p>LAP 55704 e FJ808578, FM209469, FM209475</p> <p>Mínima (95,2%)</p> <p>LAP 54363 B e FJ808578, FM209475 e FM 209469</p> <p>LAP 56089T e FJ808578, FM209475 e FM 209469</p> <p>LAP 57474B e FJ808578, FM209475 e FM 209469, JN254637, JN254635, JN254633, JN254638 e FJ808582</p> <p>LAP 55704 L e JN254634</p>

4.2.3 Inferência filogenética a partir das sequências nucleotídicas

A árvore genealógica referente às sequências de 356 (nt) do gene env (gp51) detectados no presente estudo, juntamente com sequências de maior similaridade recuperados do GenBank, dispendo o número de acesso, país de origem do estudo e o genótipo determinado (CAMARGOS et al. 2002, CAMARGOS et al. 2007, RODRIGUEZ et al. 2009, MORATÓRIO et al. 2010., D'ANGELINO et al. 2013) e isolados brasileiros (não publicados) estão apresentados na Figura 23. Os valores representados no bootstrap foram de 1.000 repetições utilizando o método de Máxima Verossimilhança.

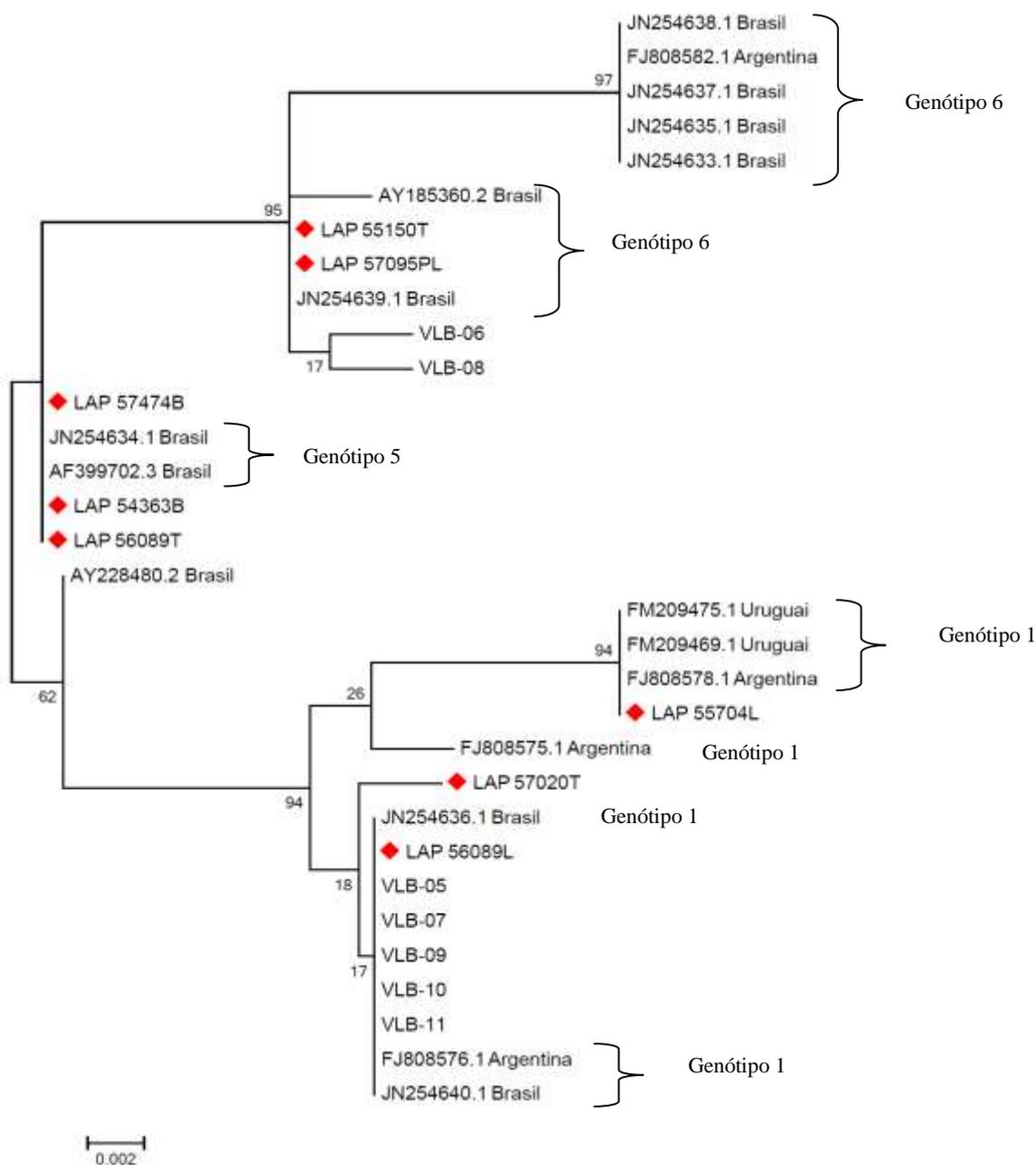


Figura 23 – Árvore filogenética desenvolvida através do método de Máxima Verossimilhança (Software Mega v. 5). Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de *bootstrap* (São Paulo, 2013).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou correlacionar as características histopatológicas (HE), ELISA para detecção de anticorpos anti-VLB e *nested*-PCR para detecção do DNA pró-viral do VLB em amostras de órgãos fetais de bovinos abortados. O método de avaliação histopatológica com HE detecta possíveis alterações inflamatórias nos tecidos fetais, lembrando que a histopatologia é método de baixa especificidade porque apenas sugere a presença de um agente causal, não o determinando, sendo necessários testes diagnósticos específicos (DEL FAVA; PITUCO; GENOVEZ et al., 2007; CABRAL et al., 2008).

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas de 4 a 9 e gráficos 1 e 2, observa-se que as alterações histopatológicas das amostras positivas para *nested*-PCR para o VLB sugerem uma reação celular frente a um agente infeccioso viral, como a hiperplasia linfóide nos órgãos linfóides (timo, baço, linfonodo), e infiltrado inflamatório mononuclear nos órgãos de outros sistemas (cérebro, pulmão, coração, fígado, rim), ou seja, observou-se reatividade linfoproliferativa generalizada nos órgãos fetais infectados pelo VLB. Segundo Tizard (2002), as infecções por agentes patogênicos podem ser brandas na mãe e letais no feto, deste modo, as infecções fetais levam ao desenvolvimento de hiperplasia linfóide e também ao aumento de imunoglobulinas. A presença de imunoglobulinas no soro de um bezerro neonato antes que esse mame o colostro indica que ocorreu a estimulação antigênica fetal intra-uterina.

Um estudo realizado por Onuma (1989) demonstrou em doze fetos colhidos no abatedouro a detecção de antígeno específico para VLB associado ao tumor utilizando a técnica de Imunofluorescência, sendo positivas para o marcador de células neoplásicas “cl 43” em todas as amostras de timo, e em 1% de células no baço, fígado e nenhuma positiva nos rins, pulmões, coração e músculo, confirmando assim a necessidade do uso de órgãos linfóides de fetos no diagnóstico, como a presente pesquisa sugere, baseada em maior nível de positividade destes tecidos ao VLB pela *nested*-PCR (Tabelas 2, 3 e 4).

Ohshima et al. (1982) observaram lesões histopatológicas dos tecidos dos fetos obtidos de vacas positivas ao VLB, que foram sacrificadas *in extremis*, estes autores puderam verificar em geral nos linfonodos hiperplasia folicular do centro germinativo, e o córtex com proliferação de células reticulares e células neoplásicas nos linfonodos, além de nódulos tumorais em tecido adiposo perirenal e no pulmão (tecido interlobular e alvéolo), no músculo esquelético e na leptomeninge, acúmulo de

células neoplásicas em tecido subcutâneo, na placenta fetal e na gelatina de Wharton ao longo do cordão umbilical. Após o nascimento, em animais jovens e adultos observa-se que o VLB possui tropismo especial por tecidos linfóides, principalmente linfócitos B (AIDA et al., 1989; SCHWARTZ et al., 1994), sendo então encontrada reação linfóide tecidual mais facilmente em abomaso, linfonodos, baço, coração, útero, fígado e rins de animais com linfossarcoma (PARODI, 1987).

O sistema linfocitário é composto por órgãos linfóides primários e secundários. Os mamíferos possuem a produção de linfócitos T no timo e os linfócitos B no fígado e medula óssea, e os órgãos linfóides secundários são caracterizados pelo baço e linfonodo (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1989). O timo é o primeiro órgão linfóide a se desenvolver no embrião, cerca de 40 dias após a concepção, seguido pelos órgãos linfóides secundários, onde o baço inicia seu desenvolvimento por volta de 55 dias e o linfonodo depois de 60 dias (TIZARD, 2002). Os órgãos linfóides estão diretamente relacionados à resposta imune humoral e celular do animal.

O aparecimento das células B no feto ocorre logo após o desenvolvimento do baço e dos linfonodos, ou seja, uma vez formados, os órgãos linfóides são capazes de responder ao estímulo antigênico, porém, nem sempre ocorre a estimulação destes (TIZARD, 2002). Outra hipótese a ser considerada é que os líquidos torácico e abdominal não seriam o melhor material para realizar esta análise, porém não foi coletado soro fetal ou materno para esta comparação, apesar da OIE (2011) recomendar que soro sanguíneo materno e fetal sejam materiais de eleição na detecção de anticorpos anti-VLB. Por outro lado, a OIE sugere também que o líquido tóraco-abdominal pode ser utilizado na detecção de antígeno viral pela *nested*-PCR, e isto foi verificado em duas amostras 10,5% (2/19) (Tabela 2), onde houve correspondência na positividade entre os exsudatos e demais órgãos nestes dois fetos.

O presente estudo demonstrou uma alta taxa de infecção transplacentária 16,25% (13/80), pela identificação do DNA pró-viral do VLB, confirmando a hipótese de diversos estudos apresentados, com índice de positividade bem próximo aos publicados por outros autores. Jacobsen (1983) verificou que a transmissão uterina ocorreu frequentemente no primeiro trimestre de gestação em até 8% das gestações de animais soropositivos, principalmente em vacas com alta concentração do vírus e baixos títulos de anticorpos, enquanto que Kono (1983) verificou que a transmissão vertical em bezerros antes da ingestão do colostro foi de 20% utilizando a IDGA. Hübner et al. (1997) encontraram em rebanhos leiteiros 4,8% bezerros congenitamente infectados, sorologicamente positivos antes de mamar o colostro, pela

IDGA. Klimentowski (1991) encontrou em bezerros de dois rebanhos, antes de ingerirem o colostro, 10 e 13% animais positivos para o VLB pela IDGA, e 15 e 22% pelo ELISA. Agresti et al. (1993) verificaram que bezerros infectados intra-uterinamente (sorologia fetal positiva pela IDGA) nasceram de mães com linfocitose persistente. Desta forma discorda-se de Meas et al. (2002), que afirmam ser insignificante a infecção transplacentária, e que a principal porta de entrada do VLB para os bezerros é oral, devido à ingestão do colostro.

A amostragem do presente estudo revelou que os fetos abortados situavam-se na faixa etária a partir dos três primeiros meses de gestação. Ohshima et al. (1982) examinaram fetos oriundos de vacas prenhas que estavam em estágio de linfossarcoma avançado e que foram sacrificadas *in extremis*, onde a avaliação sorológica fetal pela IDGA revelou 33,3% fetos sororeagentes, entre idade de cinco a nove meses de gestação, concordando com a possibilidade de transmissão vertical do VLB na faixa etária observada no presente estudo, demonstrando que a leucemia bovina pode surgir bem cedo na vida do animal e que, como não há uma grande passagem de imunoglobulinas através da placenta em ungulados e os fetos bovinos são incapazes de produzir anticorpos antes dos 100 dias de gestação, os anticorpos foram produzidos pelos fetos. Tizard (2002) explica que o fato da placenta dos ruminantes ser sindesmocorial faz com que o epitélio coriônico que fica em contato direto com os tecidos uterinos bloqueie totalmente a passagem transplacentária de imunoglobulinas. Jacobsen (1983) verificou que a transmissão uterina ocorreu frequentemente no primeiro trimestre de gestação em até 8% das gestações de animais soropositivos, principalmente em vacas com alta concentração do vírus e baixos títulos de anticorpos.

