

1 **DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS**
2 **SÉRICOS CONTRA O VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA**
3 **DEVELOPMENT OF AN ELISA FOR DETECTION OF SERUM ANTIBODIES**
4 **AGAINST BOVINE LEUKEMIA VIRUS**

5
6 **C. TOCHETTO¹, A. C. BALBINOT², K. C. PRIOR³, D. DEZEN^{3,*}**

7
8 **RESUMO**

9 A Leucose enzoótica bovina é uma enfermidade crônica que acarreta prejuízos econômicos ao
10 rebanho bovino. Detectar a presença de animais infectados é uma etapa importante no
11 controle desta doença. Portanto, neste trabalho procurou-se investigar a prevalência do vírus
12 na região estudada e paralelamente desenvolver um ELISA capaz de discriminar animais
13 sorologicamente positivos para o vírus da leucose bovina (BLV). Para o ELISA, diluições do
14 antígeno e de amostras de soros controles foram otimizadas e 289 amostras de soro, colhidas
15 em 42 rebanhos leiteiros de propriedades do Alto Uruguai Catarinense, foram testadas. Os
16 resultados obtidos foram comparados aos da imunodifusão em gel de ágar (IDGA). A análise
17 dos critérios de comparação permitiu concluir que o ELISA desenvolvido apresentou um
18 desempenho satisfatório e foi capaz de discriminar animais infectados e não infectados.
19 Embora os valores de sensibilidade (80,2%) e especificidade (71,2%) do teste tenham sido
20 menores aos encontrados na literatura, este pode ser associado à IDGA como teste de triagem,
21 visando diminuir falso-negativos. A prevalência de anticorpos contra o BLV na população
22 amostrada foi de 31% para a IDGA e 45% para o ELISA. Das propriedades, 20 (47,6%)
23 possuíam ao menos um animal positivo no ELISA. Estes dados indicam que a Leucose

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

² JBS Foods, Concórdia, SC.

³ Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC.

*Autor para correspondência: diogenes.dezen@ifc-concordia.edu.br

24 Enzoótica Bovina (LEB) está amplamente disseminada nos rebanhos leiteiros da região.
25 Portanto, o teste desenvolvido pode servir como uma ferramenta de triagem inicial,
26 contribuindo desta maneira para o monitoramento sorológico do rebanho.

27 PALAVRAS-CHAVE: Leucose bovina, ELISA e IDGA.

28

29 **ABSTRACT**

30 The Enzootic bovine leucosis is a chronic disease that causes economic losses to cattle. The
31 presence of infected animals is an important step in controlling this disease. Therefore, this
32 study aimed to investigate the prevalence of the virus in the studied region and in parallel
33 develop an ELISA capable of discriminating serologically positive animals for bovine
34 leukemia virus (BLV). For the ELISA, dilutions of antigen and serum controls were
35 optimized. Serum samples (n = 289) collected from 42 dairy herds in properties from *Alto*
36 *Uruguai Catarinense* (Brazil) were tested. The results obtained were compared with Agar Gel
37 Immunodiffusion (AGID). The comparative analysis concluded that the developed ELISA
38 showed a satisfactory performance and was able to discriminate between infected and
39 uninfected animals. Although the sensitivity (80.2%) and specificity (71.2%) of the test
40 showed lower values than those found in previous studies, the ELISA can be associated with
41 IDGA as a screening test, in order to prevent false negatives. The prevalence of antibodies
42 against BLV found was 31% for AGID and 45% for ELISA. From 42 properties, 47.6% had
43 at least one positive animal in the EILISA. These results indicate that Bovine Leukosis is
44 widespread in dairy herds in the region. Therefore, the test developed could be used as an
45 initial screening tool, thus contributing to the serological monitoring of the herd

46 KEYWORDS: Bovine leukosis, ELISA and IDGA.

47

48

INTRODUÇÃO

49 A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma enfermidade viral crônica, mundialmente
50 distribuída e que causa sérios prejuízos econômicos à pecuária bovina (JUNIOR et al., 2001).
51 A enfermidade é induzida pelo Vírus da Leucose Bovina (BLV), um retrovírus que infecta
52 preferencialmente os linfócitos B. Dos animais que são infectados pelo BLV, todos
53 permanecem persistentemente infectados, porém apenas 1 a 5% desenvolve a forma clínica da
54 doença e aproximadamente 30% apresenta linfocitose persistente. A forma clínica é
55 observada com maior frequência em animais de 5 a 8 anos de idade e cursa com a formação
56 de linfossarcomas em vários órgãos (BARROS, 2007; RAVAZZOLLO, DA COSTA, 2007).

