

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA - PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

ESTUDO SOBRE O POTENCIAL DA MOSCA DO ESTÁBULO,  
*Stomoxys calcitrans* L. COMO PORTADORA E VEICULADORA DO  
VÍRUS DA LEUCEMIA BOVINA (RETROVIRIDAE)

TÂNIA ROSÁRIA PEREIRA FREITAS

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR CARLOS HIPOLITO ROMERO MERCADO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Área de concentração em Parasitologia Veterinária.

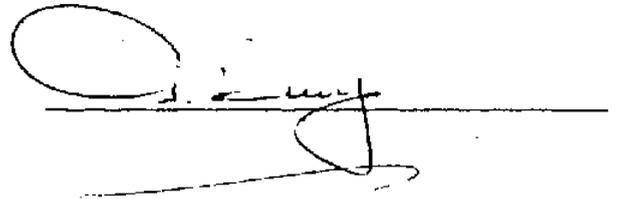
Itaguaí, Rio de Janeiro  
agosto, 1985

ESTUDO SOBRE O POTENCIAL DA MOSCA DO ESTÁBULO,  
*Stomoxys calcitrans* L. COMO PORTADORA E VEICULADORA DO  
VÍRUS DA LEUCEMIA BOVINA (RETROVIRIDAE)

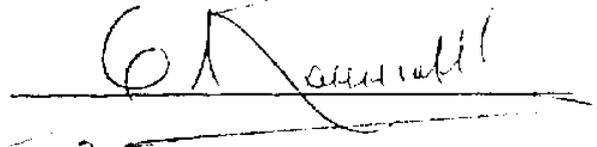
TÂNIA ROSÁRIA PEREIRA FREITAS

APROVADA EM: 23/09/1985

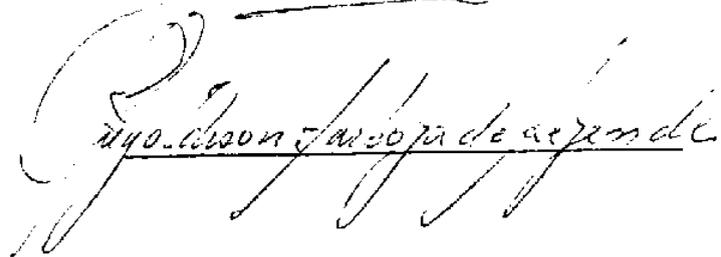
GONZALO EFRAIN MOYA BORJA



CARLOS HIPOLITO ROMERO MERCADO



HUGO EDISON BARBOZA DE REZENDE



À você

José Luiz.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos H. Romero, pesquisador do Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas, IICA, pela orientação, amizade e confiança depositada.

Ao Dr. Gonzalo Efrain Moya Borja, pesquisador da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela orientação fotografias e amizade durante a realização deste trabalho.

À Cheryl Ann Rowe, pesquisadora do Centro Nacional de pesquisa de Suínos e Aves, CNPSA, pelas micrografias eletrônicas, amizade e apoio durante este trabalho.

À Luiz Guidoni, Setor de Métodos Quantitativos do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, pela análise estatística computadorizada.

À Dra. Maria Evangelina Ferreira Fonseca do Departamento de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela orientação na confecção dos blocos.

À Lucia Helena S. Costa e Geraldo Baêta da Cruz pelo

excelente serviço técnico e amizade prestada no presente trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, na pessoa do Dr. Jerome Langenegger por colocar suas instalações, laboratórios e animais à nossa disposição para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Claudio de Moraes Andrade, Vice Diretor do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo carinho e atenção que nos acolheu e permitiu a realização de trabalho de reprodução fotográfica nos laboratórios de sua responsabilidade.

Ao Sr. Paulo Roberto de Andrade Rios, fotógrafo da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo zeloso trabalho de reprodução fotográfica.

À meus pais e irmãos pelo constante estímulo, amizade e confiança que me foi depositada durante toda a vida, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudo no início do Curso.

Aos Professores e colegas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves por colocar à nossa disposição os laboratórios de Virologia e Microscopia Eletrônica.

## ÍNDICE

	Págs.
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. <i>Stomoxys calcitrans</i> como veiculador de micro-organismos	4
2.2. Leucose ou Linfossarcoma bovino	7
2.3. Vírus da leucemia bovina (VLB)	9
2.4. Mecanismos de transmissão do VLB	10
2.5. Evidência sobre a transmissão do VLB por artrópodes	12
2.6. Distribuição Geográfica	13
2.6.1. Distribuição Geográfica de <i>S. calcitrans</i>	13
2.6.2. Distribuição Geográfica do VLB	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Local de trabalho	18
3.2. Animais de Experimentação	18

	Pág.
3.3, Instalações para os animais em experimentação	19
3.4. <i>Stomoxys calcitrans</i> L.	19
3.4.1. Amostras para Recuperação de Leucócitos	19
3.4.2. Amostras para início de colônias	19
3.4.3. Alimentação de <i>S. calcitrans</i> em colônias	20
3.4.4. Ovipostura de <i>S. calcitrans</i> em colônias experimentais	20
3.4.5. Gaiolas para manutenção de <i>S. calcitrans</i> adultos	22
3.4.6. Local para as instalações de colônias experimentais de <i>S. calcitrans</i>	22
3.5. Hematologia	23
3.5.1. Coleta de sangue de ovinos	23
3.5.2. Contagem total de leucócitos	23
3.5.3. Contagem relativa e absoluta de linfócitos	23
3.6. Soro de referência para o VLB	23
3.7. Antígenos de Referência para o VLB	24
3.8. Teste de imunodifusão	24
3.9. Culturas breves de leucócitos	25
3.10. Processamento de culturas breves de leucócitos para avaliação ultra-estrutural pela microscopia eletrônica	26

3.11. Análise Estatística	27
3.12. Projeto Experimental	29
3.11.1. Recuperação do vírus da leucemia bovina de leucócitos obtidos do intestino médio de <i>S. calcitrans</i>	30
3.11.2. Recuperação do vírus da leucemia bovina de leucócitos obtidos no aparelho bucal de <i>S. calcitrans</i>	31
3.11.3. Tentativa de transmissão mecânica do vírus da leucemia bovina por <i>S. calcitrans</i>	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÕES	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7. APÊNDICE	65

## ÍNDICE DE TABELAS

	Págs.
TABELA 1 Recuperação do vírus da leucemia bovina de leucócito no intestino médio de <i>S. calcitrans</i> L.	69
TABELA 2 Contagem linfocitária absoluta de cordeiros utilizados no experimento de transmissão do vírus da leucemia bovina com leucócitos recuperados do intestino médio de <i>S. calcitrans</i>	70
TABELA 3 Recuperação do vírus da leucemia bovina de leucócitos obtidos do aparelho bucal de <i>S. calcitrans</i> L.	71
TABELA 4 Contagem linfocitária absoluta de cordeiros utilizados no experimento de transmissão do vírus da leucemia bovina com leucócitos recuperados do aparelho bucal de <i>S. calcitrans</i> L.	72
TABELA 5. Tentativa de transmissão mecânica do VLB	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Págs.
FIGURA 1 Teste de imunodifusão em gel de ágar	74
FIGURA 2 Diagrama demonstrativo da técnica utilizada para recuperação de leucócitos do intestino médio de <i>Stomoxys calcitrans</i>	75
FIGURA 3 Diagrama demonstrativo da técnica utilizada para recuperação de leucócitos do aparelho bucal de <i>Stomoxys calcitrans</i>	76
FIGURA 4 Micrografia eletrônica de cultura de leucócitos (ovino 55) demonstrando partícula viral em vacúolo (aumento 123.000 x)	77
FIGURA 5 Micrografia eletrônica de cultura de leucócitos (ovino 55) demonstrando a presença de células mononucleares com características de linfócitos (aumento 90.000 x)	78

## BIOGRAFIA DA AUTORA

Tânia Rosária Pereira Freitas, filha de Francisco Lopes de Freitas e Maria Aparecida Pereira Freitas, nasceu na cidade do Rio de Janeiro, RJ em 13 de junho de 1957.

Em 1977 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde se diplomou em Biologia em 1981.

Foi selecionada para ingressar no curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária em 1982, área de concentração em Parasitologia, concluindo os créditos exigidos em 1983.

Bolsista do CNPq de março de 1982 a outubro de 1983, na categoria de mestrado, iniciou a atividade experimental para a tese. Em outubro de 1983, passou à bolsista de aperfeiçoamento profissional e complementação educacional da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, onde concluiu a atividade experimental que serviu de fundamento para esta tese.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a potencialidade da mosca do estábulo, *Stomoxys calcitrans* como portadora e veiculadora do vírus da leucemia bovina (VLB). No primeiro experimento, ovinos inoculados pela via sub-cutânea com  $5,6 \times 10^5$  a  $2,1 \times 10^6$  leucócitos viáveis recuperados do intestino médio de *S. calcitrans* apresentaram anticorpos para a glicoproteína maior Gp51 do VLB, no máximo três meses de experimentação. Apenas um ovino infectado desenvolveu anticorpos para o polipeptídeo interno p25, ao 18º mês de experimentação. Os dois ovinos utilizados como testemunhas, não inoculados, e mantidos em contato com os ovinos infectados, não desenvolveram anticorpos durante o período experimental de 36 meses indicando a ausência de transmissão horizontal do VLB entre os ovinos. Não foi observado o desenvolvimento de linfocitose persistente durante o período de observação de 20 meses. Poucas partículas virais do tipo C forma observadas em culturas de leucócitos de um ovino infectado quando observadas pela microscopia eletrônica. No segundo experimento, três dos cinco ovinos inoculados com  $2,3 \times 10^4$  a  $8,8 \times 10^5$  leucócitos viáveis recuperados do

aparelho bucal de *S. calcitrans* se infectaram com o VLB em um máximo de quatro meses após a inoculação e desenvolverem anticorpos para GP51 que persistiu durante o período experimental de 24 meses. Os dois ovinos não inoculados e mantidos em contato com os ovinos infectados, não desenvolveram anticorpos para o VLB. Linfocitose persistente não foi observada em nenhum dos ovinos infectados desse experimento, nem foram observadas partículas virais do tipo C nas culturas de leucócitos dos mesmos ovinos. No terceiro experimento, entre 90 a 174 moscas criadas em laboratório foram utilizadas para tentar veicular mecanicamente o VLB de um bovino positivo para cinco ovinos sorologicamente negativos. Em períodos de três a dez meses, os ovinos foram expostos à picadas de *S. calcitrans* em um mínimo de 135 a um máximo de 555 vezes. Entretanto, nenhum dos ovinos desenvolveu anticorpos para antígenos do VLB durante o período de observação de 30 meses (3 ovinos) e 36 meses (2 ovinos).

Concluiu-se que *S. calcitrans* é um portador da infectividade do VLB nos leucócitos contidos no intestino médio e no aparelho bucal por períodos de tempo não determinados. Porém o seu papel como veiculador mecânico do VLB, ainda não foi elucidado.

## SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate the potencial of stable fly, *Stomoxys calcitrans*, as carrier and mechanical vector of bovine leukemia virus (BLV). In the first experiment, sheep inoculated subcutaneously with  $5,6 \times 10^5$  to  $2,1 \times 10^6$  viable leukocytes recovered from the midgut of *S. calcitrans*, developed antibody to the major glycoprotein gp51 of VLB within three months. Only one of sheep that became infected also developed antibody to the structural polypeptide p25, first detected 18 months after experimental inoculation. Two uninoculated sheep that were maintained in close contact with the infected sheep did not develop antibody to either of the VLB antigens, during the experimental period of 36 months, indicating a lack of horizontal transmission of BLV among the sheep. Persistent lymphocytosis was not observed in any of sheep during 20 month observation period. Only a few type-C viral particles were observed in the leukocyte culture from the peripheral blood of one infected sheep as evaluated by eletron microscopy. In a second experiment, three of the five sheep inoculated with  $2,3 \times 10^4$  to  $8,8 \times 10^5$  viable leukocytes recovered from the mouthparts of *S. calcitrans*,

became infected with BLV within four months. After experimental inoculation and developed antibody to gp51 that persisted for the 24 months duration of the experiment. Two uninoculated sheep reared together with the infected sheep did not develop antibody to BLV antigens. Persistent lymphocytosis was not observed in any of the infected sheep nor were type-C viral particles observed in leukocyte culture from the same sheep. In a third experiment, from 90 to 174 stable flies from a colony reared in laboratory were used in an attempt to demonstrate mechanical transmission of BLV from an antibody-positive cow to five BLV-serologically-negative sheep. During challenging periods varying three to ten months, the sheep were bitten a minimum of 135 and a maximum of 155 times. None of the sheep developed antibody to BLV antigens during BLV periods of 30 months (3 sheep) and 36 months (3 sheep).

It is concluded that *S. calcitrans* carries BLV infectivity in leukocytes contained in the midgut and mouthparts for indetermined period of time, however, its role as a mechanical vector of BLV has not yet been elucidated.

## INTRODUÇÃO

*Stomoxys calcitrans* (Linnaeus) tem sido responsabilizada pela disseminação de agentes patogênicos do homem e dos animais domésticos, tanto como hospedeiro intermediário ou transmissor mecânico ou biológico, devido a seus hábitos alimentares e sua ampla distribuição geográfica (BRUES 1913). De acordo com o tipo de parasitismo desenvolvido pelo agente patogênico, esse mecanismo de disseminação pode tornar-se difícil de ser demonstrado experimentalmente (BUTTLER ET AL.1977), mesmo assim, *S. calcitrans* é citada como veiculadora de protozoários, fungos, bactérias riquetsias e vírus (BERBERIAN 1938; HAWKINS ET AL. 1973; PHILPOOT & EZEH 1978; FOIL ET AL. 1983).

O agente causal da leucose bovina, o vírus da leucose bovina, é um retrovírus do tipo C que tem como células alvo os linfócitos (MUSCOPLAT ET AL. 1974; FERRER 1980). O hospedeiro natural do VLB é o bovino porém os caprinos, suínos e ovinos podem ser infectados experimentalmente, sendo que, nos ovinos pode haver desenvolvimento tumoral (OLSON ET AL. 1972; FERRER 1980).

O VLB pode dar origem a uma neoplasia do tecido linfóide, o linfossarcoma bovino, e sua presença pode ser evidenciada a partir do cultivo de linfócitos do sangue periférico após estímulo com substâncias mitogênicas (MILLER ET AL.1969). É sabido no entanto que o VLB se encontra nas células alvo na forma não infecciosa de DNA pró-viral integrado ao genoma celular e que não existe viremia verdadeira (FERRER 1979; ROMERO & ROWE, 1982). Devido a esse fato, a transmissão do VLB deve ocorrer através da contaminação com células infectadas.

A transmissão vertical ou intrauterina do VLB ocorre entre 10 a 20% (PIPER ET AL. 1979) sendo portanto, a transmissão horizontal, a de maior importância entre bovinos adultos, responsáveis por taxas de até 90%. Pesquisas dirigidas à avaliar as vias de excreção e mecanismos de transmissão horizontal não demonstraram, ainda, o poder infeccioso da urina, secreções nasais e sêmen (MILLER & VAN DER MAATEN 1979; RESSANG ET AL.1982; KAJA & OLSON 1982).