Segundo Ohshima et al. (1982), a avaliação sorológica em fetos de vacas com linfossarcoma revelou que 33,3% destes eram sororeagentes, com idade variando de cinco a nove meses de gestação. No presente trabalho, apesar de a maior parte dos fetos estar em idade gestacional acima de três meses, nenhuma amostra de líquido torácico e abdominal submetida ao teste de ELISA apresentou anticorpos anti-VLB. Isso pode ser devido a vários fatores, entre os quais:

1º) baixos títulos de infecção viral - que não provocam suficiente resposta imune, teoria proposta por Juliarena, Gutierrez e Ceriani (2012), que observaram o não desenvolvimento de anticorpos quando a carga viral do VLB é menor de 100 cópias de DNA pró-viral/ μ g;

2º) resposta ausente do sistema imune – quando não ocorre o reconhecimento do antígeno viral, relatado por Trainin et al. (1996), onde o VLB pode causar uma

desregulação no sistema imune em nível celular e humoral, gerando diminuição de células produtoras de IgM nos nódulos linfáticos e baço (deficiência na resposta imune primária);

3º) longo período de incubação do VLB até causar a soroconversão (janela imunológica) - como descrito por Jones (2000);

4º) latência viral - fenômeno comprovado por Taylor e Jacobs (1993) e Van Den Heuvel et al. (2007), podendo ocorrer devido a uma proteína conhecida como fator de bloqueio de plasma (PBF).

Na Tabela 1 observou-se co-infecção do VLB e outros agentes patogênicos (bacterianos, parasitários e virais), porém a amostragem reduzida não permitiu demonstrar estatisticamente se ocorre correlação entre infecção pelo VLB, outros agentes e lesões teciduais, o que justifica continuar estudos nesta linha, a fim de verificar o papel do VLB no abortamento bovino, isoladamente ou em infecção mista, tendo em vista que os índices de bovinos infetados são elevados em diversas regiões do Brasil, conforme assinalado no Quadro 1. Por ser retrovírus, o VLB pode estar causando imunossupressão (FERRER, 1980; AZEDO et al., 2008; AZEDO et al., 2011) e favorecendo infecção por agentes oportunistas na mãe e sua passagem transplacentária para o feto.

A maior frequência de fetos positivos ao VLB pela *nested*-PCR foi observada em rebanhos de aptidão leiteira – 61,54% (8/13) e 23,8% (3/13) não foi informada a aptidão (Tabela 7). Outros autores observaram no Brasil altas prevalências de sororeatividade em animais leiteiros (LEITE et al., 1984; BIRGEL JUNIOR et al., 1995; MEGID et al., 2003). Segundo o ANUALPEC (2011), no ano de 2010, o rebanho bovino brasileiro era composto por 174.090.818 cabeças, sendo a maior parte - 139.886.154 gado de aptidão corte e 34.204.665 na aptidão leiteira.

Não foi possível fazer uma correlação entre as técnicas de ELISA indireto e *nested*-PCR, pelo fato da porcentagem de animais com anticorpos ter sido igual a 0%. Isto demonstra a importância do diagnóstico direto da doença, onde as técnicas moleculares podem diagnosticar animais em incubação, ou seja, indivíduos que ainda não soroconverteram (latência viral) para o VLB (NAIF et al., 1992; KLINTEVALL et al., 1994; MARTIN et al., 2001).

A presença de baixo título de anticorpos contra o VLB pode estar relacionada à baixa carga viral presente no animal. Juliarena, Gutierrez e Ceriani (2012) observaram que, em animais com linfocitose, a carga viral estava acima de 100.000 cópias de DNA pró-viral/ μ g gerando assim uma resposta imune alta, porém em animais sem

linfocitose, ou seja, carga viral menor que 100 cópias de DNA pró-viral/ μg , podem não desenvolver anticorpos.

Tanto fetos positivos quanto negativos na *nested*-PCR para VLB, e positivos e negativos para outros agentes etiológicos apresentaram alterações inflamatórias. Cabral et al. (2008) e Okano et al. (2003) descrevem alterações inflamatórias nos tecidos de fetos abortados, sendo necessário associar técnicas sensíveis e específicas para detectar o agente. Outra hipótese a ser feita é se haveria a possibilidade de o animal infectado intrauterinamente desenvolver tumores mais precocemente do que um animal infectado após o nascimento, porque o período de incubação fetal começa em períodos gestacionais variáveis. Silva et al. (2008) observaram em uma vaca de três anos de idade formações tumorais e sintomas de um animal adulto, sugerindo que este animal tenha adquirido a doença na sua vida intrauterina ou nos primeiros meses de vida.

Por se tratar de amostra de conveniência, a maior parte dos fetos positivos ao VLB foi oriunda do Estado de São Paulo – 53,85% (7/13) e Minas Gerais – 30,77% (4/13) (Tabela 2). Estes materiais foram encaminhados por médicos veterinários que atuam nas referidas regiões utilizam os laboratórios locais com referência na área de sanidade animal de seu Estado para realizarem as análises microbiológicas.

O programa de combate à brucelose tem se mostrado eficaz pelo baixo número de animais reagentes verificado por estudo de soroprevalência realizado nos rebanhos do Estado de São Paulo pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo e o MAPA (DIAS et al., 2009), bem como nos rebanhos de Minas Gerais realizado pelo Instituto Mineiro de Agropecuária e o MAPA (GONÇALVES et al., 2009). No período em que foi realizado o presente estudo de amostragem de conveniência, salienta-se que apenas 1,25% (1/80) dos fetos enviados ao CPDSA do Instituto Biológico para diagnóstico diferencial de abortamento bovino foi positivo para brucelose (técnica de isolamento e PCR), corroborando os resultados de diagnóstico direto (pesquisa do agente) aqui obtidos com os resultados de soroprevalência (diagnóstico indireto - pesquisa de anticorpos) publicados por Dias et al. (2009) no Estado de São Paulo e Gonçalves et al. (2009) no Estado de Minas Gerais. As taxas de brucelose estão baixas como consequência das ações que as agências de Defesa Sanitária Animal destes Estados implantaram, atendendo as normas do PNCEBT (BRASIL, 2001). Observa-se pela literatura compulsada que, devido à utilização das técnicas moleculares houve um aumento da sensibilidade analítica do diagnóstico direto da brucelose. Por outro lado, com o avanço da campanha de erradicação desta enfermidade, espera-se obter progressiva diminuição do abortamento por este agente

causal, sendo necessário implantar técnicas laboratoriais mais sensíveis e específicas para as enfermidades prevalentes, bem como ampliar o leque de possibilidades para a investigação de outras enfermidades da reprodução que possam estar acometendo os bovinos. As enfermidades não infecciosas também precisam ser investigadas, tendo em vista que possuem importante participação nas perdas embrionárias e fetais de bovinos (PITUCO; DEL FAVA, 2003; ANTONIASSI et al., 2007; DEL FAVA; PITUCO; GENOVEZ, 2007).

Considerando-se que foi observada positividade para o VLB - 16,25% (13/80), justificando-se a continuidade dos estudos epidemiológicos e também a busca de outros patógenos que possam estar causando abortamento em fêmeas bovinas, complementando o diagnóstico diferencial, como sugerido por Okano et al. (2003), Scarcelli et al. (2004), Genovez et al. (1993, 2006), Del Fava; Pituco; Genovez (2007) e Cabral et al. (2008).

Conforme as tabelas 2 e 3, os órgão linfóides (timo, baço e linfonodo) foram de grande importância na detecção do DNA pró-viral do VLB, podendo ser sugerido como material de eleição no diagnóstico deste vírus. Segundo Tizard (2002), quando antígenos são administrados em um feto intravenosamente, uma grande concentração é capturada no fígado, baço e medula óssea, e a resposta imune primária (produção de anticorpos) ocorrerá em grande escala no baço e linfonodos. Não foi estabelecida no protocolo de colheita do projeto original a colheita de medula óssea fetal, porém nada impede que em projetos futuros este material possa ser também avaliado, não somente para os agentes virais, mas também bacterianos e parasitários, tendo em vista que existem as células tronco que podem se diferenciar. Outro aspecto favorável para a colheita de material da medula óssea reside no fato de que é difícil haver contaminação por microrganismos ambientais, tendo em vista que a medula óssea está protegida pelo tecido ósseo, o que favorece o isolamento em cultura pura.

O diagnóstico diferencial para outras causas de abortamento nos fetos independente de serem positivos ou negativos para o VLB foi realizado em *pool* de órgãos fetais e ou conteúdo abomasal, considerando-se como possível patógeno causador do abortamento o *Arcanobacterium pyogenes* e *Escherichia coli* - 2,50% (2/80), *Neospora caninum* - 5,00% (4/80), BVDV - 3,75% (3/80), sendo semelhantes para *Brucella abortus*, *Klebsiella* spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* 1,25% (1/80), podendo ser estes microorganismos os causadores do infiltrado inflamatório e reação do sistema linfóide observados nos diversos órgãos, conforme Tabelas 4 e 5.

Das 13 amostras positivas pela *nested*-PCR foi possível obter apenas oito sequências nucleotídicas que foram utilizadas para a realização da análise filogenéticas sendo uma delas uma placenta. Podemos relacionar a baixa quantidade de material para o sequenciamento a perdas relacionadas à quantidade de DNA presente na amostra e à purificação insatisfatória dos produtos submetidos à reação de sequenciamento. Verificou-se a presença de diferentes *clusters* nas amostras do presente estudo, mesmo entre isolados brasileiros.

A análise filogenética das oito sequências parciais do gene env (gp51) do VLB evidenciou a presença de 3 genótipos diferentes (1, 5 e 6). Foi constatado que a amostra LAP 56089L apresentou semelhança nucleotídica de 100% com as sequências FJ808576 da Argentina (RODRIGUEZ et al., 2009) e brasileiras JN254640 e JN254636 descritas por D'Angelino et al. (2013) pertencentes ao genótipo 1.

Rodriguez et al. (2009) salientam em seu trabalho a importância do diagnóstico molecular do VLB identificado nos hospedeiros, pois esse vírus possui uma diversificação de genótipos observada por sequências semelhantes, porém separadas por ramos mais longos. A análise feita a partir dos epítomos da gp51 gera preocupação devido à sua alta variabilidade genética, que pode causar dificuldade na sua identificação na população a ser estudada. Segundo Trono (2001), essas variações na base molecular são as responsáveis pela diferença no diagnóstico molecular e sorológico, gerando assim resultados diferentes (FECHNER et al., 1996; REICHEL et al., 1998). A sequência LAP 54363B/SP apresentou similaridade com a amostra JN254634 também encontrada no estado de São Paulo, segundo D'Angelino et al. (2013) enquadrando-se no genótipo 5. Também no genótipo 5 podemos encontrar a amostra LAP 57474B proveniente do Estado de Minas Gerais quando comparada no mesmo cluster com a amostra descrita por Camargos et al. (2002), AF399702, também vinda do Estado de Minas Gerais, demonstrando assim a presença desse genótipo nesse Estado. Camargos et al. (2007), inferiram em seu trabalho que não foi possível concluir com as mudanças nas sequências dos isolados brasileiros a interferência na patogenicidade viral e tropismo celular, como não foi também possível verificar neste estudo. No atual estado da arte, depreende-se que mais estudos de epidemiologia molecular necessitam ser realizados a fim de compreender a distribuição do agente e sua correlação com achados clínicos.

Conforme também descrito por D'Angelino et al. (2013) a sequência JN254639 pertencente ao genótipo 6 possui uma similaridade de 100% quando comparada a sequência LAP 55150T, as duas amostras são do Estado de São Paulo.

Observou-se que a amostra LAP 55704L está no *cluster* correspondente ao genótipo próximo às sequências FJ808578 (Argentina) descrito por Rodriguez et al,(2009) , FM 209475 e FM 209469 (Uruguai) sendo amparadas por elevado valor de *bootstrap* (94) e pertencente ao genótipo 1. Moratório et al. (2010) demonstram que existem diferentes cepas circulantes no Brasil como 1, 5, 6 e 7, dados que são concordantes com o presente estudo, e que as amostras do Uruguai apresentavam apenas o genótipo 1. Sendo assim, revela um cluster geográfico específico de cepas VLB. A sequência LAP 56089T encontra-se com similaridade máxima com a amostra brasileira JN254634 pertencente ao genótipo 5.

As amostras LAP 57095PL e 551570T apresentaram um *bootstrap* de 95% no mesmo *cluster* da amostra brasileira de Genótipo 6 JN254634.

6. CONCLUSÃO

O VLB apresenta um elevado índice de transmissão transplacentária – 16,25% (13/80) e encontra-se disseminado nos Estados de São Paulo – 8,75% (7/80) e Minas Gerais – 5,00% (4/80), tendo sido identificado em fetos bovinos abortados a partir do segundo trimestre de gestação - 38,46% (5/13) e, principalmente, no último - 53,85% (7/13), com maior frequência em gado de aptidão leiteira - 61,54% (8/13).

Os genótipos 1, 5 e 6 encontrados foram os mais frequentes e esta casuística corrobora com estudos realizados no Brasil, Argentina e Uruguai.