57 A soroprevalência do BLV em rebanhos bovinos é variável, sendo que há relatos de
58 8,3% a 54,3%, dependendo da região do Brasil analisada (BARROS FILHO et al., 2010;
59 FERNANDES, 2007; MATOS et al., 2005; PIOVESAN et al., 2013, POLETTO et al., 2004;
60 ROMERO, ROWE, 1981; SIMÕES, 1988; SPONCHIADO, 2008).

61 Testes como IDGA e ELISA têm sido utilizados para a determinação da
62 soroprevalência do BLV. A IDGA é o teste de triagem recomendado internacionalmente por
63 apresentar boa sensibilidade e especificidade. No entanto, alguns autores reportaram que a
64 prevalência de LEB nos rebanhos examinados pela IDGA pode estar subestimada, pois ela é
65 menos sensível que o ELISA (CASTRO et al., 2013; MALOVRH et al., 2005). Além disso, a
66 interpretação de seus resultados é às vezes subjetiva e depende de um bom treinamento e
67 experiência. Por outro lado, o ELISA é um teste prático, relativamente barato e pode ser
68 utilizado em larga escala (MALOVRH et al., 2005).

69 Por esse motivo, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um ELISA baseado na
70 detecção de anticorpos contra BLV. Para isso, foram amostrados soro de bovinos,
71 provenientes da região do Alto Uruguai Catarinense, e realizada a pesquisa de anticorpos
72 contra o BLV utilizando-se as técnicas de IDGA e de ELISA. Estas duas técnicas foram
73 comparadas, a fim de verificar se o teste desenvolvido produziu resultados confiáveis; para

74 isso, utilizou-se como parâmetros a sensibilidade, a especificidade, a área sob a curva ROC e
75 as razões de verossimilhança para o teste positivo e negativo.

76

77

MATERIAL E MÉTODOS

78 Foram utilizadas 289 amostras de sangue de bovinos de raças leiteiras, provenientes de
79 42 propriedades dos municípios catarinenses de Concórdia, Jaborá e Seara. Em cada
80 propriedade, aproximadamente 20% dos animais do rebanho foram amostrados. As colheitas
81 foram realizadas através da venopunção na veia coccígea caudal, com agulhas descartáveis
82 (22G), em tubos com vácuo sem anticoagulante. Após a formação do coágulo, as amostras
83 foram centrifugadas por 10 min a 3000 rpm. O sobrenadante obtido foi aliquotado em
84 microtubos e armazenado a -20°C até a realização do teste de IDGA e ELISA.

85 Como padrão ouro, foi empregado o teste de IDGA por meio da técnica de
86 imunodifusão radial dupla de Ouchterlony, conforme preconizado pela Organização
87 Internacional de Epizootias (OIE, 2012). Para isso, foi utilizado um kit comercial (TECPAR,
88 Curitiba, Brasil) para a detecção de anticorpos séricos específicos anti-BLV.

89 A padronização do ELISA foi realizada conforme recomendado pela FAO/OIE
90 (WRIGHT et al., 1993). Inicialmente, foram otimizadas variáveis como diluições de antígeno
91 (Ag) e do soro primário (Ac) utilizando planejamento fatorial 2 em duplicata, com 2 variáveis
92 (Ag e Ac) em doze e sete níveis de variação, respectivamente. Os níveis de variação para Ag
93 foram diluições de 1:10 a 1:20.480; já os níveis de variação utilizados para o Ac foram
94 diluições de 1:5 a 1:320. Como controles, foram utilizados, em duplicata, um soro controle
95 positivo e um soro controle negativo, previamente testados na IDGA. O antígeno do ELISA
96 foi obtido de células de rim de cordeiro persistentemente infectadas com o BLV (VAN DER
97 MAATEN, MILLER, 1975) seguindo metodologia previamente descrita (TRONO et al.,
98 2001).