Insetos hematófagos são suspeitos veiculadores do VLB, havendo-se demonstrado que a infecção com o VLB aumenta consideravelmente nas épocas de verão, época em que a ocorrência de insetos também está aumentada (BECK-NIELSEN ET AL. 1978).

No Brasil a leucose está bastante disseminada entre rebanhos bovinos (RANGEL & MACHADO 1943); SANTOS ET AL. 1959; MERKT ET AL. 1959; FREIRE & FREITAS 1966; CAVALCANTI ET AL. 1969; ALENCAR FILHO ET AL. 1979; ROMERO ET AL. 1981; KANTEK-NAVARRO ET AL. 1982, KANTEK ET AL. 1983) e *S. calcitrans*, um inseto de distribuição cosmopolita (BRUES ET AL. 1913; RAS-

MUSSEN & CAMPBELL 1979) pode encontrar no país condições ideais para o seu desenvolvimento (BRUES, 1913; CHARWOOD & LOPES 1980).

O objetivo da presente pesquisa foi de avaliar o potencial de *S. calcitrans* como portador e veiculador do VLB.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- *Stomoxys calcitrans* como veiculador de microorganismos

BOUCHÉ (1834) foi o primeiro pesquisador a avaliar a importância de *S. calcitrans* na epidemiologia de agentes patogênicos para o homem e os animais domésticos. Contudo, o mecanismo de transmissão de diferentes microorganismos continuava uma incógnita e a medida que ocorria uma epidemia na qual o processo de transmissão permanecesse velado, sempre pairava a suspeita de ser transmitido por um inseto e em especial por *S. calcitrans*, por ser este, um inseto hematófago que se alimenta viciosamente em diferentes espécies de animais (GRAZELLA & PICKENS 1979).

Os hábitos e o habitat de *S. calcitrans* contribuíram para que se suspeitasse de sua atuação como agente transmissor do vírus da Poliomielite (BRUES 1913; SAWYER & HERMS 1913; CAMPBELL ET AL. 1918) que mais tarde, segundo DICK (1925) após revisão dos trabalhos até então publicados, concluiu que faltavam evidências mais concretas para afirmar essa transmissão. Por outro lado, SCOTT (1915) demonstra o potencial de *S. calcitrans* como veiculador do vírus da anemia infecciosa equina. Em 1917, HOWARD relacionando a ocorrência sazonal de *S. calcitrans*

conclui que realmente essa mosca poderia ser um vetor do vírus da anemia infecciosa equina.

Após várias décadas, HAWKINS ET AL. (1973) e KEMEM ET AL. (1978) não confirmaram esses resultados utilizando ponies com a doença crônica como doadores do vírus. Posteriormente, FOIL ET AL.(1983), utilizando equinos no estado agudo da doença, demonstraram definitivamente a transmissão mecânica desse vírus por *S. calcitrans*.

COPLAND (1974) considerou a possibilidade de *S. Calcitrans* ser veiculador dos vírus causadores da varíola entre suínos na Nova Guiné, após estudar um surto causado por vírus Pox e Vaccinia. Suspeita-se que *S. calcitrans* possa também ser veiculador de outros vírus com mecanismos de transmissão desconhecidos, como o vírus da estomatite vesicular dos bovinos (FERRIS ET AL. 1955).

Com relação ao possível papel na transmissão de protozoários, MARTIN ET AL. (1908) trabalhando com *Trypanosoma brucei*, obteve resposta positiva para a transmissão deste hematozoário de um cobaio infectado experimentalmente para um gato, através de *S. calcitrans*, contudo, não conseguiu confirmar esses resultados. MITZMAIN (1912) tentou experimentalmente transmitir o *Trypanosoma evansi* entre cobaios, sem sucesso, porém não excluindo a possibilidade deste inseto veiculá-lo naturalmente. MARSHALL & HERBERT (1979) não obtiveram sucesso ao tentar infectar *S. calcitrans* com *Trypanosoma theileri*. Por outro lado, BERBERIAN (1938) transmitiu *Leishmania tropica* entre voluntários, na Nigéria, utilizando esse inseto como vetor, obten-

do corpúsculos de Leishman nas lesões formadas nos voluntários.

Outro agente patogênico que se acreditou pudesse ser veiculado mecanicamente por *S. calcitrans* foi o *Dermatophilus congolensis*, causador da estreptotricose cutânea dos bovinos, equinos, caprinos e da espécie humana. Apesar de RICHARD & PIER (1966) demonstrarem a transmissão desse fungo após 24 horas da exposição a *S. calcitrans*, PHILPOTT & EZEH (1978) citaram que somente obtiveram êxito na transmissão de *D. congolensis* em bovinos em uma ocasião.

A transmissão experimental de microorganismos patogênicos utilizando insetos hematófagos envolve condições ambientais e biológicas que consigam reproduzir o mais próximo as condições naturais, implicando no conhecimento detalhado dos hábitos do hospedeiro, do vetor e do doador do agente patogênico, assim como do próprio agente patogênico. Por esta razão, somente nos últimos dez anos, muitos microorganismos endoparasitas puderam ser transmitidos sob condições laboratoriais, com mais segurança de se repetir as condições naturais. Assim, FOIL ET AL. (1983) demonstraram a transmissão mecânica do vírus da anemia infecciosa equina enquanto que POTGIETER ET AL. (1981) demonstraram a transmissão do *Anaplasma marginale* por *S. calcitrans*, na África do Sul.

A utilização de técnicas que permitiram a marcação do sangue com fósforo radioativo, demonstraram que *S. calcitrans* ao reiniciar uma alimentação é verdadeiramente capaz de regurgitar parte do sangue ingerido (BUTTLER ET AL 1977). BECH-NIELSEN ET AL. (1978) e BUXTON ET AL. (1982) citam que o VLB pode ser

mantido no organismo de inseto como Tabanídeos e alguns Culi-  
cídeos em condições viáveis para a infecção. Baseado nesses acha-  
dos, surgiu a suspeita de que *S. calcitrans* poderia ser um ve-  
tor mecânico do VLB (BUXTON ET AL. 1982) porém sem nenhuma com-  
provação definitiva até a presente data.

## 2.2- Leucose ou Linfossarcoma Bovina

A leucose ou linfossarcoma bovina é uma neoplasia do tecido linfoide e que foi aparentemente descrita pela primeira vez por SIEDAMGROTZK (1878) na Alemanha, segundo revisão de BENDIXEN (1965). As pesquisas sobre a leucose bovina foram poucas renovando-se o interesse por seu estudo somente algumas décadas mais tarde, quando OSTERTAG (1913), HUTYRA & MAREK (1913) e FROHNER & ZWICK (1915) demonstraram que essa doença já era conhecida no território alemão. As pesquisas foram intensificadas pela ocorrência de tumores detectáveis durante a inspeção de carne nas décadas de 1920 e 1930, no norte da Alemanha (BENDIXEN 1965) e Dinamarca (BENDIXEN 1973). No entanto, em outros países não se dispunham dessas informações, limitando-se estas a ocorrência de tumores em bovinos, em alguns estados dos Estados Unidos da América (FELDMAN 1929; SCHLOTTHAUER 1928).

A suspeita que a leucose bovina poderia ser uma doença transmissível foi levantada por SCHOTLER & SCHOTLER (1934) que iniciaram experimentos envolvendo soroterapia. Porém, coube a GOTZE ET AL (1956) baseado nas observações de alta incidência da doença na região oeste da Alemanha, após a 2a. guerra mundial, con-

cluír que essa doença tinha sido possivelmente transmitida através da introdução de bovinos da região leste, onde a doença era comum, para a região oeste onde a incidência da leucose era insignificante. Assim sendo, a introdução de bovinos em áreas com programas de erradicação em andamento, oriundos de países onde a leucose bovina não tinha sido avaliada, permitiu que se suspeitasse da transmissão da doença entre os bovinos (BENDIXEN 1965).

Clinicamente, a leucose ou linfossarcoma bovina tem sido classificado em duas formas, a saber, a forma enzoótica ou adulta e a forma esporádica (FERRER 1980).

A leucose enzoótica bovina (LEB) se caracteriza pela ocorrência em regiões geográfica e em rebanhos agregados e é causada por um Retrovírus conhecido como vírus da leucemia bovina (VLB). É de ampla distribuição, sendo comum na Europa Ocidental, Estados Unidos, Venezuela, Brasil e União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (FERRER 1980). A forma enzoótica acomete bovinos com mais de três anos de idade e está caracterizada pela proliferação de linfócitos com características neoplásticas que eventualmente causam a formação de massas de tumores sólidos localizados em qualquer tecido ou órgão mole. Uma vez que os animais desenvolvem a doença clínica, a morte do animal é inevitável, acentuando-se algumas semanas após o início dos sintomas (FERRER 1980).

Em conseqüência da infecção com o VLB, uma proporção de bovinos desenvolvem linfocitose persistente mesmo quando não se demonstram linfócitos com características neoplásticas (FERRER 1974). Esta linfocitose persistente é considerada, por

alguns autores, como a forma sub-clínica da LEB ou fase pré-tumoral (BENDIXEN 1965), enquanto que outros a consideram como uma resposta linfoproliferativa benigna (FERRER ET AL 1974; FERRER 1982).

A forma esporádica do linfossarcoma geralmente ocorre em bovinos antes dos três anos de idade e não parece estar associado a agente infeccioso como no caso da LEB. Clinicamente a forma esporádica possui três variações ou formas. A forma juvenil que acomete bezerros com até seis meses de idade, envolvendo, provavelmente, linfonodos e medula óssea. A forma tímica que ocorre em bezerros com menos de dois anos de idade e tem origem no timo. A forma cutânea que afeta bovinos de um a três anos de idade e que está caracterizada pela infiltração de nódulos neoplásicos a nível da derme.

### 2.3- Vírus da leucemia Bovina

A ocorrência enzoótica da leucose bovina levou a GOTZE ET AL. (1956) a suspeitar de uma etiologia viral para a doença. Experimentalmente com inoculação de sangue total para pré-imunização de animais contra babesiose e anaplasiose e a demonstração da etiologia viral para leucemia felina, aviária e de camundongo, estimularam a hipótese que a leucose bovina fosse também causada por vírus.

Nos primeiros estudos, utilizando-se o microscópio eletrônico, DUTCHER ET AL. (1964) observaram estruturas similares a partículas do tipo C no leite de vacas de rebanhos com histórico da LEB. Posteriormente, coube a MILLER ET AL. (1969)

após preparação de cortes ultra-finos de cultura de leucócitos de bovinos com sarcoma e linfocitose persistente e observação em microscópio eletrônico demonstrar a presença de partículas virais do tipo C. Esses resultados foram confirmados por DUTTA ET AL. (1970) e por STOCK & FERRER (1972) que forneceram evidências da etiologia viral da LEB. Além disso, estudos imunológicos mostraram também a associação dessas partículas virais com o linfossarcoma bovino e a linfocitose persistente (FERRER 1972; FERRER ET AL. 1972; 1973; 1974). Estudos de transmissão demonstraram concomitantemente, a etiologia vital da LEB e o poder oncogênico, desse vírus, o qual é hoje universalmente conhecido como o vírus da leucemia bovina.

#### 2.4- Mecanismos de Transmissão do VLB

O vírus da leucemia bovina pode ser transmitido verticalmente, de vaca prenha ao feto, através da placenta, não parecendo existir transmissão embrionária (FERRER ET AL 1976). Aproximadamente, cerca de 18% de bezerros nascidos de vacas Holstein infectadas com o VLB continha anticorpos para a glicoproteína maior do VLB, antes da ingestão do colostro (FERRER ET AL. 1976; PIPER ET AL. 1979). Por outro lado, ROMERO ET AL. (1983a) trabalhando com bovino mestiço, encontraram apenas 8,7% de transmissão vertical. A maioria dos animais se infectaram horizontalmente, após o nascimento, assinalando PIPER ET AL. (1979) que cerca de 93% de bezerros podem estar infectados quando atingirem dois anos de idade após serem introduzidos no rebanho de bovinos adultos infectados.

ROMERO ET AL. (1982) demonstraram a infecciosidade do leite de vacas infectadas após inoculação via intra-peritoneal em bezerros. Contudo, somente em 1983a, b, os mesmos autores demonstraram definitivamente que a ingestão de leite oriundo de vacas infectadas, por bezerros sem anticorpos para o VLB, resulta na infecção desses últimos, ressaltando ainda que os bezerros que tinham recebido anticorpos maternos, talvez não detectados pela prova de imunodifusão eram mais resistentes a serem infectados com o VLB que os bezerros de mães sem anticorpos para este vírus.

Os mecanismos de transmissão horizontal não foram ainda definidos, conhecendo-se porém que não existe transmissão através da urina, das secreções nasais ou através do sêmen (MILLER & VAN DER MAATEN 1979; KAJA & OLSON 1982) como também através dos transplante de embriões (EAGLESOME ET AL. 1982). Porém, GUPTA & FERRER (1980) demonstraram que o polipeptídeo interno viral, p25, mas, que não é vírus, é eliminado na urina de bovinos infectados com o VLB. Dessa maneira a transmissão do VLB entre os bovinos adultos pode ocorrer iatrogenicamente pelo uso de agulhas e seringas contaminadas, no momento de descórnia com instrumentos contaminados, através da pré-imunização contra hemoparasitos com inóculo de sangue total obtidos de bovinos infectados (FERRER 1980; ROMERO ET AL. 1982) e possivelmente por artrópodos hematófagos que atuam como vetores mecânicos (BECK-NIELSEN ET AL. 1978; FERRER 1980; BUXTON ET AL. 1982; ROMERO ET AL. 1984).

## 2.5- Evidência sobre a Transmissão do VLB por Artropodes

As primeiras indicações de que o VLB poderia ser transmitido por artrópodes foram obtidas por BECH-NIELSEN ET AL (1978) que demonstraram uma maior eficiência na transmissão do vírus durante os meses de verão. Os autores relacionaram estes achados a uma maior prevalência de insetos hematófagos nesse período. Essa hipótese foi fortalecida após a recuperação de linfócitos infectados com o VLB de Tabanídeos que haviam se alimentado em vaca infectada. A recuperação da infectividade do VLB desses linfócitos foi obtida através do ensaio de infectividade sincicial. Desde então, experimentos tem sido realizados com o objetivo de demonstrar a participação de insetos na transmissão mecânica do VLB. Assim OSHIMA ET AL. (1981) utilizando uma mistura de Tabanídeos *T. nipponicus*; *T. trigeminus*; *T. chrysurus* e *Chrysops wanderwalpi* tiveram sucesso aparente na transmissão mecânica do VLB de uma vaca infectada a quatro cordeiros. Porém, os títulos de anticorpos desenvolvidos pelos cordeiros supostamente infectados foram bastante elevados, indicando a necessidade de confirmação desse trabalho. Mais recentemente BUXTON ET AL. (1982) inocularam cordeiros com macerados de aparelhos bucais de cabeças de mosquitos anofelinos (*A. freeborni*; *A. albimanus*; *A. quadrimaculatus*; *A. stephensi*) que tinham sido alimentados com sangue obtido de bovino infectado com o VLB. Os cordeiros desenvolveram anticorpos para o VLB demonstráveis através das provas de imunodifusão e radioimunensaio. Finalmente ROMERO ET AL. (1984) demonstraram que leu-

cócitos obtidos do intestino médio de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* em bovinos infectados com o VLB, mantinham a viabilidade e transmitiam e o VLB após a inoculação em cordeiros.