O teste de sorologia ELISA não demonstrou ser ferramenta eficiente na pesquisa de anticorpos nos líquidos tóraco/abdominal. A *nested-PCR* mostrou-se mais sensível na detecção da infecção fetal quando utilizado este tipo de material.

Não foi possível correlacionar os resultados entre os exames histopatológicos e a *nested-PCR* para o VLB, isoladamente ou em co-infecção com outros patógenos, porque tanto os fetos positivos quanto negativos ao VLB apresentaram reações dos órgãos linfóides (baço, timo e linfonodos) e infiltrado linfoplasmocítico nos demais órgãos (fígado, coração, rim, adrenal, cérebro e pulmão).

Pode-se concluir que a transmissão transplacentária do VLB ocorre em um nível considerável nos rebanhos brasileiros, porém mais estudos são necessários a fim de verificar a importância do VLB com agente causal de abortamento bovino, associado ou não a outros patógenos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, V. L. V.; MODENA, C. M.; SILVA, J. A.; MOREIRA, E. C. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina nos Estados de Rondônia e Acre. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, n. 3, p. 203-210, 1990.

ABREU, J. M. G.; ARAUJO, W. P.; BIRGEL, E. H. Prevalência de Anticorpos Séricos anti-vírus da Leucose Bovina em animais criados na bacia leiteira de Fortaleza, Estado do Ceará. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 17, n. 1, p. 67-90, 1994.

AGRESTI, A.; PONTI, W.; ROCCHI, M. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 3, p. 373-378, 1993.

AIDA, Y.; MIYASAKA, M.; OKADA, K.; ONUMA, M.; KOGURE, S.; SUZUKY, M.; MINOPRIO, P.; LEVY, D.; IKAWA, Y. Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 1946-1951, 1989.

AKAMATSU, M. A.; IKUNO, A. A.; SIQUEIRA, L. A.; HARAKAVA, R.; OKUDA, L. H.; PITUCO, E. M.; DE STEFANO, E.; FERREIRA, V. C. A. Monitoring BLV proviral DNA in bulls from artificial insemination center. **Virus Reviews & Research**, v. 8, supl. 1, p. 217, 2003.

ALENCAR FILHO, R. A. A. A imunodifusão como recurso diagnóstico da Leucemia Linfática Crônica em bovinos. **Biológico**, v. 44, n. 1, p. 27-28, 1978.

ALENCAR FILHO, R. A.; MAZANTI, M. T.; SAAD, A.D.; POHL, R. Levantamento preliminar da infecção pelo Vírus da Leucemia Linfática Crônica (L.L.C.) dos Bovinos no Estado de São Paulo. **Biológico**, v. 45, n. 3/4, p. 47-54, 1979.

ALTANER, C.; MERZA, M.; ALTANEROVA, V.; MOREIN, B. Envelope glycoprotein gp51 of bovine leukemia virus is differently glycosylated in cells of various species and organ origin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 36, n.2, p. 163-177, 1993.

ANDRADE, J. R. A.; ALMEIDA, M. M. R. Prevalência da Leucose Enzoótica Bovina na Bacia Leiteira de Goiânia, Goiás. **Hora Veterinária**, v. 10, n. 60, p. 49-53, 1991.

ANTONIASSI, N. A. B.; SANTOS, A. S.; OLIVEIRA, E. C.; PESCADOR, C. A.; DRIEMEIER, D. Diagnóstico das causas infecciosas de aborto em bovinos. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 69-72, 2007.

ANUALPEC 2011: Anuário estatístico da pecuária de corte. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2011.

ARITA, G. M. M.; GONÇALVES, C. D.; SABER, A. F.; GERMANO, P. M. L.; DEAK, J. G.; KOTAIT, I. Estudo epidemiológico da Leucose Enzoótica dos Bovinos no Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO, 5., 1992, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 1992. p. 30.

AZEDO, M. R.; MASSOCO, C. O.; BLAGITZ, M. G.; SANCHES, B. G. S.; SOUZA, F. N.; BATISTA, C. F.; SAKAI, M.; SÁ-ROCHA, L. C.; KFOURY JUNIOR, J. R.; STRICAGNOLO, C. R.; BENESI, F. J.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Influência da leucose enzoótica bovina na função fagocítica de leucócitos circulantes em animais manifestando linfocitose persistente. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 5, p. 390-397, 2008.

AZEDO, M. R.; BLAGITZ, M. G.; SOUZA, F. N.; BENESI, F. J.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Avaliação funcional de monócitos de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1131-1140, 2011.

BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S. SOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 271-275, 1992.

BARR, C. B.; ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; DAFT, B. M.; KINDE, H.; LONRAD, P. A. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. **Veterinary Pathology**, v. 27, p. 354-361, 1990.

BARROS, C. S. L.; FLORES, E. F. Leucosis bovina. In: JORNADAS URUGUAYAS DE BUIATRIA, 17, 1989, Paysandu. **Anais...** Paysandu: Centro Médico Veterinário de Paysandu, 1989. p. 1-20.

BARROS, C. S. L. Leucose Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M.; LEMOS, R. A. A. (Eds.). **Doenças de ruminantes e equinos**. 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v. 1, n. 2, p. 159-168.

BARROS FILHO, I. R.; GUIMARÃES, A. K.; SPONCHIADO, D.; KRÜGER, E. R.; WAMMES, E. V.; OLLHOFF, R. D.; DORNBUSCH, P. T.; BIONDO, A. W. Soroprevalência de anticorpos para o vírus da leucose enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 511-515, 2010.

BEIER, D.; BLANKENSTEIN P.; MARQUARDT, O. KUZMAK, J. Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing. **Berliner Munchener Tierarztliche Wochenschrife**, v. 114, p. 252-256, 2001.

BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; HAGIWARA, M. K.; PRADO, M. S. S. Considerações sobre a Leucose Enzoótica dos bovinos adultos em rebanho leiteiro criado no Estado de São Paulo. I - Prevalência de sororeagentes. In: SEMANA DE VETERINÁRIA DA FMVZ/USP, 2., 1983, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1983. p. 70.

BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; MARÇAL, W. S. Estudo preliminar sobre a ocorrência da Leucose dos Bovinos adultos criados na Região de Campinas. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 43., 1988, Campinas, SP. **Resumos...** Campinas: SPMV, 1988a. p. 30.

BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; ZOGNO, M. A. Ocorrência da infecção causada pelo vírus da Leucose Bovina em gado leiteiro criado no Estado de São Paulo. Avaliação pela detecção de anticorpos séricos por imunodifusão com antígeno viral. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 43., 1988b, Campinas, SP. **Resumos...** Campinas: SPMV, 1988. p. 31.

BIRGEL, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BENESI, F. J.; ZOGNO, M. A. Ocorrência da Infecção causada pelo vírus da Leucose Bovina no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 28, n. 1, p. 67-73, 1991.

BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J.; D'ANGELINO, J. L.; AYRES, M. C. C.; COSTA, J. N.; BARROS FILHO, I. R.; BIRGEL JÚNIOR, E. H. Prevalência da Leucose Enzoótica dos Bovinos em zebuínos da raça Nelore, criados no Estado de São Paulo. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v. 17, n. 1, p. 55-66, 1994.

BIRGEL JÚNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J.; BENESI, F. J.; 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, n. 4, p. 93-99, 1995.

BRAGA, F. M.; VAN DER LAAN, C. W.; HALFEN, D. C.; VIDOR, T. Avaliação de método de controle da infecção pelo Vírus da Leucose Enzoótica Bovina. **Ciência Rural**, v. 27, n. 4, p. 635-640, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. Instrução Normativa n. 2 de 10 de janeiro de 2001: **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal**. Diário Oficial da União. 11 jan. 2001.

BUEHRING, G. C.; KRAMME, P. M.; SCHULTZ, R. D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. **Laboratory Investigation**, v. 71, n. 3., p. 359-365, 1994.

BURRIDGE, M. J.; THURMOND, M. C.; MILLER, J. M.; SCHMERR, M. J. F.; VAN DER MAATEN, M. J. Fall in antibody titer to Bovine Leukemia Virus in the periparturient period. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, n. 3, p. 270-271, 1982.

CABRAL, A. D.; LIMA, M. S., ALMEIDA, M. J. F.; RODRIGUES, M. V.; DUARTE, F. C.; DEL FAVA, C. Achados histopatológicos em fetos bovinos abortados analisados pela técnica de coloração hematoxilina-eosina. **Biológico**, v. 70, n. 2, p. 137, 2008.

CABRAL, A. D.; CAMARGO, C. N.; GALLETI, N. T. C.; OKUDA, L. H.; PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry and nested-PCR. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 18, n. 4, p. 14-19, 2009.

CAMARGOS, M. F; STANCEK, D; ROCHA, M. A; LESSA, L. M; REIS, J. K.; LEITE, R. C. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. **Journal of Veterinary Medicine. B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 49, n. 7, p. 325-331, 2002.

CAMARGOS, M. F.; OLIVEIRA JÚNIOR, A. C.; CRUZ, J. C. M.; LESSA, L.M.; ROCHA, M. A.; STANCEK, D.; PELLEGRIN, A. O.; REIS, J. K. P.; LEITE, R. C. Testes de diagnóstico para o Vírus da Leucemia Bovina. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 12, n. 1/3, p. 149-150, 2005.

CAMARGOS, M. F.; PEREDA, A.; STANCEK, D.; ROCHA, M. A.; DOS REIS, J. K.; GREISER-WILKE, I.; LEITE, R. C. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of bovine leukemia virus. **Virus Genes**, v. 34, n. 3, p. 343-350, 2007.

CARNEIRO, P. A. M.; ARAÚJO, W. P.; BIRGEL, E. H.; SOUZA, K. W. Prevalência pelo Vírus da Leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 33, p. 111-125, 2003.

CARVALHO, L.; BENESSI, F. J.; BIRGEL JUNIOR, G. H.; BIRGEL, C. H. Prevalência de anticorpos séricos antivírus da Leucose dos bovinos em animais da raça holandesa preto e branca e zebuínos da raça Nelore, criados no polo regional de Londrina, Estado do Paraná. **Semina Ciências Agrárias**, v. 17, n. 1, p. 53-57, 1996.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R. M.; HEINEMANN, M. B.; SAKAMOTO, S. M.; GENOVEZ, M. E.; FERREIRA F.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 7, p. 500-501, 2001.

CASAL, J.; LEARTE, P.; TORRE, E. A path model of factors influencing bovine leukemia virus transmission between cattle herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 10, p. 47-61, 1990.

CORTEZ, A.; CASTRO, A. M. G.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; LEITE, R. C.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E.; ALFIERI, A. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of *Brucella* spp., *Leptospira* spp., bovine herpesvirus and bovine viral diarrhea virus nucleic acids in aborted fetuses and bovines dead perinatal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1226-1228, 2006.

CHOI, K. Y.; MONKE, D.; STOTT, J. L. Absence of bovine leukosis in semen of seropositive bulls. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 5, p. 403-406, 2002.

COCKERELL, G. L.; REYES, R. A. Bovine Leukemia Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (Eds.). **Schalm's veterinary hematology**. 5^a Ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 614-619.

COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, H. E. (Eds.) **Retroviruses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. 843 p.

CUNHA, R. G.; TEIXEIRA, A. C.; SOUZA, D. M. Antígenos do Vírus da Leucose Bovina e anticorpos precipitantes em soros de bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n. 9, p. 1363-1370, 1982.

D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Productive and reproductive performance in cattle infected with Bovine Leukosis Virus. **Journal of Dairy Research**, v. 65, p. 693-695, 1998.

D'ANGELINO, R. H.; PITUCO, E. M, VILLALOBOS, E. M. C.; HARAKAVA, R.; GREGORI, F.; DEL FAVA, C. Detection of Bovine Leukemia Virus in Brains of Cattle with a Neurological Syndrome: Pathological and Molecular Studies. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M. Aspectos da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina em bovinos no Brasil. **Biológico**, v. 66, n. 1/2, p. 1-8, 2004.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M.; GENOVEZ, M. E. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos: experiência do Instituto Biológico. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 73-79, 2007.

DIVERS, T. J.; BARTHOLOMEW, R. C.; GALLIGAN, D.; LITTEL, C. Evidence for transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation in a commercial dairy herd. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 23, p. 133-141, 1995.

DIAS, R. A.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; LIMA, Z. M. B.; PAULIN, L. M. S.; GUNNEWIEK, M. F. K.; AMAKUM., J. S.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, supl. 1, p. 118-125, 2009.

DIGIACOMO, R. F. Horizontal transmission of the bovine leukemia-virus. **Veterinary Medicine**, v. 87, n. 3, p. 263-271, 1992a.