99 Placas de 96 orifícios com fundo plano foram sensibilizadas com 100 µL/orifício do
100 antígeno diluído em tampão carbonato/bicarbonato (0,05M, pH 9,6) na proporção 1:10 a
101 1:20480, incubadas a 4°C por 18-24 horas e lavadas três vezes com solução tampão fosfato
102 pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Para neutralizar reações inespecíficas entre o
103 antígeno e o soro bovino, foi adicionado 100 µL/orifício de solução a 1% de albumina sérica
104 bovina. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e depois foram
105 realizadas três lavagens com solução PBS-T.

106 Os soros controles positivo e negativo foram diluídos em PBS-T, na proporção de 1:5 a
107 1:320, adicionados em duplicata na placa e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente.
108 Depois de realizadas três lavagens, foi adicionado em cada orifício 100 µL de imunoglobulina
109 caprina anti-IgG bovina, conjugada com peroxidase, diluída 1:10.000 em PBS-T. Após a
110 incubação em temperatura ambiente por 30 minutos, a placa foi lavada três vezes, seguida de
111 adição de 100 µL/orifício do revelador (TMB – tetrametilbenzidina), incubação por 10
112 minutos em temperatura ambiente e bloqueio da reação através do acréscimo de 100 µL de
113 solução de parada (HCL 1M).

114 A absorbância foi lida em espectrofotômetro com filtro de 630 nm e a diluição ótima do
115 Ag e do Ac foi determinada pela maior razão obtida entre o controle positivo e negativo.
116 Após a padronização, as amostras colhidas foram testadas através da técnica de ELISA nas
117 condições otimizadas, seguindo os procedimentos previamente descritos.

118 A partir dos valores de absorbância obtidos das amostras testadas, foi calculada a razão
119 entre amostra e controle positivo (S/P) através da seguinte fórmula:

$$S/P = \frac{AA - ACN}{ACP - ACN}$$

120

121 Onde, “AA” é a média dos valores de absorvância da amostra; “ACN” é média dos
122 valores de absorvância do controle negativo e “ACP” é a média dos valores de absorvância do
123 controle positivo.

124 Foram utilizadas medidas de validade de teste diagnóstico para verificar a habilidade do
125 teste de ELISA desenvolvido em discriminar amostras positivas e negativas. Os resultados
126 obtidos no ELISA foram comparados aos resultados das amostras previamente testadas na
127 IDGA através da determinação da área sob a curva ROC (*Receiver Operator Characteristic*)
128 ou curva operacional relativa (GREINER et al., 1995). Por meio da curva ROC foi
129 estabelecido o ponto de corte com base nos valores de S/P obtidos. A partir da definição do
130 ponto de corte, determinou-se a sensibilidade e a especificidade do ELISA em relação à
131 IDGA. A curva ROC e os cálculos de sensibilidade e especificidade foram executados por
132 meio do pacote estatístico SPSS® versão 19.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*,
133 *IBM Company*). Os valores de sensibilidade foram traçados em relação aos falsos positivos
134 (1– Especificidade) para cada possível ponto de corte da razão S/P do ELISA. Os valores de
135 especificidade e sensibilidade foram calculados tendo como base o teste referência, no caso a
136 IDGA. O ponto onde se obteve, simultaneamente, os maiores valores de sensibilidade e
137 especificidade, foi definido como o ponto de corte.

138 Durante o experimento, foram cumpridas as exigências de conforto e bem-estar dos
139 animais, de acordo com as normas do comitê de ética em experimentação animal. O trabalho
140 foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade do Estado de
141 Santa Catarina (CETEA/UEDESC), processo nº. 1.47.12

142

143

RESULTADOS E DISCUSSÃO

144 O ELISA foi otimizado utilizando-se diluições de 1:20 e 1:40 do antígeno e do
145 anticorpo, respectivamente. Nestas diluições encontrou-se a maior razão entre a densidade

146 óptica do soro controle positivo e do soro controle negativo. A representação gráfica da curva
147 ROC está ilustrada na Figura 1, e a seta indica o ponto de corte o qual correspondeu a $S/P =$
148 0,53. A área sob a curva foi de 0,77 classificando o desempenho do teste como satisfatório
149 (MARTINEZ et al., 2003).