Todos achados descritos sugerem que artrópodes hematófagos podem ser veiculadores mecânicos do VLB, porém a evidência definitiva, inequívoca, do real papel desses artrópodos não foi ainda fornecida.

No caso específico do *S. calcitrans*, esta tem sido incriminada na transmissão mecânica de outros Retrovírus, como o da anemia infecciosa equina (FOIL ET AL.1983), o vírus da leucemia murina de Friend (FISHER ET AL.1973) e como provável transmissor do vírus da leucemia felina (HARDY ET AL.1973), sugerindo a possibilidade desse inseto ser um possível transmissor mecânico do VLB.

## 2.6- Distribuição Geográfica

O conhecimento da distribuição geográfica do agente causal e do seu provável veiculador é importante para a demonstração do mecanismo de transmissão, pois somente com a presença de ambos e ao mesmo tempo, a transmissão poderá ocorrer.

### 2.6.1- Distribuição Geográfica de *Stomoxys calcitrans*

*S. calcitrans* é um inseto cosmopolita que teve sua origem provavelmente na África (MUIR 1914). Inicialmente se pensou

que era originária da Europa Central (BRUES 1913), porém evidências fornecidas por MUIR (1914) levam a crer que a origem foi realmente na África. Na América, essa mosca é citada desde 1776, na Pensilvânia e depois demonstrada em todos os estados americanos (BRUES 1913). Atualmente, é encontrada desde o Canadá até a Argentina assim como na Europa, especialmente na Europa Central. Na África é encontrada em todos os países, nas Ilhas Canárias, Madeira e Mauritius. No Oriente Médio, já foi identificada na Palestina, no Líbano, enquanto que na Oceania foi encontrada na Austrália, Tasmânia, Nova Zelândia, nas ilhas Java, Filipinas, como também é citada no Havaí, na Índia e em certas regiões da União Soviética (MUIR 1914).

*S. calcitrans* ocorre preferencialmente em climas tropicais, sub-tropicais e temperados, não sendo encontrada em regiões geladas. Contudo, em condições adversas de temperaturas, a mosca pode hibernar por até três meses (BRUES 1913).

A localização geográfica do Brasil entre os trópicos do Equador e Capricórnio faz com que o país tenha um clima eminentemente tropical com regiões de clima subtropical e temperado, o que favorece a ocorrência de *S. calcitrans*. Segundo JONES (1966) esse inseto experimentalmente, sobrevive a variações de temperatura tendo porém seu período, para completar o ciclo vital, também variando conforme as condições oferecidas. Em tem-

peraturas mais baixas (15.5°C) o período de desenvolvimento de ovo a ovo é mais longo (46 dias) do que o desenvolvimento a temperatura em torno de 26°C, onde o ciclo se faz em 21 dias, mantendo-se em ambos os casos, a umidade relativa do ar em torno de 55-60% e período de luz de 16-24 horas/dia.

Essa situação experimental, no entanto, se aproxima as condições de temperatura e umidade de um país tropical como o Brasil. CHARLWOOD & LOPES (1980) demonstraram variações no ciclo reprodutivo de *S. calcitrans* em regiões equatoriais, citando que, num período, de luminosidade dia/luz de 12 horas, as variações que ocorriam com relação ao comportamento desses insetos estavam relacionadas a necessidade alimentar de acordo com a fase biológica em que se encontravam. Machos e fêmeas jovens, ainda não fertilizadas, mantinham o mesmo horário de busca de alimento, no início da manhã e no fim da tarde: enquanto que, em fêmeas jovens já fertilizadas, essa atividade era constante durante todo o dia. No caso de fêmeas em ovipostura o ciclo era acentuado no fim da manhã e no início da tarde. Esses achados, segundo os autores demonstraram que *S. calcitrans* apresenta uma adaptação às condições climáticas do país que favorece ao seu desenvolvimento.

#### 2.6.2- Distribuição Geográfica do VLB

O vírus da leucemia bovina é encontrado bastante disseminado pelo mundo, no entanto, é difícil obter estatísticas

sobre essa distribuição pelo fato que muitas vezes depende de encontro de tumores em animais somente observado nos abatedouros e não registrado. Como também pela falta de exames sorológicos para diagnose da infecção em desenvolvimento. FERRER (1980) verificou que mais de 60% dos animais de 250 rebanhos de bovinos nos Estados Unidos, eram positivos para leucemia bovina, pela presença de tumores leucóticos.

A ocorrência enzoótica da leucose bovina faz com que seja citada em áreas específicas de vários países, contudo não impede a ampliação dessas áreas de ocorrência como é citada, sul da Suécia, leste da Prússia, na URSS. Na Inglaterra e Irlanda não é frequente, no Canadá foi recentemente citada e no Japão a infecção parece endêmica (ONUMA ET AL.1975; FERRER 1980).

Na América Latina, a leucemia bovina é freqüente, MARIN ET AL. (1978) encontraram que 37% de 1600 soros de 150 rebanhos em 20 estados venezuelanos eram positivos para leucose bovina. Na Argentina foi demonstrado pelas provas de imunodifusão e radio-imunensaio a presença de leucose nos estados de Santa Fé, Buenos Aires e Córdoba (FERRER 1982). Também no Uruguai foram encontradas altas prevalências do VLB nas zonas de gado leiteiro FERRER (1982). KANTEX-NAVARRO (1982) diagnosticou bezerras positivas para o VLB, recém importadas do Uruguai pelo Brasil.

No Brasil, a primeira citação de um animal com liofosarcoma que poderia ter sido causado pelo VLB, foi de RANGEL & MACHADO (1943) em Minas Gerais. Posteriormente, MERKT ET AL.(1959) registraram a ocorrência da LEB no Rio Grande do Sul e no mes-

mo ano, SANTOS ET AL. demonstraram a ocorrência da doença em Nova Friburgo, RJ em uma vaca importada da Suécia. Mais tarde DACORSO ET AL. (1962/3) citam a leucose clínica em quatro bovinos examinados por eles, no Rio de Janeiro MACHADO ET AL. (1963) descrevem a ocorrência de 12 casos de leucemia linfóide e de 17 casos de linfossarcoma de animais de várias regiões do País. A partir daí, a leucose bovina foi confirmada no Rio Grande do Sul (VASKE ET AL. 1965); Rio de Janeiro (FREIRE E FREITAS 1966); em Pernambuco (CAVALCANTE ET AL. 1969); em São Paulo (ALENCAR FILHO 1970; ALENCAR FILHO ET AL. 1975 1979) e em Minas Gerais (MUCHALUAT 1971 e no Paraná (KANTEK-NAVARRO ET AL. 1982; KANTEK ET AL. 1983). ROMERO ET AL. (1981) e ROMERO & ROWE (1982) baseados nos levantamentos feitos no Brasil acreditam que realmente o VLB pode ser prevalente na maioria dos estados brasileiros, e como já vem sendo demonstrado, a presença desse vírus já deve ocorrer em todo país.

A ocorrência do VLB foi demonstrada em outras espécies mais comum em capivaras e bubalinos na Venezuela (MARIN ET AL. 1978; MARIN ET AL. 1982) e isso contribui para ampliar a distribuição desse vírus, principalmente nas regiões tropicais e sub-tropicais onde a prevalência viral parece ser mais alta e que segundo FERRER (1980) deve ser devido a grande incidência de insetos hematófagos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Local de Trabalho

O presente trabalho foi realizado nas instalações da Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, EMBRAPA-RJ, situada no Km 47 da Antiga Rodovia Rio-São Paulo, Seropédica, RJ.

#### 3.2- Animais de Experimentação

##### Bovinos:

Para os experimentos de recuperação de leucócitos do intestino médio e do aparelho bucal de *S. calcitrans* foi utilizada uma vaca holandesa preta e branca de quatro anos de idade, sorologicamente positiva para o VLB.

Para alimentação de *S. calcitrans* criadas em cativeiros, foram utilizados dois bezerros mestiços, de aproximadamente dois anos de idade, sorologicamente negativos para o VLB.

##### Ovinos:

Foram utilizados um total de 21 cordeiros mestiços como receptores de leucócitos recuperados de *S. calcitrans* e no

experimento de transmissão mecânica do VLB.

### 3.3- Instalações para Animais em experimentação

A vaca infectada com o VLB foi mantida em condição de criação semi-extensiva.

Os bezerros doadores de sangue para a alimentação de *S. calcitrans* em cativeiro, foram mantidos em baiás em condição de isolamento, em áreas livres de artrópodos. Os ovinos foram também mantidos em baiás similares, em condições de isolamento, em áreas livres de artrópodes, em grupo de no máximo, quatro animais por baía.

### 3.4- *Stomoxys calcitrans*

#### 3.4.1- Amostras para recuperação de leucócitos

Para a recuperação da infectividade do VBL de leucócitos de bovino ingeridos por *S. calcitrans*, foram coletadas com auxílio de um puçá de malha de nylon, moscas que estavam se alimentando em uma vaca positiva para o VLB. Essas moscas, foram imediatamente levadas ao laboratório e processadas para a obtenção de leucócitos do intestino médio e do aparelho bucal.

#### 3.4.2- Amostras para o início de colônias

A fim de se obter *S. calcitrans* para dar início à colônias no laboratório, foram coletadas moscas que estavam se alimentando em bovinos. As moscas coletadas no campo foram levadas ao laboratório, identificando-se *S. calcitrans* pela coloração

e aparelho bucal. Imediatamente, as moscas *S. calcitrans* foram transferidas para gaiolas, onde foram mantidas para alimentação e ovipostura, sendo mantidos em cada gaiola cerca de 20 moscas adultas.

#### 3.4.4- Alimentação de *S. calcitrans* em colônias experimentais

As moscas identificadas como *S. calcitrans* foram alimentadas com sangue obtido dos dois bezerros sorologicamente negativos para o VLB. Este sangue era coletado por punção da veia jugular dos bezerros, em recipientes estéreis, que continham heparina para a concentração final de 20 UI por ml de sangue. No período de implantação das colônias, 100 ml eram colhidos semanalmente, enquanto que, posteriormente, para a manutenção das colônias era necessário obter 250 ml de sangue por semana. O sangue colhido era mantido a 8°C e as moscas eram alimentadas diariamente através de uma almofada de gaze embebida de sangue, a qual era colocada em placa de Petri, dentro da gaiola. Este método de alimentação era repetido a cada 24 horas.

#### 3.4.4- Ovipostura de *S. calcitrans* em colônias experimentais

Após período de seis dias, foram colocadas em cada gaiola um a dois frascos de 100 ml de capacidade, com abertura de quatro centímetros de diâmetros, contendo o meio de ovipostura constituído por cana-de-açúcar descascada e moída misturada em igual proporção com ração para ave de postura. Os ingredientes eram umedecidos até a formação de uma mistura relativamente ho-

mogênea, evitando-se o excesso de água.

Os recipientes contendo o meio de ovipostura eram observados diariamente para a verificação da presença de ovos ou mesmo de larvas de primeiro estágio, como também a manutenção da umidade.

Os meios que continham ovos e/ou larvas eram transferidos para recipiente maiores de 30 cm de comprimento, 20 cm de largura e 20 cm de altura, contendo o mesmo meio de ovipostura citado, atingindo porém a meia altura do recipiente. Na troca dos recipientes teve-se o cuidado de não se manipular as larvas, para se evitar qualquer dano às mesmas. Evitava-se também a superpopulação de larvas. Os recipientes eram cobertos com um pano preto fixado com barbante e, transferidos um armário de vidro o qual servia como uma estufa incubadora para o desenvolvimento larval. Nesse armário-estufa a temperatura variava de 21 a 28°C nos dias quentes, porém atingindo até 15°C nos dias mais frios. Para evitar a destruição dos ovos de *S. calcitrans* por formigas, as superfícies das prateleiras do armário foram cobertas inteiramente com talco. A umidade do ar era fornecida colocando-se alguns frascos de água dentro do armário de vidro.

As colônias experimentais eram observadas diariamente para avaliação do desenvolvimento larval, presença de parasitas, mortalidade dos adultos e retirada dos mortos. As larvas foram mantidas durante todo o desenvolvimento nos recipientes, até a formação de pupas, as quais eram retiradas, contadas e transferidas pa-

ra frascos com papel filtro depositado no fundo. A eclosão dos adultos era também realizada no armário de vidro, procedendo-se imediatamente à transferência à gaiolas limpas para o desenvolvimento de uma nova geração.

#### 3.4.5- Gaiolas para manutenção dos *S. calcitrans* adultos

As gaiolas foram confeccionadas em madeira e em tela de nylon. A base, a armação e uma parede lateral eram construídas de madeira. Outra parede lateral era de vidro transparente e as demais paredes laterais de tela. As paredes de umas gaiolas tinham 30 cm de lado enquanto que outras tinham 60 cm de lado, conservando cada caso o formato de cubo.

A entrada das gaiolas estava localizada na parede lateral de madeira e tinha cerca de 15 cm de diâmetro. A entrada era protegida por uma borracha de câmara de pneumático em torno da abertura que permitia o vedamento da gaiola com um frasco, impossibilitando a fuga dos insetos como também facilitando o manuseio das colônias.

#### 3.4.6- Local para a instalação das colônias experimentais de *S. calcitrans*

O local escolhido foi uma pequena sala do andar térreo, com meia parede superior de vidro, com claridade natural. As gaiolas eram iluminadas com lâmpadas fluorescentes brancas mantidas acesas durante 24 horas por dia.

### 3.5- Hematologia

#### 3.5.1- Coleta de sangue de ovinos

O sangue foi coletado por punção da veia jugular com agulha e seringa e transferido, imediatamente, para frascos de 6 ml, contendo 0,2 ml de EDTA a 10%, como anticoagulante.

#### 3.5.2- Contagem total dos leucócitos

Todas as amostras de sangue eram diluídas 1:10 em solução de Thoma em micropipetas especiais para leucometria e após serem desprezadas as três primeiras gotas, preenchia-se a câmara de Neubauer modificada para contagem global dos leucócitos. Contaram-se os leucócitos presentes nos quatro milímetros angulares, multiplicando-se o número obtido pelo fator 50 para se obter o número de leucócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue.

#### 3.5.3- Contagem relativa e absoluta de linfócitos

Esfregaços foram realizados com o sangue tratado com EDTA, em lâmina de vidro, segundo a técnica de SCHALM (1965), corando-se pela técnica de MAY-GRUNWALDO-GIEMSA. Foram contados 100 leucócitos, obtendo-se o percentual relativo para cada tipo. O número absoluto de linfócitos foi obtido segundo MATOS & MATOS (1981) através do cálculo do percentual de linfócitos da contagem global dos leucócitos. Com esses dados pode-se determinar a ocorrência ou não de linfocitose persistente, baseado em FERREIRA ET AL. (1982b).