DIGIACOMO, R. F. Vertical transmission of the bovine leukemia-virus. **Veterinary Medicine**, v. 87, n. 3, p. 258-262, 1992b.

DIMMOCK, C. K.; CHUNG, Y. S.; MACKENZIE, A. R. Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 7, p. 230-233, 1991.

DOLZ, G.; MORENO, E. Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting for the detection of BLV antibodies. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v. 46, n. 8, p. 551-558, 1999.

DOMENECH, A.; GOYACHE, J.; LLAMES, L.; PAYÁ, M. J.; SUÁREZ, G.; GÓMEZ-LUCIA, E. In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. **Journal of General and Molecular Virology**, v. 81, n. 1, p. 109-118, 2000.

EVERMANN, J. F.; DIGIACOMO, R. F.; FERRER, J. F.; PARISH, S. M. Transmission of Bovine Leukosis Virus by blood inoculation. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 9, p. 1885-1887, 1986.

EVERMANN, J. F. A look at how bovine leukemia virus infection is diagnosed. Symposium on bovine leukemia virus infection. **Veterinary Medicine**, v. 87, n. 3, p. 272-278, 1992.

FECHNER, H.; KURG, A.; GEUE, L.; BLANKENSTEIN, P.; MEWES, G.; EBNER, D.; BEIER, D. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 43, n. 10, p. 621-630, 1996.

FENNER, J. F.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A. (Eds.) Retroviridae. In: **Veterinary Virology**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 561-595.

FERNANDES, C. H. C.; MELO, L. E. H.; TENÓRIO, T. G. S.; MENDES, E. I.; FERNANDES, A. C. C.; RAMALHO, T. R. R.; MOURA SOBRINHO, P. A.; MOTA, R. A. Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região Norte do Estado do Tocantins, Brasil **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 327-334, 2009.

FERRER, J. F. Bovine leukosis: natural transmission and principles of control. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, n. 12, p. 1281-1286, 1979.

FERRER, J. F. Bovine lymphosarcoma. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 24, p. 1-68, 1980.

FLORENT, G.; DELGOFFE, J. C.; ZYGRAICH, N. Detection of antibodies to bovine leukemia virus in bovine milk samples with an ELISA involving two monoclonal antibodies. **Veterinary Microbiology**, v. 18, p. 89-93, 1988.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; PEREIRA, N. M.; PORTOLAN, J. A. B.; CHIELLE, L. L. Prevalência de anticorpos contra o vírus da Leucose Bovina (VLB) no rebanho leiteiro de Santa Maria, RS. **Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria**, v. 18, n. 1, p. 67-73, 1988.

FLORES, E. F.; WEIBLEIN, R.; REBELATTO, M. C. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV) na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 10, n. 58, p. 25-29, 1990.

GARCIA, M.; BASTOS, P. A. S.; BARROS FILHO, I. R.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; COUTINHO, S.; RAMOS, M. C. C.; LOURENÇO, A.; SILVA, M. M. Efeito da infecção pelo vírus da leucose na ocorrência de mastite em bovinos. **A Hora Veterinária**, v. 88, p. 41-44, 1995.

GATEI, M. H.; BRANDON, R. B.; NAIF, H. M.; MCLENNAN, M. W.; DANIEL, R. C. W.; LAVIN, M.F. Changes in B cell and T cell subsets in bovine leukaemia virus infected cattle. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 23, p. 139-147, 1989.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no Instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, p. 107-112, 1993.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; CARDOSO, M. V.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; TEIXEIRA, S. R.; CASTRO, V.; GOTTI, T. B.; BATISTA, C. A. Main bacterial agents as cause of abortion in bovines in Brazil. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 24., 2006, Nice. **Summary...** Nice: World Buiatrics Association, 2006. CDROM.

GHANEM, Y. M.; MOHAMED, S. A.; ABDELKADER, A. H. Prevalence of enzootic bovine leukosis (EBL) in the Northern Somalia. **Bulletin of Animal Health and Production in Africa**, v. 59, p. 190-198, 2011.

GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUS, M.; BURTEAU, C.; NIGRO, A.; VANDERMEERS, F.; BALON, H.; BOUZAR, A. B.; BEFOICHE, J.; BURNY, A.; REICHERT, M.; KETTMAN, R.; WILLEMS, L. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, v. 4, n. 18, p. 4-18, 2007.

GONÇALVES, V. S. P.; DELPHINO, M. K. V. C.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; PORTO, T. B.; ALVES, C. M.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, supl. 1, p. 35-45, 2009.

GOMES, M.; MOOJEN, V.; FERNANDES, J. C. T.; FERREIRO, L. Detecção de anticorpos séricos contra o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (VLEB) em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande Sul**, v. 13, p. 15-22, 1985.

GRAVES, D. C.; FERRER, J. F. In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. **Cancer Research**, v. 36, p. 4152, 1976.

GREGORY, L; CARNEIRO, O. S.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; BEIER, D.; AKAMATSU, M. A.; HARAKAVA, R.; LARA, M. C. C. S. H.; PITUCO, E. M., OLIVEIRA, J. C. F., FERREIRA, V. C. A.; IKUNO, A. A. Nested polymerase chain reaction validated for sensitive detection of bovine leukemia virus in blood samples from Brazilian cattle herd: comparison with conventional ELISA and agar gel immunodiffusion methods. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 3, p. 303-308, 2004.

GUERREIRO, A. M. G. **Virologia veterinária**. 2 ed. Porto Alegre: Sulina, 1988. p. 270-272.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, [S.l.], v. 41, p. 95-98, 1999.

HEENEY, J. L.; VALLI P. J. S.; JACOBS R. M.; VALLI V. E. O. Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. **Laboratory Investigation**, v. 66, n. 5, p. 608-617, 1992.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 789 p.

HOPKINS, S. G.; DIGIACOMO, R. F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 107-128, 1997.

HOPKINS, S. G.; EVERMANN, J. F.; DIGIACOMO, R. F.; PARISH, S. M.; FERRER, J. F.; SMITH, S.; BANGERT, R. L. Experimental transmission of Bovine Leukosis Virus by simulated rectal palpation. **Veterinary Research**, v. 122, n. 16, p. 389-391, 1988.

HÜBNER, S. O.; WEIBLEN, R.; MORAES, M. P.; SILVA, A. M.; CARDOSO, M. J. L.; PEREIRA, N. M.; ZANINI, M. Infecção intra-uterina pelo vírus da leucose bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 4, p. 8-11, 1997.

ICTV-INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Descriptions of Bovine Leukemia Virus. 2006. Disponível em: < <http://www.ictvdb.org> > Acesso em: 2 set. 2012.

IKUNO, A. A.; SIQUEIRA, L. A.; AKAMATSU, M. A.; HARAKAVA, R.; OKUDA, L. H.; DE STEFANO, E.; PITUCO, E. M.; BEIER, D.; GREGORY, L.; FERREIRA, V. C. A. Heterogeneity of BLV population of same Brazilian region. **Virus Reviews & Research**, v. 8, supl. 1, p. 217, 2003.

IKUNO, A. A.; HARAKAVA, R.; GREGORI, F.; RUIZ, V. L. A.; AKAMATSU, M. A.; ALONSO, A. C.; FRANÇA, S. B.; FERREIRA, V. C. A. Molecular analysis of bovine leukemia provirus genotypes in the Brazilian cattle. In: National Meeting of Virology, 6., 2005, Salvador. **Virus Reviews & Research**, v. 10., supl. 1, p. 112, 2005.

JACOBSEN, K. L. Transmission of bovine leukemia virus: Prevalence of antibodies in precolostral calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v.1, p. 265-272, 1983.

JOHNSON, R.; GIBSON, C. D.; KANEENE, J. B. Bovine Leukemia Virus: a herd-based control strategy. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 3, p. 339-349, 1985.

JOHNSON, R.; KANEENE J. B. Bovine Leukaemia Vírus and Enzootic Bovine Leukosis. **Veterinary Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 287-312, 1992.

JONES, T. C. (Ed.) **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 1415.

JULIARENA, M. A.; GUTIERREZ, S. E., CERIANI, C. Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 11, p. 1220-1225, 2007.

KANTEK, C. E.; KRUGER, E. R.; WELTER, V. R. Prevalência do vírus da Leucose Enzootica Bovina no rebanho leiteiro do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, n. 4, p. 125-129, 1983.

KIRKBRIDE, C. A. **Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion**. Ames: Iowa State University Press, 1990. 260 p.

KLIMENTOWSKI, S. Prenatal infections with BLV Bovine leukemia virus in cattle and their influence on some parameters of humoral and cellular immunity. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 47, p. 345-347, 1991.

KLINTEVALL, K.; BALLAGI-PORDÁNY, K.; NÄSLUND, K.; BELÁK, S. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. **Veterinary Microbiology**, v. 42, n. 2/3, p. 191-204, 1994.

KLINTEVALL, K.; FUXLER, L.; FOSSUM, C. Bovine leukemia virus: early reflections in blood after an experimental infection of calves. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 119-130, 1997.

KNAPEN, K.; KERKHOF, P.; MAMMERICKYX, M. Eradication de la leucose bovine enzootique en Belgique: bilan du dépistage de masse realize sur l'ensemble du cheptel national en 1989, 1990 et 1991. **Annales de Médecine Veterinaire**, v. 137, p. 197-201, 1993.

KOHARA, J.; KONNAI, S.; ONUMA, M. Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 1, p. 25-30, 2006.

KONO, Y.; SENTSUI, H.; ARAI, K.; FUJIGAKI, A.; ENOMOTO, C.; IWASAKI, H.; ISHIDA, H. Serological methods to detect calves infected in utero with bovine leukemia virus. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 45, p. 453-461, 1983.

KUZMAK, J.; KOZACZYNSKA, B.; BICKA, L. Diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in newborn calves by use of PCR. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 43, n. 2, p. 125-131, 1999.

LAMBERT, E.; WILLIAMS, D. H.; LYNCH, P. B. The extent and timing of prenatal loss in gilts. **Theriogenology**, v. 36, p. 655-665, 1991.

LASSAUZET, M. L.; THURMOND, M. C.; JOHNSON, W. O.; STEVENS, F.; PICANSO, J. P. Effects of brucellosis vaccination and dehorning on transmission of bovine leukemia virus in heifers on a California dairy. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 1, p. 184-189, 1990.

LEITE, R. C.; MODENA, C. M.; MOREIRA, E. C.; ABREU, J. J. Evolução clínica da Leucose Enzoótica Bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 47-57, 1984.

LEUZZI JÚNIOR, L. A.; GUIMARÃES JÚNIOR, J. S.; FREIRE, R. L.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. 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. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 93-98, 2003.

LUIZ JUNIOR, 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.

MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; BURNY, A.; LEUNEN, J. Detection by immunodiffusion and radioimmunoassay tests of antibodies to Bovine Leukemia Virus antigens in sera of experimentally infected sheep and cattle. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 27, n. 4, p. 291-303, 1980.

MARKIEWICZ, L.; RULKAX, J.; KAMÍŃSKI, S. Detection of BLV provirus in different cells by nested-PCR. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 47, p. 325-331, 2003.

MARTIN, D.; ARJONA, A.; SOTO, I.; BARQUERO, N.; VIANA, M.; GÓMEZ-LUCÍA, E. Comparative study of PCR as direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of Bovine Leukaemia Virus. **Journal of Veterinary Medicine Series B- Infections Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, p. 97-106, 2001.

MEAS, S.; USUI, T.; OHASHI, K.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. **Veterinary Microbiology**, v. 84, p. 275-282, 2002.

MEGID, J.; NOZAKI, C. N.; KURODA, R. B. S.; CRUZ, T. F.; LIMA, K. C. Ocorrência de Leucose Enzoótica Bovina na Microrregião da Serra de Botucatu. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 645-646, 2003.

MELO, L. E. H. **Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco.** São Paulo: 1991. 102p. [Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo].

MILLER, L. D.; MILLER, J. M.; OLSON, C. Inoculation of calves with particles resembling C-type virus from cultures of bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 48, n. 2, p. 423-428, 1972.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 62, p. 425-428, 1979.

MODENA, C. M.; GOUVEIA, A. M. G.; AZEVEDO, N. A.; SILVA, J. A.; VIANA, F. C.; REHFELD, O. A. M. Leucose Enzoótica Bovina: I - Prevalência em rebanhos de alta linhagem no Estado de Minas Gerais. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 39-45, 1984.

MOHAMMADI, V.; ATYABI, N.; NIKBAKHT, B. G.; LOTFOLLAHZADEH, S.; MOSTAFAVI, E. Seroprevalence of bovine leukemia virus in some dairy farms in Iran. **Global Veterinaria**, v. 7, n. 3, p. 305-309, 2011.

MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L.; DIAS, H. T.; SILVA, A. O. A.; VALE, W. G. V. Ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos no Estado do Pará, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 1, 1999.

MONTI, G. E.; FRANKENA, K.; DE JONG, M. C. Evaluation of natural transmission of bovine leukaemia virus within dairy herds of Argentina. **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 3, p. 1-10, 2006.

MORAES, M. P.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F.; OLIVEIRA, J. C. D.; REBELATTO, M. C.; ZANINI M.; RABUSKE, M.; HUBNER, S. O.; PEREIRA, N. M. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina nos rebanhos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 26. n. 2, p. 257-262, 1996.

MORATÓRIO, G.; OBAL, G.; DUBRA, A.; CORREA, A.; BIANCHI, S.; BUSCHIAZZO, A.; CRISTINA, J.; PRITSCH, O. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. **Archives of Virology**, v. 155, p. 481-489, 2010.

MURAKAMI, K.; KOBAYASHI, S.; KONISHI, M.; KAMEYAMA, K.; YAMAMOTO, T.; TSUTSUI, T. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 84-88, 2011.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINECK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**. 3rd.ed. California: Academic Press, 1999. 629 p.

NAGY, D. W.; TYLER, J. W.; KLEIBOEKER, S. B. Enhanced periparturient transmission of bovine leukosis virus in colostrum-deprived calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 724-725, 2006.

NAIF, H. M.; DANIEL, R. C. W.; COUGLE, W. G.; LAVIN, M. F. Early detection of Bovine Leukemia Virus by using an enzyme linked assay for polymerase chain reaction amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 675-679, 1992.

NISOLE, S.; SAIB, A. Early steps of retrovirus replicate cycle. **Retrovirology**, v. 1, n. 9, 2004.

NUOTIO, L.; RUSANEN, H.; SIHVONEN, L.; NEUVONEN, E. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, p. 43-49, 2003.

OHSHIMA, K.; TAKAHASHI, K.; OKADA, K.; NUMAKUNAI, S.; KAGAWA, Y.; MINAMINO, K. A Pathologic study on fetuses and placentas from cows affected with enzootic bovine leukosis with reference to transplacental infection of bovine leukemia virus. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 44, p. 479-488, 1982.

OHSHIMA, K.; MORIMOTO, N.; KAGAWA, Y.; NUMAKUNAI, S.; HIRANO, T.; KAYANO, H. A survey of maternal antibodies to bovine leukemia virus (BLV) in calves born to cows infected with BLV. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 46, p. 583-586, 1984.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Enzootic Bovine Leukosis. In: **Terrestrial Animal Health Code**. Paris: OIE, 2011. Disponível em: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.11.9.htm.> Acesso em: 05 set. 2012.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Paris: OIE, 2012. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online>> Acesso em: 30 mai. 2012.

OKANO, W.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; REIS, A. C. F.; ALFIERI, A. A. Achados histológicos em fetos bovinos abortados e não abortados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p. 223-225, 2003.

OLIVEIRA, A. R.; BARRETO, C. S. F.; MERICHELLO, D.; SANQUENTIN, W. M. Epidemiologia da Leucose Bovina: Ocorrência de anticorpos em várias faixas etárias. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 19, n. 6, p. 258-261, 1997.

ONUMA, M. Tumor-associated antigen on bovine leukemia virus-induced bovine lymphosarcoma. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 22, p. 213-221, 1989.

PARODI, A. L. Pathology of Enzootic Bovine Leukosis: Comparison with the Sporadic Form. In: BURNY, A.; MAMMERICKX, M. (Eds.) **Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus**. Boston: Martinus Nijhoff, 1987. p. 15-49.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. **O combate à brucelose bovina: Situação brasileira**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 154 p.

PAVLENKO, S.; OKPATTAKH, G. K.; MIROLUBOVA, A.; ALEXEEVA, V.; KOVALENKO, A. Investigating the possibilities of diagnosing bovine leukosis virus (BLV) among carriers younger than 6 months. **Mezhdunarodnyi Sel'skokhozyaistvennyi Zhurnal**, v. 4, p. 53-58, 2002.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C. Causas Infecciosas de mortalidade embrionária e fetal em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 68-75, 2003.

POLLARI, F. L.; HOPKINS, S. G.; DIGIACOMO, R. F.; EVERMANN, J. F. Periparturient transmission of bovine leukosis virus in dairy cattle. **The Veterinary Record**, v. 132, n. 8, p. 190-191, 1993.

PORTETELLE, D. BRUCK, C.; BURNY, A.; DEKEGEL, D.; MAMMERICKX, M.; URBAIN, J. Detection of complement-dependent lytic antibodies in sera from bovine leukemia virus-infected animals. **Annals of Veterinary Research**, v. 9, p. 667-674, 1978.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. (Orgs.) Métodos Histotecnológicos. Washington: **Registro de Patologia de los Estados Unidos de América y Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América**, 1992. 280 p.

RADOSTITS, O. M. (Ed.) **Herd Health. Food animal production medicine**. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. 884 p.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária – Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

RANGEL, N. M.; MACHADO, A. V. Contribuição à oncologia comparada em Minas Gerais. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária do Estado de Minas Gerais**, v. 1, p. 84-96, 1943.

REICHEL, M. P.; THAM, K. M.; BARNES, S.; KITTELBERGER, R. Evaluation of alternative methods for the detection of bovine leukaemia virus in cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 46, n. 4, p. 140-146, 1998.

REINHARDT, G.; HOCHSTEIN-MINTZEL, V.; RIEDEMANN, S.; LEAL, H.; NIEDDA, M. Estudio serológico de leucosis enzoótica bovina em um prédio de La província de Valdivia y su relación a parametros productivos y reproductivos. **Journal of Veterinary Medicine**, series B, v. 35, n. 3, p. 178-185, 1988.

REIS, D. O.; HORTÊNCIO, M. C.; ALMEIDA, L. P.; MOREIRA, M. D. Linfoma em bovinos abatidos sob inspeção federal: aspectos morfológicos e linfonodos mais acometidos. Uberlândia, MG. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 2, p. 109-112, 2002.

RIET-CORREA, F. Plantas tóxicas e micotoxinas que afetam a reprodução em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 63-68, 2007.

ROBERTS, D. H.; LUCAS, M. H.; WIBBERLEY, G.; CHASEY, D. Investigation into the susceptibility of cattle to Bovine Leukosis Virus following inoculation by various routes. **Veterinary Record**, v. 110, n. 6, p. 222-224, 1982.

ROCHA, M. A.; BARBOSA, E. F.; GUEDES, R. M. C.; LAGE, A. P.; LEITE, R. C.; GOUVEIA, A. M. G. Detection of BHV-1 in a naturally infected bovine fetus by nested PCR assay. **Veterinary Research Communications**, v. 23, p. 133-141, 1998.

RODRIGUEZ, S. M.; GOLEMBA, M. D.; CAMPOS, R. H.; TRONO, K.; JONES, L. R. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 2788-2797, 2009.

ROITT, I; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunologia**. 1. Ed. Brasileira. São Paulo: Editora Manole, 1994.

ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.13, n. 2, p.107-111, 1981.

ROMERO, C. H.; CRUZ, G. B.; ROWE, C. A.; CARVALHO, E. M. Transmission of bovine leukemia virus through milk ingestion. **Revista de Microbiologia**, v. 14, n. 2, 109-114, 1983.

SANTOS, J. L.; FARIA, J. E.; RIBEIRO, M. F. B.; SALCEDO, J. H. P. Epidemiologia da Leucose Enzoótica Bovina no Estado de Minas Gerais. Prevalência de anticorpos na Zona da Mata. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 37, n. 4, p. 359-359, 1985.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CARDOSO, M. V.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R.; TEIXEIRA, S. R.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E. Detecção de agentes bacterianos pelas técnicas de isolamento e identificação e PCR - Multiplex em fetos bovinos abortados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 1, p. 23-27, 2004.

SCARCI, R. M.; BENTO, C. L.; MEDEIROS, E. L.; GUARENTI, P. J. Avaliação dos testes sorológicos e hematológicos no diagnóstico da Leucose Bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17., 1980, Fortaleza. **Anais...**Fortaleza: 1980. p. 137.

SCHOTTLER, F.; SCHOTTLER, H. Über ätiologie undtherapie der aleukämischen lymphadenose des rindes. **Berliner Munchener Tierarztliche Wochenschrife**, v. 50, p. 497-502, 513-517, 1934.

SCHWARTZ, I.; BENSALID, A.; POLACK, B.; PERRIN, B.; BERTHELEMY, M.; LEVY, D. In vivo Leukocyte Tropism of Bovine Leukemia Virus in Sheep and Cattle. **Journal of Virology**, v. 68, n. 7, p. 4589-4596, 1994.

SEIKI, M.; EDDY, R.; SHOWS, T. B.; YOSHIDA, M. Nonespecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. **Nature**, v. 309, p. 640-642, 1984.

SILVA, S. V. **Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência de anticorpos séricos anti vírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos cruzados – holandês/zebu e em animais da raça Pé-duro, criados no Estado do Piauí**. São Paulo: 2001. 176p. [Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo].

SILVA, R. C.; FONTANA, I.; MEIRELLES, F. C.; RUGGIERO, A. P. M.; BENATO, N.; BORGES, J. R. J. Ocorrência de Leucose Enzoótica Bovina na forma de linfossarcomas no Distrito Federal: relato de caso. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 4, p. 507-512, 2008.

SILVA FILHO, A. P.; AFONSO, J. A. B.; SOUZA, J. C. A.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F.; DANTAS, A. C.; COSTA, N. A.; MENDONÇA, C. L. Linfossarcoma em bovinos no Agreste Meridional de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 591-597, 2011.

SIMÕES, S. V. D. **Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado da Paraíba**. São Paulo: 1998. 118p. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo].

SCOTT, H. M.; SORENSEN, O.; WU, J. T.; CHOW, E. Y.; MANNINEN, K.; VANLEEUEWEN, J. A. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Neospora caninum*, Bovine leukemia virus, and Bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. **Canadian Veterinary Journal**, v. 47, n. 10, p. 981-991, 2006.

STRAUB, O. C. Horizontal transmission studies on enzootic bovine leukosis. **Annals of Veterinary**, v. 9, n. 4, p. 809-813, 1978.

SUZUKI, T.; IKEDA, K. The mouse homolog of bovine leukemia virus receptor is closely related to the delta subunit of the adapter-related protein complex AP-3, not associated with the cell surface. **Journal Virology**, v. 72, p. 593-599, 1998.

TAYLOR, J. A; JACOBS, R. M. Effects of plasma and serum on the in vitro expression of bovine leukemia virus. **Laboratory Investigation**. v.69, n.3, p. 340-346, 1993.

TIZARD, I. **Imunologia veterinária: Uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. 532p.

TOSTES, R. A. Situação da Leucose Bovina no Brasil: uma revisão. **Colloquium Agrariae**, v. 1, n. 1, p. 42-50, 2005.

TRAININ, Z.; BRENNER, J; MEIROM, R.; UNGAR-WARON, H. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 54, p. 293-302, 1996.

TRONO, K. G.; PÉREZ-FILGUEIRA, D. M.; DUFFY, S.; BORCA, M. V.; CARRILLO, C. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. **Veterinary Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 235-248, 2001.

VAN DEN HEUVEL, M. J; COPELAND, K. F.; CATES, E. C.; JEFFERSON, B. J.; JACOBS, R. M. Defibrinated bovine plasma inhibits retroviral transcription by blocking p52 activation of the NFkB element in the long terminal repeat. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 2, p. 119-128, 2007.

VAN DER LAAN, C. W.; VIDOR, T.; BRAGA, F. M.; HALFEN, D.; HUBNER, S. O. Leucose Enzoótica Bovina em bovinos produtores de leite importados do Uruguai. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 5, n. 1, p. 139-141, 1999.

VAN DER MAATEN, M. J.; MILLER, J. M.; BOOTHE, A. D. Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissue from cattle with lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 52, p. 491, 1974.

VANLEEUVEN, J. A.; TIWARI, A.; PLAIZIER, J. C.; WHITING, T. L. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba. **Canadian Veterinary Journal**, v. 47, n. 8, p. 783-786, 2006.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L. et al. **Genus Deltaretrovirus**. In: *Virus Taxonomy: The classification and nomenclature of Viruses*. 7th Report. San Diego: Academic Press, 2000. <http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/lpext.dll?f=templates&fn=main-h.htm>. Acessado em: 4 mar. 2011.

VANROOSE, G.; KRUIF, A. D.; VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60/61, p. 131-143, 2000.

VOGT, V. M. Retroviral virions and genomes. In: COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, H. E. (Eds). **Retroviruses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1997. p. 1-25.