150 A partir da curva ROC, o ponto de corte da razão S/P foi definido em 0,53, uma vez que
151 nesse ponto encontrou-se, simultaneamente, o menor erro possível de falso-positivos e falso-
152 negativos, apresentando o ELISA sensibilidade de 80,2% e especificidade de 71,2%. Os
153 valores obtidos para sensibilidade e especificidade se mostraram abaixo dos valores
154 encontrados na literatura, os quais variaram de 97,2 a 100% para a sensibilidade e de 79,7 a
155 99,8% para a especificidade (KLINTEVALL et al., 1991; TRONO et al., 2001; GONZÁLEZ
156 et al., 2007). A discordância destes valores pode ter sido gerada devido às diferenças
157 antigênicas do antígeno comercial e do antígeno utilizado no ELISA, uma vez que diferenças
158 significativas entre genótipos do vírus têm sido relatadas e estas podem se traduzir em
159 diferenças antigênicas (D'ANGELINO et al., 2013; RODRIGUEZ et al., 2009).

160 Os valores da razão S/P obtidos nas amostras testadas frente ao ELISA variaram de -
161 332,00 a 30,04. Na Figura 2 é possível observar que a maioria destes valores (64,3%) estão no
162 intervalo compreendido de $-0,5$ a $+3$. A partir da definição do ponto de corte as amostras
163 foram classificadas em positivas ($S/P \geq 0,53$) e negativas ($S/P < 0,53$). Verificou-se que no
164 ELISA, 45% ($n = 130$) das amostras foram classificadas como positivas e 55% ($n = 159$)
165 como negativas (Tabela 1). Na IDGA, 31% ($n = 91$) e 69% ($n = 198$) das amostras foram
166 positivas e negativas, respectivamente.

167 A prevalência de animais infectados pelo BLV, obtidas no teste de IDGA, foi
168 semelhante à relatada em outras regiões do país (BARROS FILHO et al., 2010;
169 FERNANDES, 2007; MATOS et al., 2005; PIOVESAN et al., 2013, POLETTO et al., 2004;
170 ROMERO, ROWE, 1981; SIMÕES, 1988; SPONCHIADO, 2008). A diferença de 14% na

171 prevalência obtida pelas duas técnicas pode ser explicada pelas diferenças de sensibilidade e
172 especificidade entre as provas, justificando 31 e 45% de soropositivos para a IDGA e o
173 ELISA, respectivamente. Das 289 amostras testadas, 73 e 141 amostras foram
174 simultaneamente positivas e negativas, respectivamente, em ambos os testes (Quadro 1),
175 observando-se uma concordância de 74% dos resultados. Entretanto, adotando-se como teste
176 padrão ouro o IDGA, obteve-se no ELISA 57 falso-positivos e 18 falso-negativos. Por outro
177 lado, sabe-se que a IDGA apresenta menor sensibilidade que o ELISA (TRONO et al., 2001;
178 MALOVRH et al., 2005) e, por isso, pode ter subestimado o número de animais infectados.
179 Trono et al. (2001) identificaram que a IDGA não foi capaz de detectar 24,8% dos animais
180 infectados pelo BLV, enquanto que apenas 2,8% não foram detectados pelo ELISA.

181 A partir da análise da soroprevalência nas 42 propriedades avaliadas, foi observado que
182 20 (47,6%) continham pelo menos um animal soropositivo, enquanto que 22 (52,4%) foram
183 livres para o BLV (Figura 3). Esse resultado difere dos encontrados por Trono et al.(2001) e
184 Ott et al. (2003) que obtiveram 84 e 88% das propriedades infectadas na Argentina e nos
185 Estados Unidos, respectivamente. Em Mafra (SC), apenas 7,6% dos animais foram
186 soropositivos para o BLV e 10,85% das propriedades estavam infectadas (LUDERS, 2001).
187 Já em Londrina (PR), a prevalência foi de 70%, porém a taxa de propriedades infectadas, foi
188 menor, de 35,75% (CARVALHO et al., 1996). O resultado encontrado evidencia o risco de
189 disseminação do BLV nos rebanhos, uma vez que a coabitação de animais saudáveis e
190 infectados contribui para o aumento da prevalência da LEB. Isso reforça a importância do
191 desenvolvimento e aplicação de testes mais sensíveis para o diagnóstico precoce e
192 implantação de programas de controle e erradicação, a fim de evitar a disseminação do BLV
193 nos rebanhos e, conseqüentemente, os prejuízos ocasionados pela infecção, como queda na
194 produção, mortalidade e restrições de mercado.