### 3-6- Soro de Referência para o VLB

O soro de referência positivo para o VLB, correspondia

a um soro de ovino que tinha sido experimentalmente infectado com leucócitos obtidos de *Boophilus microplus* ingurgitados em bovinos naturalmente infectados com o VLB (ROMERO ET AL. 1984). Este soro reagia formando duas linhas de precipitação quando confrontado com o antígeno de referência.

### 3.7- Antígenos de Referência do VLB

Os antígenos do VLB foram obtidos a partir dos sobrenadantes de uma linhagem celular contínua derivada de um feto de ovino persistentemente infectada com o VLB. Os sobrenadantes concentrados em tubos de diálise submersos em Polietileno glicol PM 6000. Uma vez dializados os sobrenadantes, a fração sólida dentro dos tubos de diálise eram ressuspensos em água destilada para atingir uma concentração final de 80 vezes o volume original do sobrenadante. Esta preparação continha tanto a glicoproteína maior do envelope viral gp51 como o polipeptídeo estrutural p25.

### 3.8- Teste de Imunodifusão

O teste de imunodifusão em gel de agar foi similar ao descrito por FERREIRA ET AL. (1982a) com agar DIFCO purificado a 0,75% em tampão fosfatado salino de pH 7,3. Foram colocados 6 ml da suspensão de agar quente em placas de Petri de 5 cm de diâmetro que foram estocadas em geladeira a 8°C por pelo menos 24 horas antes da utilização. O padrão do teste era hexagonal e constituía-se de um orifício central e seis periféricos cada um

O soro de referência era colocado no orifício central, enquanto nos orifícios superior e inferior eram preenchidos com o antígeno de referência para leucose bovina. Dos quatro orifícios periféricos restantes eram preenchidos com as amostras de soros a serem testados. Essas placas preparadas foram mantidas à temperatura ambiente, sendo observadas a cada 24 horas e a leitura final feita após 72 horas. As amostras de soro eram consideradas positivas quando formavam uma ou duas linhas de precipitação contínuas e idênticas com as linhas do soro de referência (Fig. 1).

### 3.9- Culturas breves de Leucócitos

Vinte milímetros de sangue para preparar culturas breves de leucócitos foram obtidos de ovinos por punção da veia jugular com agulhas e seringa de vidro estéreis, contendo 0,5 ml de heparina (400 UI). O sangue foi centrifugado a 1200 rpm durante 12 minutos e após cuidadosa retirada do Plasma, a camada de leucócitos foi recolhida com pipeta Pasteur e transferida para tubos de centrífuga estéril de 15 ml. Os leucócitos foram separados dos eritrócitos "contaminantes" utilizando-se o choque hipotênico com seis ml de água destilada, agitação de aproximadamente 10 segundos e reconstituição da tonicidade normal através de adição de mesmo volume de tampão fosfatado salino duas vezes a concentração normal (0,30 ml).

Para preservar a viabilidade dos leucócitos foi adicionado a cada preparação dois ml de soro fetal bovino insento de

anticorpos para o VLB. A suspensão de leucócitos foi novamente centrifugada, o sobrenadante desprezado e finalmente o sedimento celular, constituído principalmente de leucócitos, foi resuspenso em meio de cultura de RPMI 1640 contendo antibiótico e 10% de soro fetal bovino e cultivados em garrafas de diluição de leite e incubadas a 37°C durante 24 horas. Após esse período as células eram resuspensas, por agitação, no próprio meio de cultura, novamente centrifugadas e após a eliminação do sobrenadante, o sedimento celular foi fixado por suspensão em uma solução de glutaraldeído a 2,5%.

Os leucócitos foram posteriormente processados por técnica apropriada para preparação de cortes ultra-finos para avaliação pela microscopia eletrônica.

### 3.10- Processamento de culturas dos leucócitos para avaliação ultra-estrutural pela microscopia eletrônica.

Culturas de leucócitos que estavam fixadas em glutaraldeído a 2,5% foram lavados em uma solução em partes iguais de sacarose e tampão cacodilato de sódio, pós-fixadas em uma mistura com partes iguais de tetróxido de ósmio a 2% e cacodilato de sódio durante 40 minutos e lavadas novamente em solução de sacarose-cacodilato de sódio. Os leucócitos foram submetidos ao processo de desidratação, através da passagem por diferentes concentrações de álcool e acetona, obedecendo a seguinte sequência:

álcool a 50% durante 20 minutos, a temperatura ambiente; álcool a 70% por 24 horas a temperatura ambiente, álcool 90 ou 95% durante 20 minutos, à temperatura ambiente; álcool 100% durante 1 hora, à temperatura ambiente e depois, o sedimento celular foi tratado com acetona pura durante 10 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, o sedimento celular foi tratado com resina Polylite 50% em estufa a 40°C durante 24 horas. Posteriormente, esse material foi transferido para resina Polylite 100% sendo mantido em estufa 40°C por 24 horas e, então, incluído em resina polylite 100% em cápsulas gelatinosas de tamanho 00 e com capacidade para 0,9 ml. As cápsulas contendo o sedimento celular foram transferidas para estufa 60°C, onde permaneceram até a polimerização da resina, cerca de 48 horas.

Foram retiradas as cápsulas e aflorado o material incluído nos blocos, em um piramitômetro. Os cortes ultra-finos foram feitos em um ultra-micrótomo utilizando navalhas de vidro, sendo recolhidos em grades metálicas de 400 mesh. Os cortes foram contratados positivamente pelo acetato de uranila e pelo citrato de chumbo e observadas em um microscópio eletrônico ZEISS 109.

### 3.11- Análise Estatística

As contagens linfocitárias absolutas por  $\text{mm}^3$  de sangue dos cordeiros utilizados nos experimentos da infectividade do VLB do intestino médio como do aparelho bucal foram submetidos a uma análise estatística num programa especial computadorizado, realizado no setor de métodos quantitativos do Centro Na-

cional de pesquisas de suínos e Aves. Foi utilizado o teste BARTLETT para demonstrar a homogeneidade das variâncias para as contagens linfocitárias absoluta mensais, de cada cordeiro dentro de cada tratamento e comparação das variâncias entre os dois tratamentos para cada experimento. Foi utilizado o teste "F" para demonstração da significância, aos níveis de probabilidades usuais (5%) das diferenças entre as contagens linfocitárias absoluta dos animais de cada experimento.

### 3.12. PROJETO EXPERIMENTAL

Para a avaliação do potencial de *S. calcitrans* como transmissor do VLB, o projeto experimental foi dividido em três etapas:

#### Experimento 1

Recuperação do vírus da leucemia bovina de leucócitos obtidos do intestino médio de *S. calcitrans*.

#### Experimento 2

Recuperação do vírus da leucemia obtidos do aparelho bucal de *S. calcitrans*.

#### Experimento 3

Tentativa de transmissão mecânica do vírus da leucemia bovina por *S. calcitrans*.

### 3.12.1- Recuperação do vírus da leucemia bovina de leucócitos obtidos do intestino médio de *S. calcitrans*.

Môscas *S. calcitrans* ingurgitadas foram colocadas no congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente três minutos com o objetivo de reduzir a sua movimentação e facilitar a retirada do intestino médio. As môscas foram colocadas em placas de Petri de plástico, o abdomen separado do torax com uma lâmina de bisturi e imediatamente colocada em meio de cultura Ham F10-199 resfriado, contendo heparina (20/ml) e antibióticos. O abdomen das môscas foi seccionado com uma agulha gauge 26 aderida a uma seringa de tuberculina, através da constante injeção e aspiração de meio de cultura. O conteúdo sanguinolento do intestino médio foi transferido para tubo de vidro, em banho de gelo, agitado manualmente para desagregar os elementos celulares recuperados e finalmente, deixado em repouso por aproximadamente por 30 segundos para deposição das partículas grossas. A preparação contendo células em suspensão foi recolhida em tubo de centrífuga cônica de 50 ml e centrifugado a 1500 rpm durante 12 minutos a  $8^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi submetido a choque hipotônico por adição de 6 ml de água destilada. Após 10 segundos, foi adicionado volume igual de tampão fosfatado salino duas vezes a concentração normal (0,30 M) para reconstituir a tonicidade normal do tampão (0,15 M). Para preservação da viabilidade celular, foi adicionada à suspensão celular 1 ml de soro fetal bovino. Esta suspensão foi novamente centrifugada como descrito acima, desprezando-se o sobrenadante re-

constituindo-se o sedimento contendo leucócitos em meio de cultura F10-199 contendo 10% soro fetal bovino.

O número de leucócitos viáveis foi determinado pelo método de exclusão, utilizando-se uma solução de azul de Trypan a 1% e realizando 1:1 antes da contagem em câmaras de Neubauer modificada. Para cada preparação, depois que o número de leucócitos viáveis foi determinado, foi feita a inoculação em um cordeiro, em um total de cinco cordeiros de 5 a 18 dias de idade. Um diagrama demonstrativo da técnica utilizada para a recuperação dos leucócitos do Intestino médio de *S. calcitrans* é apresentado na figura 2. O número total de leucócitos inoculados por cordeiro variou de  $5,6 \times 10^5$  a  $2,1 \times 10^6$  leucócitos. Dois cordeiros de seis e 24 dias de idade foram utilizados como controles não inoculados. Em um baia, foram colocados três cordeiros inoculados e um controle, enquanto que, num segundo boxe foram colocados dois cordeiros inoculados e um controle. Todos os cordeiros foram mantidos durante um período experimental de 36 meses para coleta de sangue mensal e avaliação do desenvolvimento de anticorpos para o VLB. Durante os primeiros 20 meses, realizou-se o exame hematológico para determinar o número absoluto de linfócitos por mm de sangue.

### 3.12-2- Recuperação do vírus da Leucemia Bovina de Leucócitos obtidos do Aparelho Bucal de *S. calcitrans*.

Môscas que estavam se alimentando na vaca infectada com o VLB, foram coletadas com um puçá, transferidas para o la-

boratório para serem identificadas e processadas com o objetivo de se recuperar os leucócitos contidos no sangue ingerido e ainda mantido no aparelho bucal. Após resfriamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante 3 minutos, as cabeças dos insetos foram seccionadas do torax e colocadas imediatamente em meio de cultura Ham F10-199 resfriado e adicionado de heparina, antibióticos e soro fetal bovino a 10%. As cabeças eram individualmente transferidas para uma segunda placa de Petri estéril contendo aproximadamente 10 ml de meio de cultura e, então, o aparelho bucal era separado da cabeça, utilizando-se pinça e tesoura finas e seccionado em três partes.

Depois de cortados, os segmentos do aparelho bucal foram colocados em um triturador TenBroeck de vidro e submetidos ao processo de trituração suave de 12 ciclos. Após a trituração, a suspensão foi colocada em repouso por aproximadamente 3 minutos para a deposição das partículas grossas. O sobrenadante foi retirado com uma seringa estéril procedendo-se a contagem dos leucócitos viáveis pela técnica de exclusão com azul de Trypan. Com o objetivo de se verificar se os leucócitos recuperados continham o VLB, utilizou-se novamente um bio-ensaio em cinco cordeiros de aproximadamente dois meses de idade. Os cordeiros foram inoculados pela via sub-cutânea à altura da pleta direita com um número de leucócitos viáveis que variavam de  $2,3 \times 10^4$  a  $8,8 \times 10^5$  leucócitos. Um diagrama representativo da técnica utilizada na recuperação dos leucócitos do aparelho bucal de *S. calcitrans* é apresentado na figura 3. Em um dos

cordeiros inoculados não se realizou a contagem do número de leucócitos previamente a inoculação. O número de aparelhos bucais utilizados para recuperar leucócitos a serem inoculados em cada um dos cordeiros variou entre 100 a 191.

Como controles não inoculados foram utilizados dois cordeiros de dois meses de idade. Três cordeiros inoculados foram alojados em uma baía com um cordeiro controle. Em um outra baia, alojaram-se dois cordeiros inoculados e um controle. Uma amostra de sangue foi colhida da veia jugular de cada cordeiro, mensalmente, por um período de 24 meses para avaliação do desenvolvimento de anticorpos para o VLB, como evidência da infecção adquirida. Durante os seis primeiros meses após a inoculação experimental, foram realizados exames hematológicos para determinar o número absoluto de linfócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue.

### 3.12.3- Tentativa de transmissão mecânica do Vírus da Leucemia Bovina por *S. calcitrans* L.

Môscas adultas eclodidas no laboratório correspondentes à segunda geração foram alimentadas com uma gaze embebida em sangue heparinizado colhido de bezerras sem anticorpos para o VLB. Com o objetivo de testar a hipótese de que *S. calcitrans* poderia transmitir o VLB mecanicamente, delineou-se um experimento baseado na alimentação interrompida de môscas de laboratório em bovinos infectados e continuação da alimentação em cordeiros não infectados com o VLB. Grupos de 5 a 7 môscas de 5 a 20 dias de idade foram colocadas em beaker de 5 cm de diâme-

metro por 7 cm de altura coberto com uma camada de gaze e mantida em jejum alimentar de 18 a 24 horas. Após este jejum as m<sup>o</sup>scas eram colocadas em contato com a pele depilada da bezerra infectada o VLB, através da camada de gaze. As m<sup>o</sup>scas começaram a se alimentar, processo que era facilmente observado pela introdução da probócida da m<sup>o</sup>sca na pele do animal e pelo início da ingurgitação abdominal, sendo mantidas aproximadamente por 15 segundo sobre a bezerra. A alimentação era interrompida retirando-se beaker da pele da bezerra e colocando o mesmo sobre a pele depilada, ao nível do torax lateral do cordeiro permitindo a continuação da alimentação. Este processo de alimentação interrompida foi repetida para grupo de m<sup>o</sup>scas até as m<sup>o</sup>scas estarem com o abdomen ingurgitado, alternando-se a alimentação entre a bezerra e o cordeiro por quatro a cinco vezes.

Quando o beaker era retirado da pele tanto da bezerra como da ovelha era possível visualizar ferimentos causados pelas picadas das m<sup>o</sup>scas. Em inúmeras vezes podia-se distinguir gotículas de sangue, confirmando-se que a m<sup>o</sup>sca tinha se alimentado.

O experimento de alimentação interrompida foi realizado em cinco cordeiros, três com dois meses e dois com sete meses de idade. Foram utilizados como controle dois cordeiros de dois a sete meses de idade, respectivamente. Os cordeiros foram mantidos em isolamento, em área livre de artropodes, durante os primeiros 12 meses do período experimental. Após esse

período os cordeiros foram mantidos em condições de exploração semi-extensiva até o final do período de observação de 36 meses para um grupo de cordeiros de sete meses de idade, ao início do experimento, e, de 30 meses para grupo de cordeiros de dois meses de idade. A partir do início do processo de exposição dos cordeiros às moscas, coletou-se mensalmente uma amostra de sangue para avaliação do desenvolvimento de anticorpos para o VLB e para exames de leucometria.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de m<sup>o</sup>scas selvagens, foi implantada uma criação de *S. calcitrans* em laboratório, obtendo-se uma ovipostura com taxa de eclosão dos ovos em torno de 50% de larvas viáveis. Destas larvas, inicialmente, eclodiram aproximadamente 62% de pupas e atingindo-se, posteriormente, a faixa dos 85%.