WANG, C. T. Bovine leukemia virus infection in Taiwan: epidemiological study. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 53, n. 3, p. 395-398, 1991.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A. E. Single tube enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in pooled bovine serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 343-346, 2001.

WHITTIER, D. Programs can rid herds of bovine leukosis. **Hoard's Dairyman**, v. 138, n. 8, p. 405, 1990.

WRATHALL, A. E.; SIMMONS, H. A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 247-274, 2006.

WU, D.; TAKAHASHI, K.; LIU, N.; KOGUCHI, A.; MAKARA, M.; SASAKI, J.; GORYO, M.; OKADA, K. Distribution of T-lymphocyte Subpopulation in Blood and Spleen of Normal Cattle and Cattle with Enzootic Bovine Leukosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, p. 117-127, 1999.

YAMAMOTO, H.; YOSHINO, T.; MATSUDA, I.; NAKAJIMA, H. Histopathological definition of the adult and calf types of bovine leukosis. **National Institute of Animal Health Quarterly**, v. 22, n. 3, p. 115-129, 1982.

YOON, S. S.; BAE, Y. C.; LEE, K. H.; HAN, B.; HAN, H. R. Characteristics of Bovine Lymphoma Caused by Bovine Leukemia Virus Infection in Holstein-Friesian Dairy Cattle in Korea. **Journal of Animal Science**, v. 18, n. 5, p. 728-733, 2005.

8.ANEXOS-

Anexo1- Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CETEA) número 122/12 , aprovado em 28/março/ 2102.

	SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS INSTITUTO BIOLÓGICO
COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Protocolo nº 122/12 sobre o Projeto: " Gestão sanitária do abortamento bovino: vírus da Leucemia Bovina como agente causal ", sob a responsabilidade de Claudia Del Fava , está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA).	
Protocolo aprovado pela CETEA-IB em 28 de março de 2012.	
São Paulo, 28 de março de 2012	
 Ricardo Spacagna Jordão Coordenador da CETEA-IB	
CETEA - IB	
Registro	
Número : 122/12	
Livro : 02	
Folha : 22	
Data: 28/03/12	

Anexo 2 - Planilha de encaminhamento para fetos ruminantes (LAP- REG-026 revisão 04 de 20/09/12).

	PLANILHA ENCAMINHAMENTO PARA FETOS RUMINANTES	LAP-REG-026 Página: 1 de 1 Revisão: 04 Emissão: 20/09/12
	LAP LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA	

TRIAGEM ANIMAL N°: _____ LAP N°: _____ NECROPSIA N°: _____
 ESPÉCIE: BOVINO OVINO ** CAPRINO ** BUBALINO
 SEXO: MACHO FÊMEA
 IDADE: _____ COMPRIMENTO ATLANTO-SACRAL: _____
 CONDIÇÃO FETO: AUTOLISADO REFRIGERADO CONGELADO MUMIFICADO
 DESCRIÇÃO MACROSCÓPIA: _____

MARQUE OS QUADRADOS 'COLHIDO' OU 'NÃO COLHIDO'

LABORATÓRIO	ANATOMIA (LAP) Todas espécies		VIROSES BOVÍDEOS (LVB) Todas espécies		DOENÇAS BACTERIANAS REPRODUÇÃO (LDBR) Todas espécies		PESQUISAS LAP / Parasitologia Somente bovino		**RAIVA (LRE) ** somente ovino e caprino	
	Formol 10%		Refrigerado		Refrigerado		Congelado		Refrigerado	
CONSERVAÇÃO MATERIAL	Colhido	Não colhido	Colhido	Não colhido	Não colhido	Não colhido	Colhido	Não colhido	Colhido	Não colhido
SNC	<input type="checkbox"/> <small>cassete</small>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <small>individual</small>	<input type="checkbox"/>	-----		-----		<input type="checkbox"/> <small>individual</small>	<input type="checkbox"/>
LÍNGUA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----		-----		-----		-----	
LINFONODO PRÉ-ESCAPULAR	<input type="checkbox"/> <small>cassete</small>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----		<input type="checkbox"/> <small>Eppendorf LAP</small>	<input type="checkbox"/>	-----	
TIMO	<input type="checkbox"/> <small>cassete</small>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----		<input type="checkbox"/> <small>Eppendorf LAP</small>	<input type="checkbox"/>	-----	
Líquido torácico / pericárdico ou abdominal	-----		<input type="checkbox"/> <small>Eppendorf</small>	<input type="checkbox"/>	-----		<input type="checkbox"/> <small>Eppendorf LAP</small>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <small>Eppendorf</small>	<input type="checkbox"/>
PULMÃO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----		<input type="checkbox"/> <small>individual</small>	<input type="checkbox"/>
CORAÇÃO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----		-----		<input type="checkbox"/> <small>individual</small>	<input type="checkbox"/>
FÍGADO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	-----		<input type="checkbox"/> <small>individual</small>	<input type="checkbox"/>
BAÇO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <small>Eppendorf LAP</small>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <small>individual</small>	<input type="checkbox"/>
ADRENAL	<input type="checkbox"/> <small>cassete</small>	<input type="checkbox"/>	-----		-----		-----		-----	
RIM	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <small>orgão inteiro</small>	<input type="checkbox"/>	-----		-----	
CONTEÚDO ABOMASAL / ABOMASO LIGADO	-----		-----		<input type="checkbox"/> <small>Eppendorf</small>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <small>Eppendorf</small>	<input type="checkbox"/> <small>Para-clog</small>	-----	
COTILÉDONE E MEMBRANAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <small>individual</small>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <small>individual</small>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <small>Eppendorf LAP</small>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <small>individual</small>	<input type="checkbox"/>

Cassete: acondicionar amostra em cassete histológico / Eppendorf: acondicionar amostra em tubo tipo Eppendorf / Individual: acondicionar amostra sozinha em frasco coletor universal / Órgão inteiro: enviar o órgão inteiro
 NECROSCOPISTA: _____ VISTO: _____ DATA: _____

Anexo 3 - Sequências nucleotídicas VLB

As sequências nucleotídicas do gene *env* do VLB geradas no presente estudo encontram-se relacionadas abaixo.

>LAP 54363B

GAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGAC
AACGCCTCCCGGGCCGATCAAGGATCCTTTTTATGTCGATCATCAGATTTTATTCCT
GCATCTCAAACAATGTCATGGACTTTTCACCCTAACCTGGGAGATATGGGGATATG
ATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAAATCCCTGATCCCCCTCAACCTGACTTCC
CTCAGCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTCTAAA
TCAAACGGCACGGGCCTTCCCCGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCC
TGGGCTCCAGAAATATTAGTATA

>LAP 56089T

GAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGAC
AACGCCTCCCGGGCCGATCAAGGATCCTTTTTATGTCGATCATCAGATTTTATTCCT
GCATCTCAAACAATGTCATGGACTTTTCACCCTAACCTGGGAGATATGGGGATATG
ATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAAATCCCTGATCCCCCTCAACCTGACTTCC
CTCAGCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTCTAAA
TCAAACGGCACGGGCCTTCCCCGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCC
TGGGCTCCAGAAATATTAGTATA

>LAP 57474B

GAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGAC
AARGCCTCCCYGGCCGATCAAGGATCCTTTTTATGTCTCATCATCAGATTTTATTCCT
GCATCTCAAACAATGTCATGGAKTTTTACRCTAACCTGGGAGATATGGGGATATG
ATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAAATCCCTGATCCCCCTCAACCRGACTTC
CCTCAGRTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTRTAA
ATCAAACGGCACGGGCCTTCCCKGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCC
CTGGGCTCCKGAAATATTAGTATA

>LAP 56089L

GAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGAC
AATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCT
GCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATG
ATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTT
CCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAA
ATCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCC
CTGGGCTCCCAGAAATATTAGTATA

>LAP 57020T

GAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGAC
AATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCT
GCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATG
ATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTT
CCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAA
ATCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCC
CTGGGCTCCCAGAAATATTAGAATA

>LAP 55704L

GAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGAC
AATGCCTCCCAGGCCAATCAAGGTTCTTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCT

GCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATG
ATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTT
CCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAA
ATCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCC
CTGGGCTCCCGAAATATTAGTATA

>LAP 551570

GAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGAC
AATGCCTCCCAGGCCGATCAGGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGACTTTATTCTT
GCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAAATATGGGGATATG
ATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAAATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTC
CCTCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAA
ATCAAACGGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCC
CTGGGCTCCCGAAATATTAGTATA

>LAP 57095PL

GAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCCACTGGGAC
AATGCCTCCCAGGCCGATCAGGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGACTTTATTCTT
GCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAAATATGGGGATATG
ATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAAATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTC
CCTCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAA
ATCAAACGGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCC
CTGGGCTCCCGAAATATTAGTAT

Anexo 5 – Fetos bovinos abortados encaminhados segundo data, registro LAP e TA, sexo, raça, idade, procedência (município/Estado), resultados VLB (ELISA, *nested*-PCR), exames IBR/BVD/Neospora e bacteriológicos (São Paulo, 2013).

Feto	Data	LAP	TA	Sexo	Raça	Idade Meses	Mun./Est.	ELISA VLB	Nested- PCR VLB	Exame IBR/BVD/ Neo	Exame Bacteriológico
1	07.01.09	55484-B	080010	F	Girolanda	3	Bilac-SP	NEG	NEG	-----	-----
		55484-T	080010	F	Girolanda	3	Bilac-SP	NEG	NEG	-----	-----
2	08.01.09	55485-B	080025	F	HPBleite	7	Pres. Olegário-MG	NEG	NEG	-----	-----
		55485-T1	080025	F	HPBleite	7	Pres.Olegário-MG	NEG	NEG	-----	-----
		55485-T2	080025	F	HPBleite	7	Pres. Olegário-MG	NEG	NEG	-----	-----
3	28.01.09	55523-B	080156	M	HPBleite	5	Nova Odessa-SP	NEG	NEG	-----	-----
		55523-T	080156	M	HPBleite	5	Nova Odessa-SP	NEG	NEG	-----	-----
4	12.02.09	55553-B	080233	M	NI	8	Uberlandia-MG	NEG	NEG	-----	-----
		55553-T	080233	M	NI	8	Uberlandia-MG	NEG	NEG	-----	-----
5	11.03.09	55581-B	080379	F	leite	8	São Paulo-SP	NEG	NEG	-----	-----
		55581-T	080379	F	leite	8	São Paulo-SP	NEG	NEG	-----	-----
6	20.12.07	54363-B	030579	NI	Mestiça	6	S. João Boa Vista-SP	NEG	POS	-----	-----
		54363-T	030579	NI	NI	6	S. João Boa Vista-SP	NEG	NEG	-----	-----
7	08.01.08	55379-B	080003	NI	Jerseyleite	5	Atibaia-SP	NEG	NEG	NEG	NEG

8	20.02.08	55468-B	080003	NI	Simental\corte	6	Araras-SP	NEG	NEG	NEG	NEG
9	16.05.08	54769-B	080469	NI	HPB\leite	8	Ibiuna-SP	NEG	NEG	NEG	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
		54769-T	080469	NI	HPB\leite	8	Ibiuna-SP	NEG	NEG	NEG	
10	16.05.08	54774-B	080496	NI	Hol.\leite	4	Valentin Gentil-MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		54774-T	080496	NI	Hol.\leite	4	Valentin Gentil-MG	NEG	NEG	NEG	NEG
11	09.09.08	55150-B	08/1137	NI	leite	6	São Sebastião-SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		55150-T	08/1137	NI	leite	6	São Sebastião-SP	NEG	POS	NEG	NEG
12	08.09.09	55704-B	89808	F	Girolando	7	Itapeva/MG	NEG	NEG	NEG	-----
		55704-T	89808	F	Girolando	7	Itapeva/MG	NEG	NEG	NEG	-----
		55704-L	89808	F	Girolando	7	Itapeva/MG	NEG	POS	NEG	-----
		55704-LT	89808	F	Girolando	7	Itapeva/MG	NEG	NEG	NEG	-----
13		55710-B	92809	F	Girolando	2	Porto Rico/PR	NEG	NEG	NEG	-----
		55710-T	92809	F	Girolando	2	Porto Rico/PR	NEG	NEG	NEG	-----
14	04.06.09	55712-B	95309	F	Girolando	7	Prata/ MG	NEG	POS	NEG	-----
		55712-T	95309	F	Girolando	7	Prata/ MG	NEG	POS	NEG	-----
		55712-L	95309	F	Girolando	7	Prata/ MG	NEG	NEG	NEG	-----
		55712-LT	95309	F	Girolando	7	Prata/ MG	NEG	POS	NEG	-----
15	19.06.09	55736-B	101409	F	NI	8	Uberlândia/MG	NEG	NEG	NEG	-----
		55736-T	101409	F	NI	8	Uberlândia/MG	NEG	NEG	NEG	-----
		55736-L	101409	F	NI	8	Uberlândia/MG	NEG	NEG	NEG	-----
		55736-LT	101409	F	NI	8	Uberlândia/MG	NEG	NEG	NEG	-----
16	19.06.09	55741-B	103509	M	NI	3	Carmo do Paraíba/MG	NEG	NEG	NEG	-----
		55741-T	103509	M	NI	3	Carmo do Paraíba/MG	NEG	NEG	NEG	-----
		55741-LT	103509	M	NI	3	Carmo do Paraíba/MG	NEG	NEG	NEG	-----