195

196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que o ELISA desenvolvido apresentou um desempenho satisfatório e foi capaz de discriminar animais infectados e não infectados. Embora a sensibilidade e especificidade do teste tenham sido menores que os encontrados na literatura, ele pode ser utilizado em conjunto com a IDGA como teste de triagem, a fim de diminuir as chances de amostras falso-negativas. A prevalência da LEB foi considerada alta e o BLV está amplamente disseminado nos rebanhos leiteiros da região analisada. Esses resultados reforçam a necessidade da implantação de programas de controle da doença e conscientização dos produtores e técnicos sobre os prejuízos ocasionados pela presença do BLV no rebanho.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos médicos veterinários Eduardo Peres Neto e Henrique Ventura, da Secretaria de Agricultura da Prefeitura Municipal de Seara-SC, pelo auxílio na coleta das amostras.

REFERÊNCIAS

- 213
- 214 BARROS, C.S.L. Leucose Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.;
- 215 BORGES, J.R.J. (Ed.). **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 3. ed. Santa Maria: Fernovi,
- 216 2007. v.1. p.159-167.
- 217
- 218 BARROS FILHO, I.R.; GUIMARÃES, A.K.; SPONCHIADO, D.; KRÜGER, E.R.;
- 219 WAMMES, E.V.; OLLHOFF, R.D.; DORNBUSCH, P.T.; BIONDO, Q.W. Soroprevalência
- 220 de anticorpos para o vírus da leucose enzoótica em bovinos criados na região metropolitana
- 221 de Curitiba, Paraná. **Arq. Inst. Biol**, v.77, n.3, p.511-515, 2010.
- 222
- 223 BRAGA, F.M.; LANN, C.W.; HALFEN, D.C.; VIDOR, T. Avaliação de métodos de controle
- 224 da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina. **Ciência Rural**, v.27, n.4, p.635–640,
- 225 1997.
- 226
- 227 CARVALHO, L; BENESI, F.J.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; BIRGEL, E.H. Prevalência de
- 228 anticorpos séricos antivírus da Leucose dos Bovinos em animais da raça holandesa preto e
- 229 branca e zebuínos da raça nelore, criados no polo regional de Londrina, Estado do Paraná.
- 230 **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.17, n.1, p. 53-57, 1996.
- 231
- 232 CASTRO, C.C.; NUNES, C.F.; FINGER, P.F.; SIEDLER, B.S.; DUMMER, L.; LIMA, M.;
- 233 LEITE, F.P.; FISCHER, G.; VARGAS, G.D.; HÜBNER, S.O. Peroxidase-linked assay for
- 234 detection of antibodies against bovine leukosis virus. **J Immunoassay Immunochem**, v. 34,
- 235 n. 4, p. 376-83, 2013.

236

237 D'ANGELINO, R.H.; PITUCO, E.M.; VILLALOBOS, E.M.; HARA KAVA, R.; GREGORI,
238 F.; DEL FAVA, C. Detection of bovine leukemia virus in brains of cattle with a neurological
239 syndrome: pathological and molecular studies. **Biomed Res Int.**, v. 2013; p. 425646, 2013.

240

241 FERNANDES, C.H.C. **Leucose Enzoótica dos bovinos: soroprevalência, fatores de risco e**
242 **níveis séricos de lisozima em bovinos leiteiros do Estado do Tocantins, Brasil.** 2007. 89 f.
243 Tese (Doutorado) - Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Federal Rural de
244 Pernambuco, 2007.

245

246 GONZÁLEZ, E.T., LICURSI, M.; BONZO, E. Enzootic bovine leukosis: performance of an
247 indirect ELISA applied in serological diagnosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38,
248 p.1-5, 2007.