Nas primeiras tentativas de se implantar colônias de *S. calcitrans*, ocorreram problemas relacionados a infestação com ácaros e insetos, que impediram o desenvolvimento de *S. calcitrans*, principalmente nos estágios de ovo e larva. Este problema foi solucionado em grande parte, através do aquecimento da ração das aves de postura utilizada como um dos ingredientes do meio de ovipostura e crescimento larval, a 60°C durante 60 minutos.

A longevidade das m<sup>o</sup>scas variou entre 14 a 18 dias, enquanto que o tempo médio de eclosão dos ovos variava em torno de 24 a 36 horas, com um período médio de desenvolvimento larval de 10 dias e um período médio de pupação de seis dias até a

eclosão das m<sup>o</sup>scas. O período de pré-oviposição teve uma média de 8 dias. Apesar da utilização de um armário-estufa improvisado, que permitia oscilações de temperatura interna entre 15 a 28°C, os resultados obtidos em relação a eclosão dos ovos foram similares aos obtidos por JONES (1966) que encontrou que colônias de m<sup>o</sup>scas mantidas a 15,5°C, 21,1 e 26,6°C tiveram tempo médios de eclosão entre 24 a 36 horas, período médio de desenvolvimento larval de 12 dias, período médio de pupação de 7,3 dias e período médio de pré-oviposição de 11 dias. A utilização de um meio para ovipostura e desenvolvimento larval constituído de ingredientes de fácil obtenção tais como ração para ave de postura e cana-de-açúcar moída, forneceu condições suficientes para o estabelecimento de colônias de *S. calcitrans*. Este meio de cultura difere consideravelmente dos meios recomendados por JONES (1966) para a criação de *S. calcitrans*, sendo de grande vantagem pela simples composição.

A metodologia utilizada para recuperar leucócitos do intestino médio de *S. calcitrans* ingurgitadas provou ser simples e eficiente, permitindo após choque hipotônico das hemácias contaminantes, a obtenção de suspensões celulares enriquecidas de leucócitos de origem bovina. O choque hipotônico foi rápido, permitindo a recuperação de um número adequado de leucócitos viáveis, classificados assim, por não adquirir a coloração vital como azul de Trypan. A observação da suspensão celular sob microscópio simples a um aumento total de 250 X permitiu a visualização de células mononucleares com características de leucó-

cidos mas, sem possibilitar a identificação diferencial destas.

A utilização de um bio-ensaio em cordeiros cujas idades variavam entre 5 e 18 dias, permitiu demonstrar que os leucócitos recuperados do intestino médio de *S. calcitrans*, que tinham recentemente se alimentado em uma vaca infectada com o VLB, possuíam a capacidade de transmitir o vírus após a inoculação experimental pela via sub-cutânea. Todos os cinco (100%) cordeiros inoculados por esta via, desenvolveram anticorpos para a glicoproteína maior do envelope viral, gp51, do VLB (Tabela 1). A presença dos anticorpos foi verificada no caso de um cordeiro, um mês após a inoculação experimental; no caso de três cordeiros, três meses após a inoculação e no caso de um quinto cordeiro, quatro meses após a inoculação experimental. Estes anticorpos, uma vez detectados, persistiram durante todo o período experimental de 36 meses, indicando o estabelecimento da infecção permanente com o VLB. Um cordeiro (Nº.51) desenvolveu também anticorpos para polipetídeo estrutural p25, os quais foram detectados pela primeira vez ao 18º mês após a inoculação experimental e persistindo até o 36º mês. Os dois cordeiros testemunhas mantidos durante o período experimental em contato com os cordeiros que se infectaram com o VLB, não desenvolveram anticorpos para nenhum dos antígenos virais. Este último resultado, indica que sob as condições experimentais utilizadas, não houve transmissão horizontal entre os cordeiros. A quantidade de leucócitos viáveis utilizadas nessa fase experimental, de  $5,6 \times 10^5$  a  $2,1 \times 10^6$ , foram suficientes para infectar os cordeiros inoculados.

As médias das contagens linfocitárias absolutas por  $\text{mm}^3$  de sangue de cordeiros que se infectaram com o VLB após a inoculação de leucócitos recuperados do intestino médio de *S. calcitrans* variou  $3408,3 \pm 316,0$  a  $4125,7 \pm 234,0$ , com uma média de  $3656,6 \pm 11,7$  (TAB. 2). Por outro lado, as contagens linfocitárias absolutas dos cordeiros testemunhas que não se infectaram com o vírus foram de  $3692,6 \pm 342,2$  e  $3845,5 \pm 301,4$  com uma média de  $3760,7 \pm 230,0$ . A análise estatística utilizando o teste "F" não revelou diferenças significativas entre os dois tratamentos. Os resultados desse experimento indicaram que nenhum dos cordeiros infectados com o VLB, desenvolveu linfocitose persistente durante a avaliação experimental de 20 meses. Esses resultados são diferentes dos relatados por JOHNSTONE ET AL. (1979) que observaram linfocitose persistente em 19 de 28 cordeiros inoculados "in utero" ou ao nascimento com extratos livres de células obtidos de linfomas malignos, após um período experimental de cinco anos.

Por outro lado, tanto no presente experimento com um período de avaliação total de 3 anos como o experimento de JOHNSTONE ET AL. (1979) de 5 anos de duração não se observou linfossarcoma.

Cortes ultra-finos preparados das culturas de leucócitos dos cordeiros desse experimento revelaram a presença de abundante número de células mononucleares e polimorfonucleares. Apenas em um caso correspondente ao cordeiro de N°. 55, foram observadas algumas partículas virais reminiscentes de partícu-

las do tipo C. Essas poucas partículas foram observadas entre detritos celulares e dentro de vacúolos citoplasmáticos (FIG. 4). Em nenhum momento foram observadas alterações nucleares correspondentes às "bolsas" consideradas como marcadores morfológicos, especificamente relacionados com a leucose bovina, mas de uma forma desconhecida (WEBER ET AL. 1980).

As primeiras indicações que o VLB poderia ser transmitido por insetos hematófagos foram fornecidas por BECK-NIESEN ET AL. (1978) que recuperaram leucócitos infectados com o VLB do intestino médio de *Tabanus nigrovittatus* que tinham se alimentado em vaca infectada com o VLB. A infecciosidade dos linfócitos recuperados foi determinada através do ensaio de infectividade sincicial, que permitiu o isolamento do VLB em culturas celulares em baço de embrião de bovino. Essas culturas foram inoculadas com  $6 \times 10^5$  linfócitos recuperados do intestino médio de Tabanídeos com aproximadamente 50% de viabilidade.

Mais recentemente, ROMERO ET AL. (1984) demonstraram que leucócitos viáveis recuperados do intestino médio de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* que tinham se alimentados em novilhos infectados com o VLB, eram portadores deste vírus. O poder infectante dos leucócitos recuperados foi evidenciado através da inoculação de  $4 \times 10^6$  leucócitos viáveis, em cordeiros. Nesse experimento, apenas dois (50%) dos quatro cordeiros desenvolveram anticorpos para a gp51 do VLB, detectáveis um mês após a inoculação experimental e persistindo por um mínimo de 15 meses. Um dos cordeiros infectados, desenvolveu também an-

ticorpos para p25, detectáveis no 15º após a inoculação.

Apesar desses dois estudos assinalares o potencial do artropodes hematófagos na transmissão do VLB, a evidência definitiva demonstrando esta transmissão, ainda não foi verificada.

A técnica utilizada para recuperar leucócitos do aparelho bucal de *S. calcitrans* foi basicamente a técnica descrita para a recuperação destas células do intestino médio de *S. calcitrans* com a variante de não se utilizar o choque hipotônico para lise das hemácias. A quantidade de leucócitos passível de ser recuperado do aparelho bucal, era significativamente menor e o choque hipotônico, reduziria ainda mais, o número de leucócitos viáveis. Racionalizou-se que poder-se-ia precisar de um número de leucócitos para experimentalmente infectar os cordeiros inoculados. Efetivamente foram necessários entre 100 a 191 moscas para se obter  $2,3 \times 10^4$  a  $8,8 \times 10^5$  leucócitos viáveis. Dos cinco cordeiros inoculados, dois cordeiros inoculados com um número inferior a  $10^5$ , não desenvolveram anticorpos para o VLB, durante o período experimental de 24 meses. Por outro lado, dois cordeiros inoculados com um número de leucócitos superior  $10^5$  desenvolveram anticorpos, respectivamente, dois a três meses após a inoculação, indicando a transmissão do VLB. Esses anticorpos persistiram durante o período experimental de 24 meses. Um quinto cordeiro, inoculado com quantidade desconhecida de leucócitos, desenvolveu anticorpos aos três meses após a inoculação, persistindo também durante todo o período experimental. Os anticorpos detectados nesses três últimos cor-

deiros eram específicos para a gp51, não detectando-se em momento nenhum, anticorpos para p25 (Tab. 3). Os dois cordeiros mantidos como testemunhas e criados em contato com os cordeiros que adquiriram a infecção, não desenvolveram anticorpos para o VLB, indicando que não houve transmissão horizontal entre os cordeiros desse experimento.

As médias das contagens linfocitárias absolutas por  $\text{mm}^3$  de sangue para os cordeiros que se infectaram, após a inoculação de leucócitos recuperados do aparelho bucal de *S. caliciformis*, variaram entre  $2610,6 \pm 192,3$  com uma média de 3015,2 (Tab. 4). Por outro lado, as contagens linfocitárias absolutas dos cordeiros testemunhas e dos cordeiros que não se infectaram com o VLB, apesar de serem inoculados variou entre 2382,7 a 3326,5, com uma média de 2804,9. A análise estatística realizada entre os valores linfocitários médios dos cordeiros que se infectaram e os cordeiros que não se infectaram não revelou diferenças significativas a nível de 5%. Ao final do período de avaliação linfocitária de sete meses, não houve nenhuma evidência da ocorrência de linfocitose persistente em nenhum dos cordeiros, independentemente do tratamento.

Os cortes ultra-finos preparados das culturas de leucócitos dos cordeiros desse experimento, não revelaram a presença de partículas virais do tipo C, apesar de se ter observado abundante número de células mononucleares com características de linfócitos, células consideradas como as únicas produtoras do VLB (FERRER 1980) (Fig. 5).

Experimentos similares, utilizando bio-ensaio em cordeiros, para verificar o poder infectante de leucócitos contidos no aparelho bucal e cabeça de *Anopheles freeborni*, *A. albimanus*, *A. quadrimaculatus* e *A. stephensi* demonstraram entre 54 a 122 aparelhos bucais foram suficientes para transmitir o VLB aos cordeiros receptores (BUXTON ET AL. 1982). Estes resultados não indicam a transmissão do VLB pelos mosquitos mencionados, mas, apenas o fato dos mosquitos manterem leucócitos viáveis infectados por períodos não determinados. De uma maneira geral, os mosquitos não são considerados vetores mecânicos importantes de vírus devido ao pequeno tamanho do aparelho bucal, ao qual o sangue é aderido. Além disso, a tendência que os mosquitos têm de completar sua alimentação em um único hospedeiro, faz com que eles sejam menos importantes que os tabanídeos na provável transmissão mecânica do VLB. Por outro lado, moscas hematófagas com o aparelho bucal maior e cuja picada dolorosa preclui a finalização da alimentação em um único hospedeiro, poderiam estar envolvidas com maior probabilidade na transmissão mecânica do VLB.

Os resultados do experimento sobre transmissão mecânica do VLB por *S. calcitrans*, indicam que nas condições experimentais utilizadas, não foi possível transmitir o VLB de uma vaca infectada para cordeiros sorologicamente negativos para este vírus.

Para cada tentativa de transmissão mecânica, por cordeiros, utilizaram-se um total de moscas que variava entre 42 a 174. O número de exposições para cada cordeiro variou entre

16 a 93, calculando-se que o percentual de moscas que se alimentavam variava entre 68 a 93%.

O número de picadas observadas, para cada grupo de moscas utilizado em cada cordeiro, variou de 135 a 555 por períodos experimentais que se estenderam de três a 10 meses. Apesar do período de observação ser estendido até 30 e 36 meses nenhum dos cinco cordeiros utilizados na tentativa de transmissão mecânica, desenvolveram anticorpos para o VLB. (Tab.5).

Experimentos de transmissão mecânica do VLB utilizando-se artropodes, têm sido relatados na literatura, KAADEN ET AL. (1982) descreveram a transmissão transtadial do VLB de ninfas à forma adulta do carrapato *Ixodes ricinus* L. Nesse experimento 400 ninfas, 80 machas e 80 fêmeas foram alimentadas em quatro bovinos infectados com o VLB por um período de cinco a sete dias. A ecdise de ninfas para adultos foi realizada no laboratório, para depois alimentar os carrapatos adultos, durante três a quatro dias, em quatro bovinos sorologicamente negativos para o VLB. Dois meses após a exposição aos carrapatos, um dos quatro bovinos continha anticorpos fluorescentes detectáveis pelo teste de imunofluorescência, utilizando soro marcado anti-C'3 e partículas virais nas culturas de leucócitos. Anticorpos fluorescentes e partículas virais apareceram nos outros três touros, três meses após a exposição. Um dos bovinos desenvolveu também anticorpos detectáveis pelo teste de ELISA. Nos quatro bovinos, os anticorpos demonstrados pelo o teste de imunofluorescência e ELISA, assim como as partículas vi-

rais, foram transitórias em natureza, não detectando-se mais, três meses após a exposição aos carrapatos. Os resultados sorológicos e virológicos deste experimento de transmissão são inconsistentes com a abundante informação que indicam que o VLB uma vez introduzido no hospedeiro natural, o bovino, produz uma infecção permanente com persistência de anticorpos, mais provavelmente, durante toda a vida do animal (PIPER ET AL. 1979; MILLER ET AL. 1969; STOCK & FERRER 1972; MAC DONALD ET AL. 1976; MILLER ET AL. 1972, ONUMA ET AL. 1975).

Mas, recentemente, no Japão, OSHIMA ET AL. (1981) relataram a transmissão mecânica do VLB utilizando uma população de Tabanídeos composta por *T. nippomicus* (mais de 90%). *T. trigeminis*, *T. chrysurinus* e *Chrysops vanderwulpi*. Como em nossos estudos os pesquisadores japoneses utilizaram o método de alimentação interrompida, transferindo tabanídeos de uma vaca infectada com o VLB para três cordeiros receptores. Quarenta dias, após a exposição aos tabanídeos, os três cordeiros apresentaram anticorpos precipitantes de título que variava entre 1:8 a 1:32. Esses anticorpos foram detectados no caso de um cordeiro 127 dias após a exposição, em títulos de 1:256 e no caso de outro cordeiro, aos 157 dias após a exposição com títulos de 1:128. Os títulos de anticorpos precipitantes desenvolvidos pelos cordeiros são exageradamente altos levantando-se a dúvida de serem dirigidos à antígenos diferentes do VLB.