17	23.06.09	55746-B	08/1055	F	Mestiça Holandesa	5	Itapetininga/SP	NEG	NEG	-----	-----
		55746-T	08/1055	F	Mestiça Holandesa	5	Itapetininga/SP	NEG	NEG	-----	-----
		55746-LT	08/1055	F	Mestiça Holandesa	5	Itapetininga/SP	NEG	NEG	-----	-----
18	16.07.09	55801-B	89809	F	Red Angus	8	Itu/SP	NEG	NEG	NEG	<i>Brucella abortus</i>
		55801-T	89809	F	Red Angus	8	Itu/SP	NEG	NEG	NEG	
		55801-L	89809	F	Red Angus	8	Itu/SP	NEG	NEG	NEG	
		55801-LT	89809	F	Red Angus	8	Itu/SP	NEG	NEG	NEG	
19	16.07.09	55802-B	08-1232	F	Girolando	8	Iepê/SP	NEG	NEG	NEG	<i>Klebsiella spp.</i>
		55802-T	08-1232	F	Girolando	8	Iepê/SP	NEG	POS	NEG	
		55802-LT	08-1232	F	Girolando	8	Iepê/SP	NEG	NEG	NEG	
20	07.10.09	55931-B	08-1900	F	NI	3	Jaborandi-BA	NEG	POS	NEG	-----
		55931-T	08-1900	F	NI	3	Jaborandi-BA	NEG	NEG	NEG	-----
		55931-L	08-1900	F	NI	3	Jaborandi-BA	NEG	NEG	NEG	-----
		55931-LT	08-1900	F	NI	3	Jaborandi-BA	NEG	POS	NEG	-----
21	21.10.09	55966-B	2050/09	M	Nelore	5	Marilia/SP	NEG	POS	NEG	<i>Streptococcus spp. (Beta hemolítico)</i>
		55966-T	2050/09	M	Nelore	5	Marilia/SP	NEG	NEG	NEG	
		55966-L	2050/09	M	Nelore	5	Marilia/SP	NEG	NEG	NEG	
		55966-LT	2050/09	M	Nelore	5	Marilia/SP	NEG	POS	NEG	
22	06.11.09	216909-B	103509	NI	NI	NI	Rio Verde-GO	NEG	NEG	NEG	-----
		216909-T	103509	NI	NI	NI	Rio Verde-GO	NEG	NEG	NEG	-----
		216909-L	103509	NI	NI	NI	Rio Verde-GO	NEG	NEG	NEG	-----
		216909-LT	103509	NI	NI	NI	Rio Verde-GO	NEG	NEG	NEG	-----
23	07.01.10	56074-B	012/10	F	Girolando	NT	Nova Granada-SP	NEG	NEG	NEG	-----

		56074-T	012/10	F	Girolando	NT	Nova Granada-SP	NEG	NEG	NEG	-----
		56074-L	012/10	F	Girolando	NT	Nova Granada-SP	NEG	NEG	NEG	-----
		56074-LT	012/10	F	Girolando	NT	Nova Granada-SP	NEG	NEG	NEG	-----
24	07.01.10	56079-B	025/10	F	NI	6	Belo Horizonte-MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		56079-T	025/10	F	NI	6	Belo Horizonte-MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		56079-L	025/10	F	NI	6	Belo Horizonte-MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		56079-LT	025/10	F	NI	6	Belo Horizonte-MG	NEG	NEG	NEG	NEG
25	13.01.10	56089-B	0053/10	F	HPB	8	Jatai-GO	NEG	NEG	-----	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
		56089-T	0053/10	F	HPB	8	Jatai-GO	NEG	POS	-----	
		56089-L	0053/10	F	HPB	8	Jatai-GO	NEG	POS	-----	
		56089-LT	0053/10	F	HPB	8	Jatai-GO	NEG	NEG	-----	
26	29.01.10	56102-B2	131/10	F	Girolando	3	Prata-MG	NEG	NEG	-----	-----
		56102-T	131/10	F	Girolando	3	Prata-MG	NEG	NEG	-----	-----
		56102-L	131/10	F	Girolando	3	Prata-MG	NEG	NEG	-----	-----
		56102-LT	131/10	F	Girolando	3	Prata-MG	NEG	NEG	-----	-----
27	29.01.10	56103-B	131/10	M	Girolando	5	Prata-MG	NEG	NEG	-----	-----
		56103-T	131/101	M	Girolando	5	Prata-MG	NEG	NEG	-----	-----
		56103-L	131/10	M	Girolando	5	Prata-MG	NEG	NEG	-----	-----
		56103-LT	131/10	M	Girolando	5	Prata-MG	NEG	NEG	-----	-----
28	27.01.10	56105-B	133/10	M	Holandes	1 dia	Avai-SP	NEG	NEG	-----	-----
		56105-T	133/10	M	Holandes	1 dia	Avai-SP	NEG	NEG	-----	-----
		56105-L	133/10	M	Holandes	1 dia	Avai-SP	NEG	NEG	-----	-----
		56105-LT	133/10	M	Holandes	1 dia	Avai-SP	NEG	NEG	-----	-----
29	01.02.10	56109-B	173/10	M	Holandes	7	Jesuania-MG	NEG	NEG	NEG	-----
		56109-T	173/10	M	Holandes	7	Jesuania-MG	NEG	NEG	NEG	-----
		56109-L	173/10	M	Holandes	7	Jesuania-MG	NEG	NEG	NEG	-----

		56109-LT	173/10	M	Holandes	7	Jesuania-MG	NEG	NEG	NEG	NEG
30	01.02.10	56110-B	173/10	M	Holandes	7	Jesuania-MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		56110-T	173/10	M	Holandes	8	Jesuania-MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		56110-L	173/10	M	Holandes	8	Jesuania-MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		56110-LT	173/10	M	Holandes	8	Jesuania-MG	NEG	NEG	NEG	NEG
31	23.02.10	56134-B	0315/10	M	HPB	NI	Cajobi-SP	NEG	NEG	POSITIVO	-----
		56134-T	0315/10	M	HPB	NI	Cajobi-SP	NEG	NEG	<i>Neospora</i>	-----
		56134-L	0315/10	M	HPB	NI	Cajobi-SP	NEG	NEG	<i>caninum</i>	-----
		56134-LT	0315/10	M	HPB	NI	Cajobi-SP	NEG	NEG	cérebro	-----
32	18.03.10	56160-B	500/10	F	HPB	3	Itacaré/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56160-T	500/10	F	HPB	3	Itacaré/SP	NEG	POS	NEG	NEG
		56160-L	500/10	F	HPB	3	Itacaré/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56160-LT	500/10	F	HPB	3	Itacaré/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
33	27.09.10	56512-B	2001-B	NI	Jersey	4	Bela vista/GO	NEG	NEG	NEG	NEG
		56512-T	2001-T	NI	Jersey	4	Bela vista/GO	NEG	NEG	NEG	NEG
		56512-L	2001-L	NI	Jersey	4	Bela vista/GO	NEG	NEG	NEG	NEG
		56512-LT	2001-LT	NI	Jersey	4	Bela vista/GO	NEG	NEG	NEG	NEG
34	23.09.10	56501-B	1918/10	M	NI	5	Santa Juliana	NEG	NEG	NEG	NEG
		56501-T	1918/10	M	NI	5	Santa Juliana	NEG	NEG	NEG	NEG
		56501-L	1918/10	M	NI	5	Santa Juliana	NEG	NEG	NEG	NEG
		56501-LT	1918/10	M	NI	5	Santa Juliana	NEG	NEG	NEG	NEG
35	30.08.10	56473-B	1786/10	NI	NI	5	Porto Rico/PR	NEG	NEG	-----	-----
		56473-T	1786/10	NI	NI	5	Porto Rico/PR	NEG	NEG	-----	-----
		56473-L	1786/10	NI	NI	5	Porto Rico/PR	NEG	NEG	-----	-----
		56473-LT	1786/10	NI	NI	5	Porto Rico/PR	NEG	NEG	-----	-----
36	04.08.10	56414-B	1574/10	NI	NI	NI	Porto Feliz/ SP	NEG	NEG	NEG	NEG

		56414-T	1574/10	NI	NI	NI	Porto Feliz/ SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56414-LT	1697/10	NI	NI	NI	Porto Feliz/ SP	NEG	NEG	NEG	NEG
37	19.08.10	56446-B	1697/10	M	Não informado	7	Barra do Garças/MT	NEG	NEG	-----	NEG
38	28.04.10	56240-B	809/10	NI	Holandes	NI	Bragança Paulista/ SP	NEG	NEG	NEG	-----
		56240-T	809/10	NI	Holandes	NI	Bragança Paulista/ SP	NEG	NEG	NEG	-----
		56240-L	809/10	NI	Holandes	NI	Bragança Paulista/ SP	NEG	NEG	NEG	-----
		56240-LT	809/10	NI	Holandes	NI	Bragança Paulista/ SP	NEG	NEG	NEG	-----
39	15.07.10	56321-B	1371/10	M	HPB	6	Carmo do Paranaí	NEG	NEG	NEG	-----
		56321-T	1371/10	M	HPB	6	Carmo do Paranaí	NEG	NEG	NEG	-----
		56321-L	1371/10	M	HPB	6	Carmo do Paranaí	NEG	NEG	NEG	-----
		56321-LT	1371/10	M	HPB	6	Carmo do Paranaí	NEG	NEG	NEG	-----
40	01.07.10	56319-B	1347/10	F	NI	3	Avaré/SP	NEG	NEG	-----	-----
		56319-T	1347/10	F	NI	3	Avaré/SP	NEG	NEG	-----	-----
		56319-L	1347/10	F	NI	3	Avaré/SP	NEG	NEG	-----	-----
		56319-LT	1347/10	F	NI	3	Avaré/SP	NEG	NEG	-----	-----
41	18.03.10	56141-B	357/10	NI	HPB	NI	Araçoiaba/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56141-T	357/10	NI	HPB	NI	Araçoiaba/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56141-L	357/10	NI	HPB	NI	Araçoiaba/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56141-LT	357/10	NI	HPB	NI	Araçoiaba/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
42	16.11.10	56612-B	2423/10	NI	NI	4	Loanda/PR	NEG	NEG	POSITIVO	NEG
		56612-T	2423/10	NI	NI	4	Loanda/PR	NEG	NEG	BVD	NEG
		56612-L	2423/10	NI	NI	4	Loanda/PR	NEG	NEG	Cérebro e	NEG
		56612-P	2423/10	NI	NI	4	Loanda/PR	NEG	NEG	pool de	NEG
		56612-LT	2423/10	NI	NI	4	Loanda/PR	NEG	NEG	órgãos	NEG
43	16.11.10	56629-B	2493/10	NI	NI	NI	Itapetininga/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56629-T	2493/10	F	NI	NI	Itapetininga/SP	NEG	NEG	NEG	NEG