249

250 GREINER, M.; SOHR, D.; GOBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off
251 values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **J. Immunological**
252 **Methods**, v.185, p.123-132, 1995.

253

254 JUNIOR, L.A.L; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A. A. Leucose enzoótica bovina e vírus da
255 leucemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.22, n.2, p.211-221, 2001.

256

257 KLINTEVALL, K.; NÄSLUND, K.; SVEDLUND, G.; HAJDU, L.; LINDE, N.
258 KLINGEBORN, B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine
259 leukaemia virus in milk. **Journal of Virological Methods**, v.33, p.319-333,1991.

260

261 LUDERS, M.A. **Prevalência de anticorpos contra o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina**
262 **em fêmeas com mais de dois anos no rebanho de bovinos leiteiros no Município de**
263 **Mafra, SC.** Lages, 2001. 30 f. Dissertação (Mestrado em Ciências
264 Agroveteveterinárias/Sanidade Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lajes,
265 2001.

266

267 MALOVRH, T.; PATE M.; OCEPEK, M.; KRT, B. Comparison of agar gel immunodiffusion
268 test, enzyme-linked immunosorbent assay and PCR in diagnostics of enzootic bovine
269 leukosis. **Veterinarski glasnik**, v.59, n.3-4, p.363-370, 2005.

270

271 MARTINEZ, E.Z; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B.B. A curva ROC para testes
272 diagnósticos. **Caderno de Saúde Coletiva**, v.11, n.1, p.7-31, 2003.

273

274 MATOS, P. F.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos:
275 prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre os
276 resultados do teste de ELISA e da imunodifusão em gel de ágar. **Braz. J. Vet. Res. Anim.**
277 **Sci.**, v.42, p.171-179, 2005.

278

279 MEDRONHO R.A.; PEREZ M.A. Testes diagnósticos. In: MEDRONHO R.A, BLOCH K.V.,
280 LUIZ R.R., WERNECK G.L (Eds). **Epidemiologia**. 2. ed. Atheneu, São Paulo, p.389-402,
281 2008.

282

283 OTT, S. L.; JOHNSON, R.; WELLS, S. J. Association between bovine-leukosis virus
284 seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. **Preventive Veterinary**
285 **Medicine**, v.61, n.4, p.249–262, 2003.

286

287 OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 7 ed. Paris,
288 França:World Organisation for Animal Health (OIE), 2012, 1404 p.

289

290 PIOVESAN, M.; FERNANDES, M.H.V.; CORRÊA, R.A.; PRADO, M.H.J.; CAMARGO,
291 A.D.; RODRIGUES P.R.C. Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarreia
292 viral bovina e vírus da leucose enzoótica bovina na região da campanha do estado do Rio
293 Grande do sul. **Science and Animal Health**, v.1, p.38–49, 2013.

294

295 POLETTO, R.; KREUTZ, L.C.; GONZALES, J.C.; BARCELLOS, L.J.G. Prevalência de
296 Brucelose, Tuberculose e Infecções Víricas em Bovinos Leiteiros do Município de Passo
297 Fundo, RS. **Ciência Rural**, v.34, p.595-598, 2004.

298

299 RAVAZZOLLO, A. P.; DA COSTA, U. Retroviridae. In: FLORES E.F. (Ed.) **Virologia**
300 **Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. p.819-822.

301

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

305

306 ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. **Trop. Anim.**
307 **Health Prod.**, v.13, p.107-111, 1981.

308

309 SIMÕES, S.V.D. **Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose dos bovinos em**
310 **rebanhos leiteiros criados no estado da Paraíba**, 1988. 118f. Dissertação (Mestrado).
311 Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 1988.

312

313 SPONCHIADO, D. **Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da Leucose Enzoótica**
314 **Bovina em rebanhos da raça Holandesa Preta e Branca, criados no estado do Paraná.**
315 Curitiba, 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade
316 Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

317

318 TRONO, K.G.; PÉREZ-FILGUEIRA, D.M.; DUFFY, S.; BORCA, M.V.; CARRILLO, C.
319 Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of
320 sensitivity and specificity of different detection methods. **Veterinary Microbiology**, v.83,
321 p.235-248, 2001.