O resultado deste grupo contrastam também com os nossos resultados no que se refere ao número de exposições, de 131 a 140 vezes para cada cordeiro, durante quatro dias no ex-

perimento de OSHIMA ET AL. (1981) e 135 a 555 durante 3 a 10 meses, em nosso experimento.

Os experimentos realizados no presente trabalho demonstraram claramente que *Stomoxys calcitrans* pode transportar por períodos não definidos, leucócitos infectados com o VLB, tanto no aparelho bucal como no intestino médio. Por outro lado, os experimentos de transmissão mecânica, não demonstraram que sob as condições experimentais utilizadas, que *S. calcitrans* é um vetor mecânico do VLB. No entanto, esses resultados não podem ser considerados conclusivos, levando-se em consideração, as características do experimento utilizado testar a hipótese a transmissão mecânica do VLB. Acredita-se que em condições de campo, durante os meses de maior atividade de insetos hematófagos, os bovinos sejam atacados por quantidades de moscas hematófagas muito superiores àquelas utilizadas no presente experimento, em um espaço de tempo significativamente menor. O fato de se ter utilizado ovinos como receptores para o VLB, não pode ser considerado como fator limitante, desde que existam inúmeros resultados (HOSS ET AL. 1974; HONNA ET AL. 1980; OLSON ET AL. 1972; ONUMA & OLSON (1977); OLSON ET AL. 1970; OLSON ET AL. 1977; MAMMERICKX ET AL. 1980; MAMMERICKX ET AL. 1982; ROBERTS ET AL. 1985), incluindo os nossos que demonstram categoricamente a alta susceptibilidade dos ovinos ao VLB.

A questão da transmissão mecânica do VLB por insetos hematófagos continua, a rigor, em aberto. Apesar de existirem isolamento do VLB de tabanídeos, mosquitos e carrapatos, como

discutido anteriormente, essa evidência deve ser considerada apenas como circunstancial. Permanece, então, a importância da transmissão horizontal do VLB por mecanismos ainda não elucidados. A informação disponível, indica que os animais infectados não eliminam vírus nas secreções nasais, saliva e urina (MILLER & VAND DER MAATEN 1979), apesar de que o VLB pode ser isolado de lavados bronchio-alveolares e traqueais, antes do aparecimento de anticorpos (ROBERTS ET AL. 1985).

## CONCLUSÕES

1. Colônias de moscas *S. calcitrans* podem ser estabelecidas em laboratório com um mínimo de condições.
2. A mistura em partes de ração para ave de postura e cana de açúcar moída pode ser utilizada com sucesso como meio de ovipostura e desenvolvimento larval.
3. Sangue bovino heparinizado pode ser utilizado na alimentação de *S. calcitrans*.
4. *Stomoxys calcitrans* selvagens que se alimentam em gado bovino infectado com o VLB se tornam portadores do vírus por períodos não definidos.
5. Leucócitos viáveis de origem bovina podem ser recuperados tanto do intestino médio como do aparelho bucal de *S. Calcitrans* adultos.
6. Ovinos são susceptíveis à infecção experimental com o vírus da leucemia bovina.
7. O VLB está presente em leucócitos bovinos obtidos do intes-

tino médio de *S. calcitrans* adultos.

8. O VLB está presente em leucócitos obtidos do aparelho bucal de *S. calcitrans* adultos.
9. Nas presentes condições de experimentação, o número mínimo de leucócitos viáveis recuperados de *S. calcitrans*, para se estabelecer a infecção do VLB em cordeiros foi de  $3,2 \times 10^5$ .
10. Sob as condições experimentais do presente trabalho, não existe transmissão horizontal do VLB em ovinos.
11. Os anticorpos para o gp51 do VLB, desenvolvidos pelos ovinos inoculados com leucócitos recuperados de *S. calcitrans* são permanentes.
12. A infecção com o VLB em ovinos não causa alterações significativas no número absoluto de linfócitos durante o período experimental de trinta e seis meses.
13. Culturas breves de leucócitos preparados a partir de sangue periférico de ovinos infectados com o VLB, contém poucas partículas virais do tipo C, raramente detectáveis pela microscopia eletrônica.
14. Sob as condições experimentais utilizadas no presente trabalho, o VLB não foi transmitido mecanicamente de bovinos infectados a ovinos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR FILHO R.A. Linfadenose aleucêmia em bovinos. O Biológico, São Paulo, 36: 209-12, 1970.
- ALENCAR FILHO, R.A.; MAZANTI, M.T.; SAAD, A.D. & POHL, R. Levantamento preliminar da infecção pelo vírus da leucose linfática (L.L.C.) dos bovinos no Estado de São Paulo. O Biológico, São Paulo, 45: 47-54, 1979.
- ALENCAR FILHO, R.A.; OLIVEIRA, A.R.; SANDOVAL, L.A. & LOUREIRO, M.B. Leucose linfática em bovino - Estudo clínico-laboratorial de um caso. O Biológico, São Paulo, 41: 123-9, 1975.
- BECK-NIELSEN, S.; PIPER, C.E.; FERRER, J.F. Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: role of blood sucking insects. Am. J. Vet. Res. 39 (7): 1089-1092, 1978.
- BENDIXEN, H.J. Bovine enzootic leukosis. Adv. Vet. Sci. Comp.

- Med. 10: 129-204, 1965.
- BENDIXEN, H.J. Epidemiologia Studies of enzootic bovine leukosis associated with the public control program in Denmark, 1959-1971. *Bibl. Haemat.* 39: 215-219, 1973.
- BERBERIAN, D.A. Successful transmission of cutaneous leishmaniosis by bites of *Stomoxys calcitrans*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 38: 254-256, 1938.
- BOUCHÉ, P.F. Natural history of insects especially in regard to the first stages of larvae and pupae. *Nicolaische Buchlandlung Erste Lieferung 10 tab Vorrede p. 55-56*, 1834. *citado por: Rasmussen, R.L. & Campbell, J.B.* 1979.
- BRUES, T. The geographical distribution of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *J. Econ. Entomol.* 6: 459-477, 1913.
- BUTLER, J.F.; KLOFT, W.J.; DOBOSE, L.A. & KLOFT, E.S. Recontamination of food after feeding 32p food source to biting Muscidae. *J. Med. Ent.* 13 (4/5): 567-571, 1977.
- BUXTON, A.B.; SCHULTZ, R. D.; COLLINS, W.E. Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potencial for transmission by mosquitoes. *Am. J. Res.* 43 (8): 1458-1459, 1982.
- CAMPBELL, A.W.; CLELAND, J.B. & BRADLEY, B. A contribution to the experimental pathology of acute poliomyelitis (infantile paralysis). *Med. J. Austrália* 1: 123-128, 1918.
- CAVALCANTE, M.I.; PAES BARRETO, S.C. & COSTA-FILHO, G.A. Sobre

- a ocorrência de leucose bovina no Estado de Pernambuco. *Pesq. Agrop. Bras.* 4: 225-227, 1962.
- CHARWOOD, J.D. & LOPES, J. The age-structure and biting behaviour of *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae) from Brazil. *Bull. Ent. Res.* 79 (4): 543-562, 1980.
- COPLAND, J.W. Swine pox virus in Papua, New Guinea. *Trop. Animal Health and Prod.* 6: 153-157, 1974.
- DACORSO-FILHO, P.; LANGENEGGER, J.; FARIA, J.F.; AGUIAR, A.A. Casos de leucose bovina no Estado do Rio de Janeiro. *Veterinária*: 45-54, 1962.
- DICK, R. The epidemiology and administrative control of anterior poliomyelitis. *Med. J. Austrália* 1: 536-541, 1925.
- DUTCHER, R.M.; LARKIN, E. & MARSHAK, R.R. Vírus-like particles in cow's milk from herd with a high incidence of lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 33 (6): 1055-1059, 1964.
- DUTTA, S. K.; LARKSON, V.L.; SORENSEN, D.K.; PERMAN, V.; WEBER, A.L.; HAMMER, R. F. & SHOPE, R.F. Isolation of C-type particles from leukemic and lymphocytotic cattle. *Comp. Leuk. Res. Biblio. Haemat.* 36: 547, 1970.
- EAGLESOME, M.D.; MITCHELL, D.; BETTERIDGE, K.J.; RANDALL, G.C. B.; SINGH, E.L.; SAMACH, B.S. & HARE, W.C.D. Transfer of embryos from bovine leukemia virus infected cattle to uninfected recipients: preliminary results. *Vet. Rec.* 111: 122-123, 1982.

- FELDMAN, W.H. Malignant growths in domestic animals. J.Am. Vet. Med. Ass. 75: 192-200, 1929.
- FERREIRA, M.I.C.; ROMERO, C.H. & ROWE, C.A. Estudo comparativo entre as provas de imunodifusão em placa e em lâmina na detecção de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina. Pesq. Vet. Bras. 2(2): 49-53, 1982a.
- FERREIRA, M.I.C.; ROMERO, C.H. & ROWE, C.A. Contagem linfocitária e anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos do Rio de Janeiro. Pesq. Vet. Bras. 2 (3): 99-104, 1982b.
- FERRER, J.F. Antigenic comparison of bovine type-C vírus with murine and feline leukemia viruses. Cancer Res. 32: 1871-1877, 1972.
- FERRER, J.F. Bovine leukosis: natural transmission and principles of control. J. Am. Vet. Med. Ass. 175 (12): 1281-1286. 1979.
- FERRER, J.F. Bovine lymphosarcoma. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 24: 1-67, 1980.
- FERRER, J.F. La leucosis bovina y seu agente causal. Salud Animal Publ. Cient. nº 1, 1982.
- FERRER, J.F.; ABT, D.A.; BHATT, D. & MARSHAK, R.R. Studies on the relationship between infection with bovine C-type virus leukemia, and persistent lymphocytosis in cattle. Cancer Res. 34: 893-900, 1974.

- FERRER, J. F.; ÁVILA, L. & STOCK, N. D. Serological detection of type-C víruses found in bovine cultures. *Cancer Res.* 32: 1864-1870, 1972.
- FERRER, J. F.; ÁVILA, L. & STOCK, N. D. Recent eletron microscopic and imunologic studies on bovine cell cultures containing- C-type víruses. *Bibl. Haematol.* 39: 206-214, 1973.
- FERRER, J. F.; PIPER, C. E.; ABT, D. A.; MARSHAK, R. R. & BHATT, D. M. Natural mode of transmission of the bovine C-type leukemia virus (BLV). *Comp. Luek. Res. Bibl. Haematol.* 43: 235-237, 1976.
- FERRIS, O. H.; HANSON, R.P.; DICKIE, R.J. & ROBERTS, R.H. Experimental transmission of vesicular stomatitis virus by Diptera. *J. Infec. Dis.* 96: 184-192, 1955.
- FISCHER, R. G. TURNER, E.; LUECKE, D.H. BURTON, G.J. Assays for the driend murine leukemia virus (FLV) complex the stable gly, *Stomoxys calcitrans* Mosquito News 33 (3): 440-446,1973.
- FOIL, L. D.; MEEK, C. L.; ADAMS, W.D.; ISSEL, C. J. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*stomoxys calcitrans*). *Am. J. Vet. Res.* 44 (1): 155-156, 1983.
- FREIRE, H. H. da R. & FREITAS, V. H. Constatation de la leucose bovina dans l'Etat de Rio de Janeiro, Brasil. *Bull. Off. Inter. Epiz.* 66: 775-782, 1966.

- FRÖHNER, E. & ZWICK, K. Lehrbuch der speziellen pathologic und therapie der haustiere. 8th. ed. Ed: Enke Stuttgart, 1915, Citado por Bendixen, 1965.
- GOTZE, R.; ROSENBERG, G. & ZIEGENHAGEN, G. Die Leukose des rindes, inre hematologische and klinische diagnose Monatsh. Vet. Med. 11: 169-173, 1956.
- GRAZELA, J.J. & PICKENS, L. G. A comparison of two methods for feeding the stable fly (Dip: Muscidae). J. Med. Entomol. 15 (3): 274-277, 1979.
- GUPTA, P. & FERRER, J.F. Detection of bovine leukemia virus antigen in urine from naturally infected cattle, Inter. J. cancer 25: 663-666, 1980.
- HARDY, W. D.; OLD, L.J.; HESS, P.W.; ESSEX, M. & COOTTER, S. Horizontal transmission of feline leukaemia virus. Nature 244: 266-269, 1973.
- HAWKINS, J. A.; ADAMS, W.V.; COOK, L.; WILSON, B.N. & ROTH, E. E. Role of horse fly (*Tabanus fuscicostatus* Hine) and stable fly (*Stomoxys calcitrans*) in transmission of equine infectious anemia virus to ponies in Louisiana. Am. J. Vet. Res. 24: 1583-1586, 1973.
- HONNA, T.; ONUMA, M.; SUNEYA, M.; MIRANI, T. and IAWA, H. Cytotoxic antibody in cattle and Sheep exposed to bovine leukemia virus. Archives of Virology 66 293-299, 1980.