		56629-L	2493/10	F	NI	NI	Itapetininga/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56629-P	2493/10	F	NI	NI	Itapetininga/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56629-LT	2493/10	F	NI	NI	Itapetininga/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
44	23.11.10	56723-B	0020/11	NI	HPB	3-6	Pindamonhangaba/SP	NEG	NEG	POSITIVO	NEG
		56723-T	0020/11	NI	HPB	3-6	Pindamonhangaba/SP	NEG	NEG	<i>Neospora</i>	NEG
		56723-P	0020/11	NI	HPB	3-6	Pindamonhangaba/SP	NEG	NEG	<i>caninum</i>	NEG
		56723-LT	0020/11	NI	HPB	3-6	Pindamonhangaba/SP	NEG	NEG	cérebro	NEG
45	06.01.11	56770-B	152/11	F	NI	4	Castro/PR	NEG	NEG	NEG	NEG
		56770-T	152/11	F	NI	4	Castro/PR	NEG	NEG	NEG	NEG
		56770-L	152/11	F	NI	4	Castro/PR	NEG	NEG	NEG	NEG
		56770-LT	152/11	F	NI	4	Castro/PR	NEG	NEG	NEG	NEG
46	27.01.11	56773-T	0177/11	NI	NI	NI	Avaré/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56773-L	0177/11	NI	NI	NI	Avaré/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56773-LT	0177/11	NI	NI	NI	Avaré/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
47	28.01.11	56786-B	0248/11	F	NI	NI	São Carlos/SP	NEG	NEG	NEG	<i>Escherichia coli</i>
		56786-T	0248/11	F	NI	NI	São Carlos/SP	NEG	NEG	NEG	
		56786-L	0248/11	F	NI	NI	São Carlos/SP	NEG	NEG	NEG	
		56786-LT	0248/11	F	NI	NI	São Carlos/SP	NEG	NEG	NEG	
48	21.02.11	56850-B	0640/11	F	NI	5	Uberlândia/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		56850-T	0640/11	F	NI	5	Uberlândia/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		56850-L	0640/11	F	NI	5	Uberlândia/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		56850-LT	0640/11	F	NI	5	Uberlândia/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
49	23.03.11	56922-B	0979/11	M	NI	4	São Paulo/SP	NEG	NEG	POSITIVO	NEG
		56922-T	0979/11	M	NI	4	São Paulo/SP	NEG	NEG	BVD	NEG
		56922-L	0979/11	M	NI	4	São Paulo/SP	NEG	NEG	pool de	NEG
		56922-LT	0979/11	M	NI	4	São Paulo/SP	NEG	NEG	órgãos	NEG

50	05.05.11	56933-B	1024/11	F	Girolanda	4	Penápolis/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56933-T	1024/11	F	Girolanda	4	Penápolis/SP	NEG	POS	NEG	NEG
		56933-LT	1024/11	F	Girolanda	4	Penápolis/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
51	05.05.11	56926-B	1015/11	F	Girolando	3	Inhumas/GO	NEG	NEG	NEG	<i>Escherichia coli</i>
		56926-T	1015/11	F	Girolando	3	Inhumas/GO	NEG	NEG	NEG	
		56926-P	1015/11	F	Girolando	3	Inhumas/GO	NEG	NEG	NEG	
52	12.05.11	56950-B	1116/11	F	Jersolanda	6	Glicerio/SP	NEG	NEG	-----	-----
		56950-T	1116/11	F	Jersolanda	6	Glicerio/SP	NEG	NEG	-----	-----
		56950-L	1116/11	F	Jersolanda	6	Glicerio/SP	NEG	NEG	-----	-----
		56950-LT	1116/11	F	Jersolanda	6	Glicerio/SP	NEG	NEG	-----	-----
53	25.05.11	56963-B	1156/11	F	Holandês	8	Nova Odessa/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56963-T	1156/11	F	Holandês	8	Nova Odessa/SP	NEG	POS	NEG	NEG
		56963-L	1156/11	F	Holandês	8	Nova Odessa/SP	NEG	POS	NEG	NEG
		56963-LA	1156/11	F	Holandês	8	Nova Odessa/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56963-LP	1156/11	F	Holandês	8	Nova Odessa/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		56963-LT	1156/11	F	Holandês	8	Nova Odessa/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
54	30.05.11	56972-B	1182/11	F	Holandesa	2	Brasília/DF	NEG	NEG	NEG	NEG
		56972-T	1182/11	F	Holandesa	2	Brasília/DF	NEG	NEG	NEG	NEG
		56972-L	1182/11	F	Holandesa	2	Brasília/DF	NEG	NEG	NEG	NEG
55	01.06.11	57009-B	1401/11	F	NI	4	Barbacena/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57009-T	1401/11	F	NI	4	Barbacena/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57009-L	1401/11	F	NI	4	Barbacena/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
56	28.06.11	57003-B	1380/11	M	NI	6	Caete/MG	NEG	NEG	-----	NEG
		57003-T	1380/11	M	NI	6	Caete/MG	NEG	NEG	-----	NEG
		57003-L	1380/11	M	NI	6	Caete/MG	NEG	NEG	-----	NEG
		57003-LA	1380/11	M	NI	6	Caete/MG	NEG	NEG	-----	NEG

57	22.06.11	57020-B	1472/11	F	NI	6	Caete/MG	NEG	POS	NEG	NEG
		57020-T	1472/11	F	NI	6	Caete/MG	NEG	POS	NEG	NEG
		57020-L	1472/11	F	NI	6	Caete/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57020-LA	1472/11	F	NI	6	Caete/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
58	06.07.11	57024-B	1492/11	F	Nelore	8	Não Informado	NEG	NEG	NEG	NEG
		57024-T	1492/11	F	Nelore	8	Não Informado	NEG	NEG	NEG	NEG
		57024-L	1492/11	F	Nelore	8	Não Informado	NEG	NEG	NEG	NEG
		57024-LA	1492/11	F	Nelore	8	Não Informado	NEG	NEG	NEG	NEG
59	07.07.11	57039-B	1614/11	NI	NI	6	Mirassol/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		57039-T	1614/11	NI	NI	6	Mirassol/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		57039-L	1614/11	NI	NI	6	Mirassol/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		57039-LA	1614/11	NI	NI	6	Mirassol/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
60	22.07.11	57056-B	1690/11	NI	Jersolando	5	Jaborandi/BA	NEG	NEG	NEG	NEG
		57056-T	1690/11	NI	Jersolando	5	Jaborandi/BA	NEG	NEG	NEG	NEG
		57056-L	1690/11	NI	Jersolando	5	Jaborandi/BA	NEG	NEG	NEG	NEG
		57056-LA	1690/11	NI	Jersolando	5	Jaborandi/BA	NEG	NEG	NEG	NEG
61	02.08.11	57057-T	1690/11	NI	Jersolando	6	Jaborandi/BA	NEG	NEG	-----	NEG
		57057-L	1690/11	NI	Jersolando	6	Jaborandi/BA	NEG	NEG	-----	NEG
62	02.08.11	57094-L	1925/11	F	NI	6	Capitólio/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57094-T	1925/11	F	NI	6	Capitólio/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57094-B	1925/11	F	NI	6	Capitólio/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57094-LT	1925/11	F	NI	6	Capitólio/MG	NEG	NEG	NEG	NEG

63	02.08.11	57095-L	1925/11	F	NI	NI	Capitólio/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57095-PL	1925/11	F	NI	NI	Capitólio/MG	NEG	POS	NEG	NEG
64	29/08/11	57097-T	1934/11	F	NI	NI	Sales Oliveira/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		57097-B	1934/11	F	NI	NI	Sales Oliveira/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		57097-L.T	1934/11	F	NI	NI	Sales Oliveira/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		57097	1934/11	F	NI	NI	Sales Oliveira/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
65	29/08/11	57113-L	2054/11	M	Holandes	4	Inhumas/GO	NEG	NEG	NEG	NEG
		57113-T	2054/11	M	Holandes	4	Inhumas/GO	NEG	NEG	NEG	NEG
		57113-B	2054/11	M	Holandes	4	Inhumas/GO	NEG	NEG	NEG	NEG
		57113-LT	2054/11	M	Holandes	4	Inhumas/GO	NEG	NEG	NEG	NEG
66	29/08/11	57140B	2158/11	NI	NI	NI	Santa Teresa/ES	NEG	NEG	NEG	NEG
67	21/11/11	57208 LT	2622/11	NI	NI	NI	Votuporanga/SP	NEG	NEG	NEG	-----
		57208 LC	2622/11	NI	NI	NI	Votuporanga/SP	NEG	NEG	NEG	-----
		57208 T	2622/11	NI	NI	NI	Votuporanga/SP	NEG	NEG	NEG	-----
68	13/01/12	57328-B	84/12	M	HPB	1	Mirandópolis/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		57328-T	84/12	M	HPB	1	Mirandópolis/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		57328-L	84/12	M	HPB	1	Mirandópolis/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
69	28/02/12	57401-LE	400/12	M	NI	NI	Patrocínio/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57401-B	400/12	M	NI	NI	Patrocínio/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57401-LT	400/12	M	NI	NI	Patrocínio/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57401T	400/12	M	NI	NI	Patrocínio/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
70	05/03/12	57474- B	728/12	M	Zebu	4	Uberaba/MG	NEG	POS	NEG	NEG
		57474-LA	728/12	M	Zebu	4	Uberaba/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57474-T	728/12	M	Zebu	4	Uberaba/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57474-L	728/12	M	Zebu	4	Uberaba/MG	NEG	NEG	NEG	NEG

71	10/04/12	57481-B	763/12	M	Gir	6	Silvianópolis/MG	NEG	NEG	NEG	<i>Staphylococcus aureus</i>
		57481-T	763/12	M	Gir	6	Silvianópolis/MG	NEG	NEG	NEG	
		57481-LT	763/12	M	Gir	6	Silvianópolis/MG	NEG	NEG	NEG	
		57481-L	763/12	M	Gir	6	Silvianópolis/MG	NEG	NEG	NEG	
72		57568-T	1211/12	M	HPB	5	Avaré/SP	NEG	NEG	NEG	-----
		57568-B	1211/12	M	HPB	5	Avaré/SP	NEG	NEG	NEG	
		57568-LT	1211/12	M	HPB	5	Avaré/SP	NEG	NEG	NEG	
		57568-L	1211/12	M	HPB	5	Avaré/SP	NEG	NEG	NEG	
73	13/06/12	57590-L	1309/12	F	<i>Bos taurus</i>	NI	NI	NEG	NEG	NEG	-----
		57590-B	1309/12	F	<i>Bos taurus</i>	NI	NI	NEG	NEG	NEG	
		57590-T	1309/12	F	<i>Bos taurus</i>	NI	NI	NEG	NEG	NEG	
		57590-LT	1309/12	F	<i>Bos taurus</i>	NI	NI	NEG	NEG	NEG	
74	27/06/12	57619-L	1453/12	NI	<i>Bos taurus</i>	2	Araxá/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57619-LT	1453/12	NI	<i>Bos taurus</i>	2	Araxá/MG	NEG	NEG	NEG	
		57619-B	1453/12	NI	<i>Bos taurus</i>	2	Araxá/MG	NEG	NEG	NEG	
		57619-T	1453/12	NI	<i>Bos taurus</i>	2	Araxá/MG	NEG	NEG	NEG	
75	18/07/12	57641-L	1593/12	F	HPB	4	São José do Barreiro/SP	NEG	NEG	POSITIVO <i>Neospora caninum</i> SNC	-----
		57641-T	1593/12	F	HPB	4	São José do Barreiro/SP	NEG	NEG		
		57641-B	1593/12	F	HPB	4	São José do Barreiro/SP	NEG	NEG		
		57641-LT	1593/12	F	HPB	4	São José do Barreiro/SP	NEG	NEG		
76	10/08/12	57673-L	1860/12	F	NI	5	Olímpia/SP	NEG	NEG	POSITIVO <i>Neospora caninum</i> SNC	NEG
		57673-LT	1860/12	F	NI	5	Olímpia/SP	NEG	NEG		
		57673-B	1860/12	F	NI	5	Olímpia/SP	NEG	NEG		
		57673-T	1860/12	F	NI	5	Olímpia/SP	NEG	NEG		
77	15/08/12	57676-L	1869/12	NI	NI	4	Pouso Alegre/MG	NEG	NEG	NEG	-----
		57676-T	1869/12	NI	NI	4	Pouso Alegre/MG	NEG	NEG	NEG	-----

		57676-B	1869/12	NI	NI	4	Pouso Alegre/MG	NEG	NEG	NEG	-----
		57676-LT	1869/12	NI	NI	4	Pouso Alegre/MG	NEG	NEG	NEG	-----
78	15/08/12	57684-B	1882/12	NI	HPB	6	Carmo do Rio Claro/MG	NEG	NEG	POSITIVO BVD pool de órgãos	NEG
		57684-T	1882/12	NI	HPB	6	Carmo do Rio Claro/MG	NEG	NEG		NEG
		57684-L	1882/12	NI	HPB	6	Carmo do Rio Claro/MG	NEG	NEG		NEG
		57684-LT	1882/12	NI	HPB	6	Carmo do Rio Claro/MG	NEG	NEG		NEG
79	16/08/12	57685-L	1901/12	F	HPB	5	Avaré/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		57685-LT	1901/12	F	HPB	5	Avaré/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		57685-B	1901/12	F	HPB	5	Avaré/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
		57685-T	1901/12	F	HPB	5	Avaré/SP	NEG	NEG	NEG	NEG
80	10/10/12	57761-T	2358/12	F	Nelore	6	Uberlândia/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57761-B	2358/12	F	Nelore	6	Uberlândia/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57761-LT	2358/12	F	Nelore	6	Uberlândia/MG	NEG	NEG	NEG	NEG
		57761-L	2358/12	F	Nelore	6	Uberlândia/MG	NEG	NEG	NEG	NEG