322

323 VAN DER MAATEN, M.J.; MILLER, J.M. Replication of bovine leukemia virus in
324 monolayer cell culture. **Bibl. Haematol.**, v.43, p.360-362, 1975.

325

326 WRIGHT, P.F.; NILSSON, E.; VANROOIJ, E.M.A.; LELENTA, M.; JEGGO, M.H.
327 Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the
328 detection of antibody in infectious disease diagnosis. **Revue Scientifique de l'Office**
329 **International des Epizooties**, v.12, p.435-450, 1993.

330

TABELA

331

332 Tabela 1. Análise entre os resultados obtidos no IDGA e no ELISA.

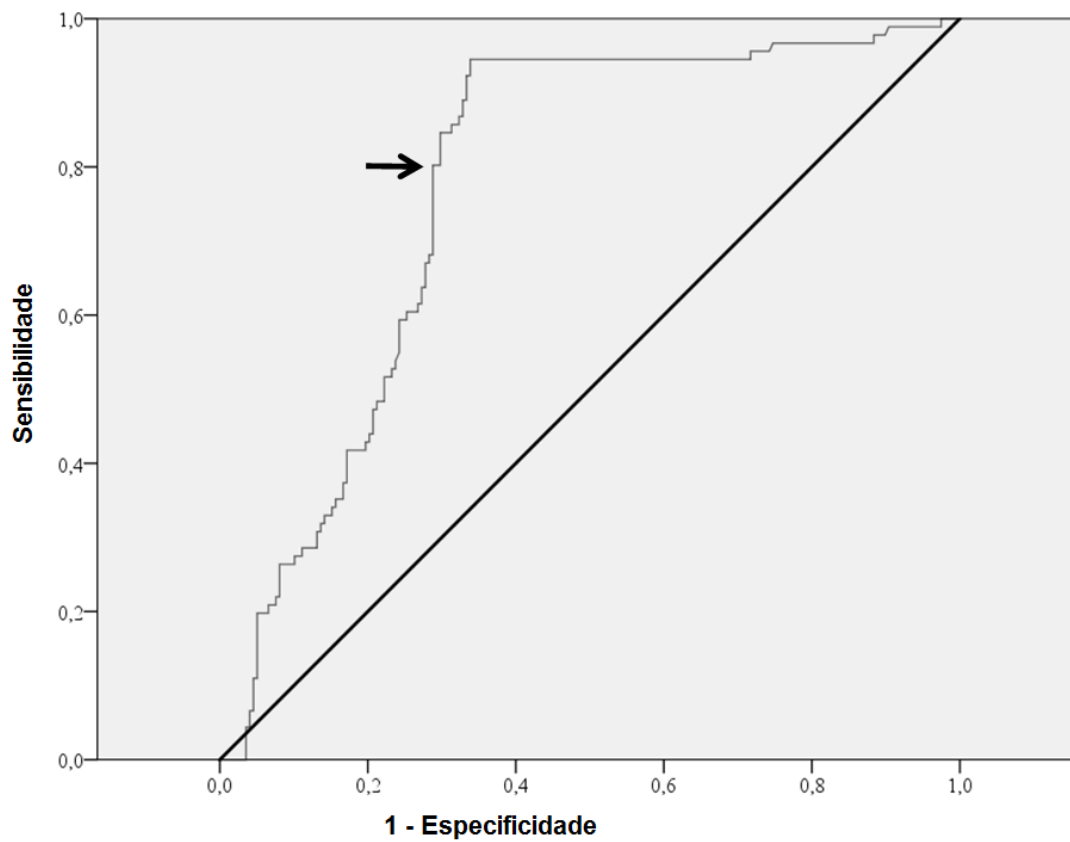
	IDGA – Negativo	IDGA – Positivo	Total
ELISA – Negativo	141	18	159
ELISA – Positivo	57	73	130
Total	198	91	289