- HOSS, A.E. and OLSON C. Infectivity of Bovine C-type (leukemia) virus for sheep and goats. *Am. J. Vet. Res.* 35: (5): 633-637, 1974.
- HOWARD, C.W. Insect transmission of infectious anemia of horses. *J. Parasitol.* 4: 70-79, 1917.
- HUTYRA, F. & MAREK, J. "Spezielle pathologie und therapie der haustiere". Fischer, Jena, Germany, 1913 (Citado por Bendixen, 1965).
- JONES, C.M. Stable flies. Chapter 10 In: *Insect Colonization and Mass Production*. Academic Press, NY, 1966.
- JOHNSTONE, A.C.; MANKTELOW, B.W.; JOLLY, R.D. and BELTON, D. J. Persistent lymphocytosis and virus-like particles in lymphocytes of sheep inoculated with cell-free extracts derived from malignant lymphomas. *J. Pathol.* 128: 183-191, 1979.
- KAADEN, O.R.; FISHER, N.; MEERMANN, A. & LIEBISCH, A: Transmission of BLV by *Ixodes ricinus* ticks. 4<sup>o</sup> Inter. Symp. Bovine Leukemia. Ed. O.C. Straub, Brussels- Luxemburg, 1982.
- KAJA, R.W.; OLSON, C. Non-infectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus. *Theriogenology* 18 (1): 107-112, 1982.
- KANTEK, C.E.; KRUGER, E.R. & WELTE, V.R. Prevalence of enzootic bovine leukosis virus in dairy cattle in Paraná. *Pesq. Vet. Bras.* 3 (4): 125-219, 1983.
- KANTEK-NAVARRO, C.E.; KRÜGER, E.R. & WELTE, V.R. Infecção com

- virus da leucose bovina em um lote de vacas produtoras de leite importadas do Uruguai. *Pesq. Vet. Bras.* 2 (3). 125-126, 1982.
- KEMEN, M.J.; McCLAIN, D.S. & MATHYSSE, J.D. Role of horse flies in transmission of equine infectious anemia from carrier ponies, *J. Am. Vet. Med. Ass.* 172 (3): 360-362, 1978.
- MAC DONALD, H.C.; GRAVES, D.C. and FERRER, J.F. Isolation and characterization of an antigen of the bovine C-type virus. *Cancer Res.* 36: 1251-1257, 1976.
- MACHADO, A.V.; SILVA, J.M.L. da; CURIAL, O.; FREIRE, E.J.; SALIBA, A. M.; MARTINS, E.O.; CAVALCANTI, M.I.; SANTOS, J.A. dos; TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J.; FARIA, J.F.; NOVLOSKI, G. & PEREIRA, E.F.C. Incidência de blastomas em animais no Brasil. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais.* 15: 327-401, 1963.
- MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; BURNY, A. and LEUNEM J. Detection by immunodifusion- and radioimmunoassay- Tests of antibodies to bovine leukemia virus antigens in sera of experimentally infected sheep and cattle. *Zb1. Vet. Med. B.* 27. 291.303 (1980).
- MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; BURNY, A. Experimental cross transmission of bovine leukemia virus (BLV) between several animal species. *Fourth Int. Symp ou Bovine leukosis E. O.C. Straub. Brussels-luxembourg.* 1982.
- MARIN, C.; MEDINA DE LOPEZ, N.; DE ALVAREZ, L.P.; LOZANO, P.; ESPANA, W.; CASTAÑOS, H. & LEON, A. Epidemiology of bovine

- leukemia in Venezuela. Ann. Rech. Vet. 9 (4): 743-746, 1978.
- MARIN. C.; LOPES, N. de; ALVAREZ, L. de; CASTANOS, H. ESPANA, W.; LEÓN, A. and BELLO, A. Humoral spontaneous response to bovine leukemia virus infection in Zebu, Sheep, buffalo and Capibara. Fourth International Symp. on Bovine leukosis O.C. Straub (ed.), Brussels-luxembourg, 1982.
- MARSHAL, J. & HERBERT, W.J. An attempt to infect the fly *Stomoxys calcitrans* With *Trypanosoma theileri* Brit. Vet. J. 135: 416, 1979.
- MARTIN, G.; LÉBOUEUF, A. & ROUBAND, E. Experiences de transmission du nagana par les *Stomoxys* et par les moustiques du genre *Mansonia*. Bull. Soc. Path. Exot. 1: 355-358, 1908.
- MATOS, M.S. & MATOS, P.F. Laboratório clínico médico-veterinário. Ed. Arcoíris Ltda. Salvador, 1981.
- MERKT, H.; GIUDICE, J.C.O. & MULLER, J.A. Leucose bovina. Rev. Esc. Agron. Vet. Univer. Rio G. Sul, 2: 7-27, 1959.
- MILLER, J.M.; MILLER, L.D.; OLSON, G. & GILLETE, K. G. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst. 43: 1297-1305, 1969.
- MILLER, J.M. & OLSON, C. Brief communication: precipitating antibody to an internal antigen of C.type virus associated with bovine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst. 49 (5): 1439-1462, 1972.

- MILLER, J.M. & VAN DER MAATEN, M.J. Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. *J. Cancer Inst.* 62 (2): 425-428, 1979.
- MITZMAIN, M.B. The role of *S. calcitrans* in transmission of *Trypanosoma evansi*. *Philippine J. Sci. Sec. B*, 7: 475-518, 1912.
- MUCHALUAT, M.A. Leucose bovina em um rebanho de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais* 23: 321-328, 1971.
- MUIR, F. On the original habitat of *Stomoxys calcitrans* *J. Econ. Entomol.* 7: 459-460, 1914.
- MUSCOPLAT, C. C.; JOHNSON, D.W., POMEROY, K.A.; OLSON, J.M.; LARSON, V.L.; STEVENS, J.B.; & SORENSEN, D.K. Lymphocyte surface immunoglobulin: frequency in normal and lymphocytotic cattle. *Am. J. Vet. Res.* 35 (4): 593-595, 1974.
- ONUMA, M. and OLSON, C. Tumor associated antigen in bovine and ovine lymphosarcoma. *Cancer Res.* 37: 3249-3256. 1977.
- ONUMA, M.; OLSON, C.; BAUMGARTNER, L.E. & PEARSON, L.D. An ether-sensitive antigen associated with bovine leukemia virus infection. *Natl. Cancer Inst.* 55 (5): 1155-1158, 1975.
- OLSON, C.; BAUMGARTNER, L.E. and ONUMA, M. Bovine leukemia virus, natural and experimental transmission to cattle and sheep. *Semaine d'Etudes Internationales Actualites en Productions bovines - Gembloux*. 6-9 sept. 1977.

- OLSON, C.; MILLER, L.D.; MILLER, J.M. and GILLETTE, R.G. Progress on transmission of Bovine lymphosarcoma. *Comp. Leuk. Res. Bibl. Haematol.* 36 476-492, 1970.
- OLSON, C.; MILLER, L.D.; MILLER, J.M. & HOSS, H.E. Brief communication: transmission of lymphosarcoma from cattle to sheep. *J. Natl. Cancer Inst.* 49 (5): 1463-1467, 1972.
- OSHIMA, K.; OKADA, K; NUMAKUNAI, S.; YONEYAMA, Y.; SATO, S, and TAKAHASHI. K. Evidence on horizontal transmission of bovine leukemia virus due to blood sucking tabanid flies. *Am. J. Vet. Sci.* 43: 79-81 (1981).
- OSTERTAG, R. von. "Hand buch der Fleischbeschau für tierärzte, aerzte und richter. 6th. ed. Enke, Stuttgart, Germany 1913. (citado por Bendixen, 1965).
- PHILPOTT, M. & EZEH, A. C. The experimental transmission by *Musca* and *Stomoxys* species of *D. congolensis* infection between cattle. *Brit. Vet. J.* 134: 515-517, 1978.
- PIPER, C.E.; FERRER, J. F.; ABT, D.A. & MARSHAK, R.R. Post-natal and pre-natal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. *J. Natl. Cancer Inst.* 62 (1): 165-168, 1979.
- POTGIETER, F.T.; SUTHERLAND, B. & BIGGS, H.G. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. *Am. J. Vet. Res.* 48: 119-122, 1981.

- RANGEL, M.M. & MACHADO, A.V. Contribuição a oncologia comparada em Minas Gerais, Incidência dos blastomas colecionados no departamento de Histologia e Anatomia Patológica da Escola Superior de Veterinária do Estado de Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. Univ. Rural de Minas Gerais 1: 83-96, 1943.
- RASMUSSEN, R.L. & CAMPBELL, J.B. Bibliography of the Stable fly *Stomoxys calcitrans* (L). Rep. 8, jun., The Agric. Exp. Sta. Univ. Nebraska, Lincoln, 1979.
- RESSANG, A.A.; MASTENBROEK, N.; QUAK, J. Studies on bovine leukosis. IX Excretion of bovine leukosis virus. Zbl. Vet. B 29: 137-144, 1982.
- RICHARD, J.L. & PIER, A.C. Transmission of *Dermatophilus congolensis* by *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica*. Am. J. Vet. Res. 27: 419-423, 1966.
- ROBERTS, D.M.; LUCAS, M.H.; WIBBERLEY, G. and SWALLOW, C. Infectivity of enzootic bovine leukosis infected animals during the incubation period. Vet. Rec. 116: 310-313, 1985.
- ROMERO, C.H. & ROWE, C.A. Occurrence, epidemiology, diagnosis and control of enzootic bovine leukosis virus in Brazil. Primeira Conf. Inter. sobre o impacto das doenças virais no desenvolvimento de países latinoamericanos e da região do Caribe, vol. II, Rio de Janeiro, 1982.
- ROMERO, C.H.; AGUIAR, A.A.; ZANOCHI, H.G.; ABARACÓN, D.; ROWE, C.A. & SILVA, A.C. Susceptibility of the water buffalo (Bu-

- balus bubalis) to enzootic bovine leukosis virus. *Pesq. Vet. Bras.* 1 (4): 137-140, 1981.
- ROMERO, C.H.; CRUZ, G.B. & ROWE, C.A. Transmission of bovine leukaemia virus in milk. *Trop. An. Hth. Prod.* 15: 215-218, 1983a.
- ROMERO, C.H.; CRUZ, G.B. & ROWE, C.A. Transmission of bovine leukaemia virus through milk ingestion. *Rev. Microb.* 14: (2): 109-114, 1983b.
- ROMERO, C.H.; ROWE, C.A.; AGUIAR, A.A.; ZANOCHI, H.G.; ABARACÓN, D. & SILVA, A.G. Enzootic bovine leukosis virus infection in the tropics. *Adv. Comp. Leukemia Res.* 441-442, 1981.
- ROMERO, C.H.; ZANOCHI, H.G.; AGUIAR, A.A.; ABARACÓN, A.; SILVA, A.G. & ROWE, C.A. Experimental transmission of enzootic bovine leukosis with blood and milk in the tropics. *Pesq. Vet. Bras.* 2 (1): 9-15, 1982.
- ROMERO, C.H.; ABARACÓN, D. ROWE, C.A.; SILVA, A.G. Bovine leukosis virus infectivity in *Boophilus microplus* ticks. *Vet. Rec.* 115 440-441, 1984.
- SANTOS, J.A.; PINHEIRO, P.V. & SILVA, L.J. da. Linfossarcoma com lesões da língua e das câmaras cardíacas em bovinos. *Ah. Esc. Flum. Med. Vet.* 2: 28-35, 1959.
- SAWYER, W.A. & HERMS, W.B. Attempts to transmit poliomyelitis by means of stable fly (*Stomoxys calcitrans*). *J. Am. Med. As.* 61: 461-466, 1913.

- SCHALM, O.W. *Veterinary Hematology*. 2 ed. Ed. Lea & Febiger, Pensilvania, 1965.
- SCHOLTT HAUER, K. Incidence of lymphosarcoma in the ox. *North Am. Vet.* 9: 30-32, 1928. (citado por Bendixen, 1965).
- SCOTT, J. Insect transmission of swamp fever. *Science* 42: 659. 1915.
- SCHÖTTLER, F. & SCHÖTTLER, H. Ueberdie aetiologie and therapie der aleukämischen lymphadenose des rindes. *Berliner tierärztliche Wochenschrift* 50: 497-502, 513-517, 1934. (citado por Bendixen, 1965).
- SIEDAMGROTZK, O. Ueber. Leukaemia bei den haustiere. *Pflug Vorträge fur tierärzte* 10: 393-406, 1878. (citado por Bendixen, 1965).
- STOCK, N.D. & FERRER, J.E. Replicating type C virus in Phytohemagglutinin-treated Buffy coat cultures of Bovine origin. *J. Natl. Cancer Inst.* 48: 985-996, 1972.
- VAN DER MAATEN, M.J.; MILLER, J.M. & BOOTHE, A.D. eplicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle with lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 52 (2): 491-494, 1974.
- VASK, T.R.; GRUNERT, E.; TEIXEIRA, J.D.A.; SIQUEIRA, C.S. & PIANCA, P.A. ocorrência de leucose bovina num rebanho do estado do Rio Grande do Sul. *Rev. Fac. Agron. Vet. Univer. Rio Grande do Sul* 7: 71-79, 1965.

WEBER, A.; BINGAAM, C.; POMEROY, K.; DIAS, E. Enzootic bovine leukosis: prevalence of blood lymphocyte nuclear pockets in dairy bulls in the United States and foreign countries. American J. Vet. Res. 41(1): 14-17, 1980.

## APÊNDICE

## APÊNDICE

### Diluidor de Thoma

Foi utilizado o Diluidor de Thomas para a diluição do sangue periférico dos ovinos em experimentação, para efetuar as contagens mensais de leucócitos.

Constitui-se:

Violeta Genciana	1ml
Acido Acético	2ml
Água destilada	100ml

### Meio de cultura HAM F10-100

Agua destilada em vidro	2000ml
1 pacote de Ham F10	(pó para fazer 1 litro)
1 pacote de 199 com sal de Hank	(pós para fazer 1 litro)
Bicarbonato de Sódio ( $\text{NAHCO}_3$ )	2,6g
Penicilina, estreptomicina	2ml

Depois da mistura preparada, distribuir em garrafas e guardar em geladeira.

## Meio de Cultura RPMI-1640

RPMI 1640	10,4g
Água destilada	1 litro
Bicarbonato de Sódio	1,3g

## May-GRUNWALD-GIEMSA (Panoptico de Pappenheim)

Esse corante consiste de uma mistura de eosinato de azul de metileno e de azul de ensaio, ideais para maior visualização das células sanguíneas (MATOS & MATOS, 1981).

## Solução de May-Grunwald

May-Grunwald - pó	0,2g
Álcool Metálico	100ml

## Solução Giemsa

Giemsa - pó	0,3g
Glicerina	25,0ml
Álcool Metílico - puro	25,0ml

## Tampão para Imunodifusão

NaCL	85,0g
KCl	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
EDTA Dissódico	0,372g
Merthiolate	1:10.000
(Como preservativo, por litro)	

### Acetato de Uranila

Preparar uma solução de Acetato de Uranila ( $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 3% em água destilada.

### Citrato de Chumbo

Nitrato de chumbo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ )	1,33g
Citrato de sódio dihidratado ( $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1,7993g
Água destilada	Aprox. 30ml

Tampar e agitar vigorosamente a solução durante 1 minuto. Agitar brevemente a cada minuto, durante 30 minutos.

Adicionar:

$\text{NaCH}$  (1N - preparada na hora) 8ml

Completar o volume para 50 ml, com água destilada.

Tabela 1. Recuperação do vírus da leucemia bovina de leucócitos no intestino médio de *S. calcitrans* L.

Cor - deiro	Idade (dias)	Nº de môscas	Nº leucó- citos ino- culados	Anticorpos para antígenos do VLB											
				0	1	2	3	4	5	6	12	18	24	36	
051	5	33	$5,6 \times 10^5$	-	-	-	+	+	+	+	+	++	++	++	
052	11	22	$2,1 \times 10^6$	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
053	6	-	-----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
054	8	23	$1,2 \times 10^6$	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
055	18	15	$1,5 \times 10^6$	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
056	15	15	$1,5 \times 10^6$	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
050	24	--	-----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ = Anticorpos para a glicoproteína maior (Gp51) do envelope do VLB

++ = Anticorpos para o polipeptídeo estrutural (p25) do VLB

Tabela 2. Contagem absoluta de linfócitos de cordeiros utilizados no experimento de transmissão do vírus da leucemia bovina com leucócitos recuperados do intestino médio de *S. calcitrans*.

Cor- deiro	Infecta- dos após 20 meses	No. absoluto de linfócitos /mm <sup>3</sup> de sangue																				$\bar{x} \pm EP$
		A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	
Nº		1982										1983										
051	+	1185	3382	5250	4525	4046	3653	3260	4929	4524	3748	4250	2640	4015	2871	4350	2565	2660	1405	2553	2871	3434,2 ± 245,2
052	+	-	2632	2444	3217	4470	4104	3738	4880	4176	3580	4611	3783	4025	4702	4900	2684	2575	3473	3190	2436	3664,3 ± 194,2
054	+	-	1202	2196	2905	4637	4364	4092	7080	3780	2310	5215	4320	2530	2943	2640	2950	1274	2705	2937	3640	3408,3 ± 316,0
055	+	-	1927	3473	4162	4995	4318	3642	4312	3407	3751	6820	4901	4248	4867	5032	2905	3212	3000	4581	2835	4125,7 ± 234,0
056	+	-	2232	2666	5586	5978	4751	3525	3913	2650	4248	4698	3760	3806	3719	3250	3024	2882	2652	2773	3492	3663,5 ± 235,0
																						$\bar{x}$ 3656,6 ± 111,7
053	-	1550	940	3895	5811	4655	4993	5332	6764	2840	5084	5247	2981	3910	3737	2450	3009	2040	3348	2254	3102	3692,6 ± 242,2
050	-	-	-	-	-	3358	3895	4432	4823	4928	6216	5040	2200	4876	3825	2880	2645	2345	1960	3979	4130	3845,8 ± 301,5
																						$\bar{x}$ 3260,7 ± 230,0

Tabela 3. Recuperação do vírus da leucemia bovina de leucócitos obtidos do aparelho bucal de *S. calcitrans* L.

Cor - deiro	Idade (dias)	Nº apa- relhos bucais	Nº leucô- citos ino- culados	Anticorpos para antígenos do VLB									
				Meses									
				0	1	2	3	4	5	6	12	24	
67	60	---	-----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
68	60	108	NC*	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
69	60	100	$5,5 \times 10^4$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
70	60	191	$8,8 \times 10^5$	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
72	60	150	$3,2 \times 10^5$	-	-	-	+		+	+	+	+	
73	30	150	$2,3 \times 10^4$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
82	60	---	-----	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

\* NC = Não contados

+ = Anticorpos para a glicoproteína maior (Gp 51) do envelope do VLB

Tabela 4. Contagem linfocitária absoluta de cordeiros utilizados no experimento de transmissão do vírus da leucemia bovina com leucócitos recuperados do aparelho bucal de *S. calcitrans* L.

Cor - deiro Nº	Infecta- dos apõs 6 meses	No. absoluto de linfõcitos /m <sup>3</sup> de sangue							$\bar{X}$
		1983							
		M	J	J	A	S	O	N	
068	+	3445	2565	2310	1800	2870	1995	3289	2610,6 $\pm$ 237,0
070	+	-	3285	3276	2517	2992	3565	3886	3253,5 $\pm$ 192,3
072	+	4416	3479	2782	3416	2464	3330	2621	3215,5 $\pm$ 252,1
									$\bar{X}$ 3015,5 $\pm$ 144,2
067	-	-	-	2244	1710	2716	2808	3038	2503,2 $\pm$ 236,7
069	-	3500	3075	3445	1849	2184	3416	3078	2935,2 $\pm$ 248,5
073	-	-	2520	2496	1760	1606	2914	3000	2382,6 $\pm$ 237,1
082	-	-	2574	2465	3099	3733	4050	4038	3326,5 $\pm$ 291,8
									$\bar{X}$ 2804,9 $\pm$ 142,6

Tabela 5. Tentativa de transmissão mecânica do VLB

Cor - de:ro	Idade (inī cio do ex perimento) -meses-	No. de Mōscas	Mōscas ingur- gitadas	% Mōscas ingur- gitadas	Tenta tivas	No. de picadas	Resp. so rolōgica	Perīodo de exposiçāo ā <i>S. calcitrans</i>	Perīodo de observaçāo
39	7	90	61	67,7	21	165	negativa	4 meses	36 meses
40	7	42	39	92,8	16	135	negativa	3 meses	36 meses
64	2	174	131	75,2	70	555	negativa	10 meses	30 meses
65	2	166	130	78,3	54	518	negativa	9 meses	30 meses
66	2	133	112	84,2	93	475	negativa	10 meses	30 meses
47	7	-	-	-	-	-	negativa	4 meses	36 meses
62	2	-	-	-	-	-	negativa	10 meses	30 meses

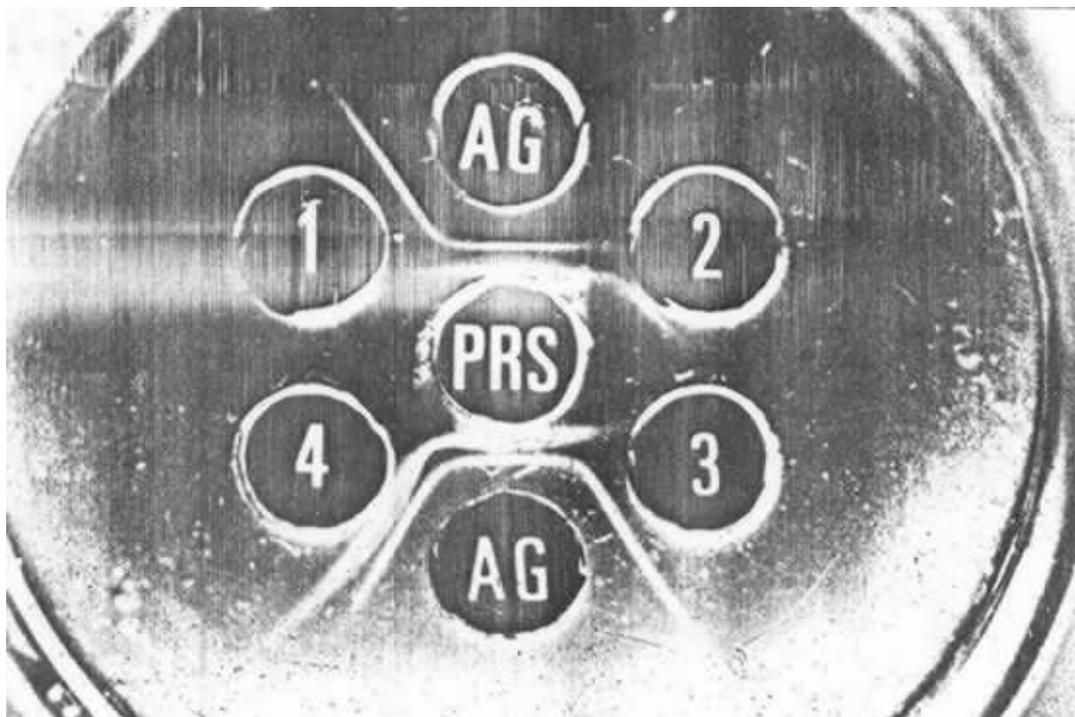


Figura 1 - PRS: Soro de referência padrão

Ag: Antígenos de referência do VLB

- 1: Amostra de soro com anticorpo para glicoproteína maior Gp51, do envelope do VLB
- 2: Amostra de soro negativo para o VLB
- 3: Amostra de soro com anticorpos para glicoproteína maior Gp51, do envelope do VLB
- 4: Amostra de soro com anticorpos para a glicoproteína maior Gp51 do envelope viral a para o polipeptídeo estrutural p25.

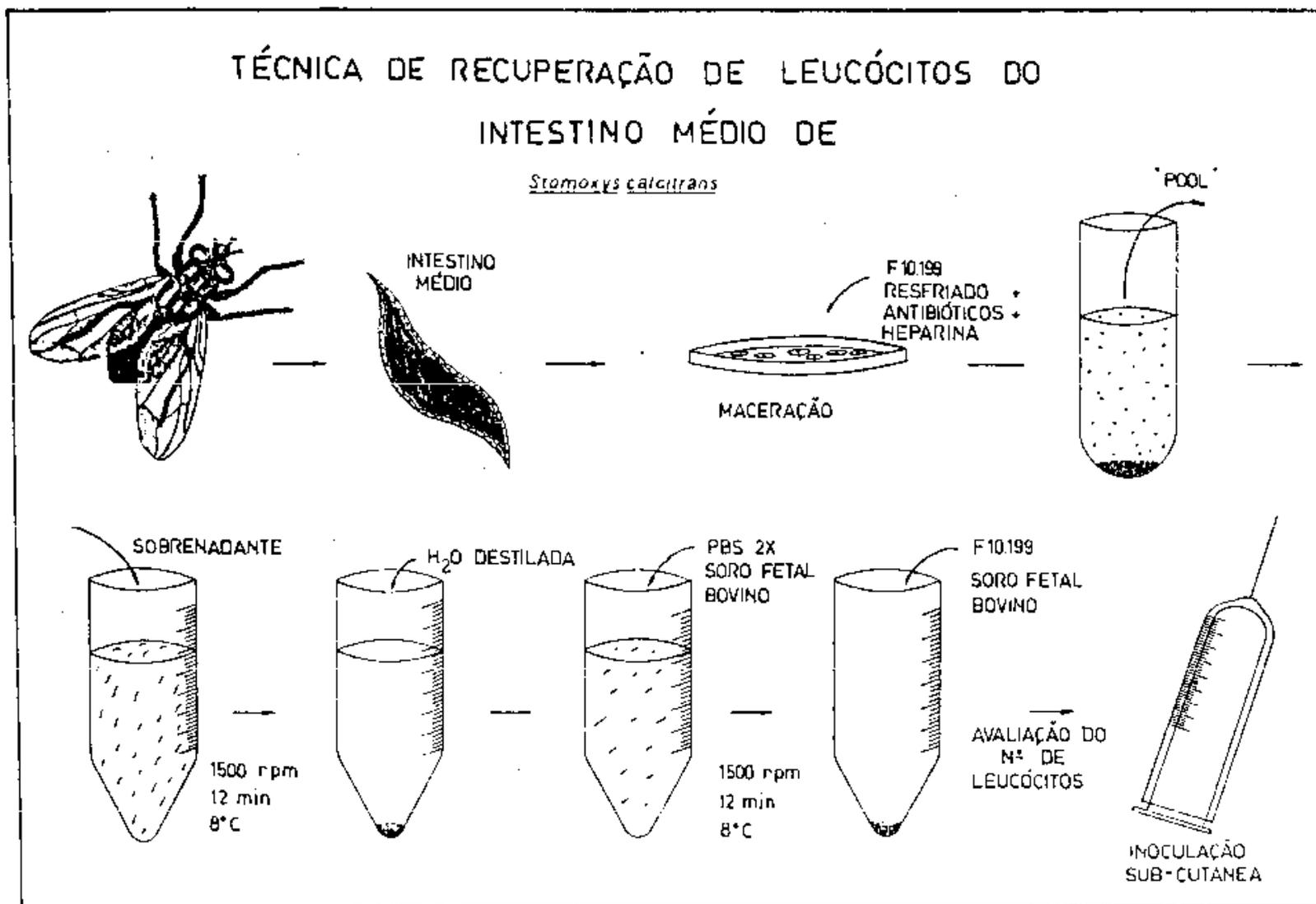


Figura 2. Diagrama demonstrativo da técnica utilizada para recuperação de leucócitos do Intestino médio de *S. calcitrans*.

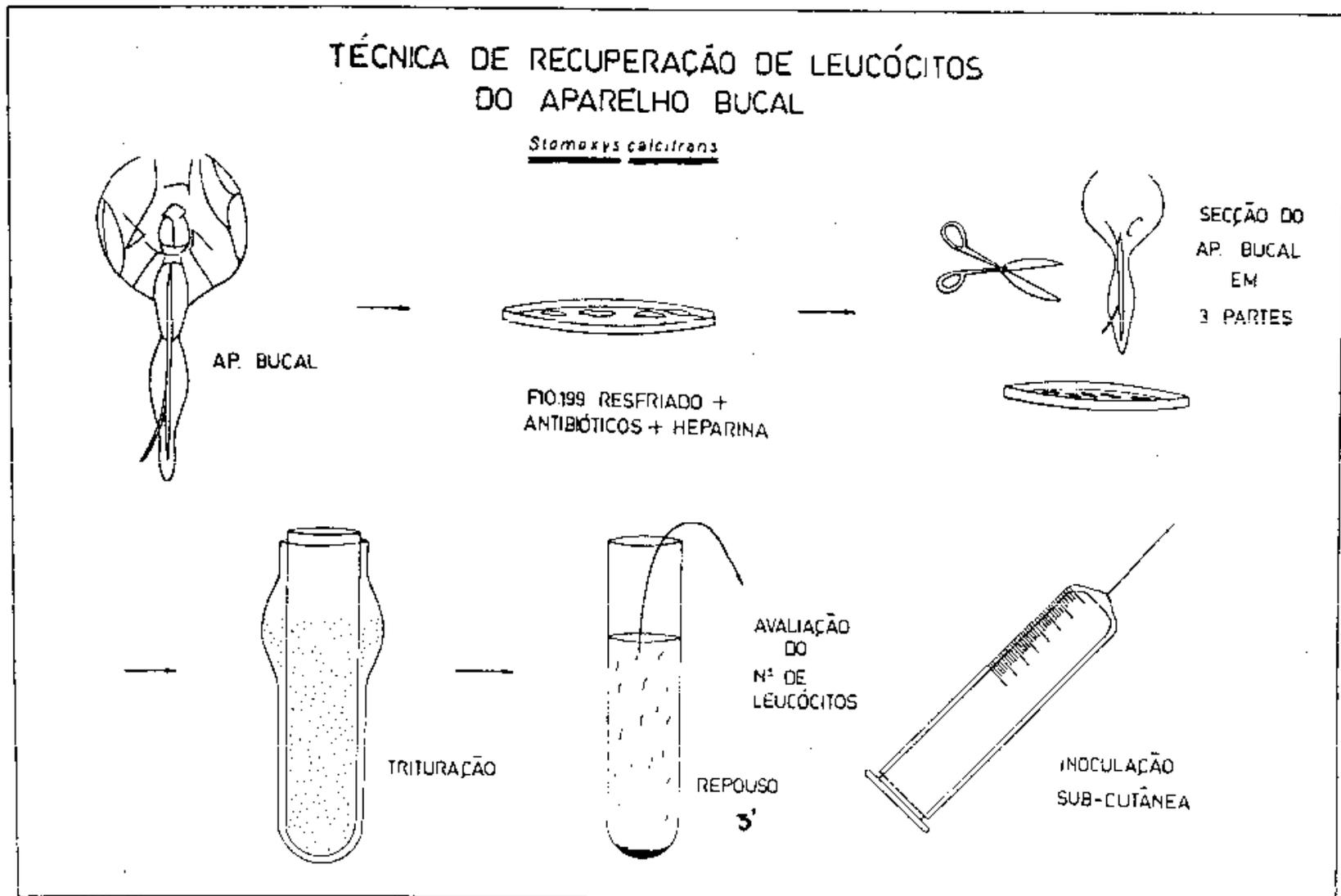


Figura 3. Diagrama demonstrativo da técnica utilizada para recuperação de leucócitos do aparelho bucal de *S. calcitrans*.



Figura 4 - Micrografia eletrônica de cultura de leucócitos (ovino 55) demonstrando partícula viral em vacúolo (aumento 123.000 X).



Figura 5 - Micrografia eletrônica de cultura de leucócitos (ovino 55) demonstrando a presença de células mononucleares com características de linfócitos (aumento 90.000 x).