333

334

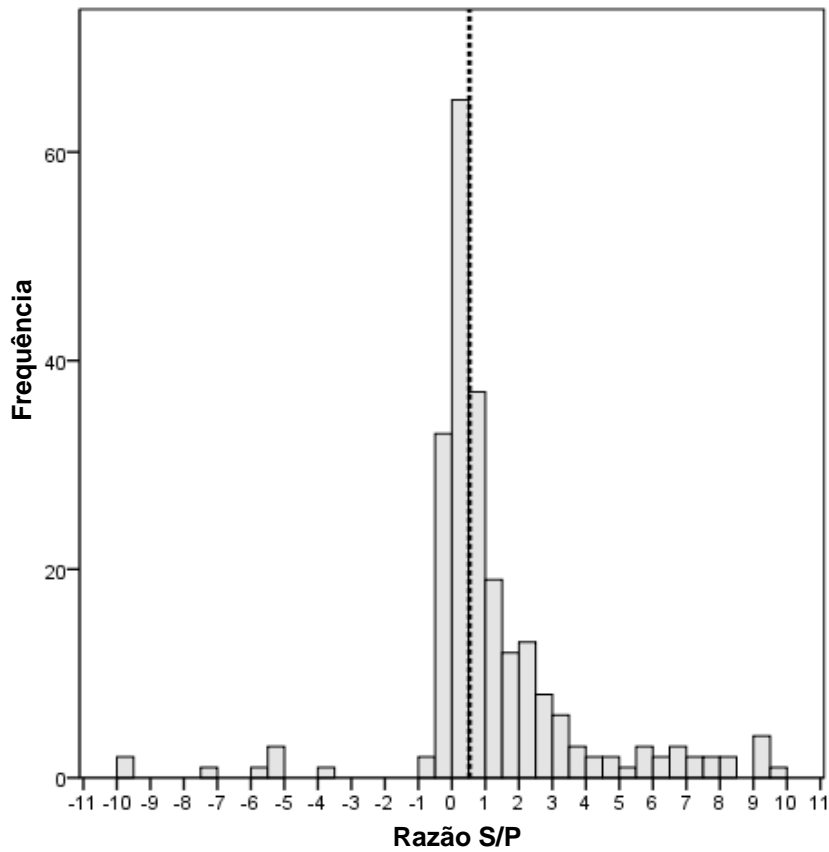
FIGURAS

335



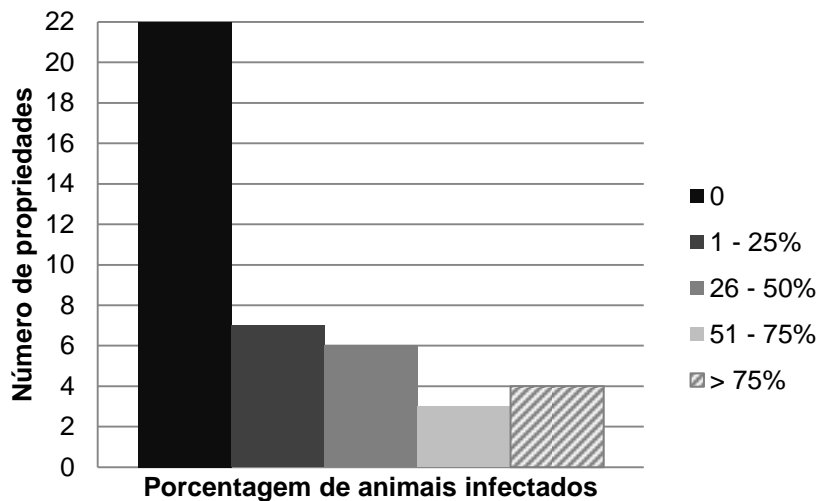
336

337 **Figura 1.** Curva ROC mostrando os resultados de sensibilidade e 1-especificidade em relação
338 a todos possíveis pontos de corte da razão S/P obtida no ELISA. A seta indica o melhor limiar
339 de corte, onde $S/P = 0,53$. No gráfico, a área da sob a curva gerada é de 0,77.



340

341 **Figura 2.** Histograma dos valores obtidos da razão S/P. A linha pontilhada representa o ponto
 342 de corte ($S/P = 0,53$), à esquerda dessa linha estão as amostras consideradas negativas, e à
 343 direita, as positivas.



344

345 **Figura 3.** Número de propriedades em relação à porcentagem de animais infectados pelo
 346 BLV.