

# ANTÍGENOS DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA E ANTICORPOS PRECIPITANTES EM SOROS DE BOVINOS<sup>1</sup>

RAYMUNDO G. CUNHA<sup>2</sup>, ADENAUER CRUZ TEIXEIRA<sup>3</sup> e DILMA MOURA DE SOUZA<sup>4</sup>

**RESUMO** - Dois antígenos para diagnóstico da leucose bovina (LB) pela prova de imunodifusão em gel (IDG) foram comparados mediante exame de 117 soros de bovinos: um antígeno duplo, contendo glicoproteína gp 51 e polipeptídios interno p 24/25, e o antígeno Leukassay B, contendo apenas a glicoproteína. Os dois antígenos apresentaram resultados similares. Setecentas e quarenta e seis amostras de soros de bovinos, procedentes de 65 fazendas distribuídas por 20 municípios do Estado do Rio de Janeiro, foram examinadas pela IDG, usando-se, rotineiramente, o antígeno duplo. Apenas 49 soros do município de Petrópolis foram examinados com o antígeno Leukassay B. Duzentos e um soros apresentaram resultado positivo (26,99%), indicativo de infecção pelo vírus da LB, que se mostrou disseminado pelas diferentes microrregiões homogêneas do estado.

Termos para indexação: imunodifusão em gel, antígeno duplo, antígeno Leukassay B, diagnóstico de leucose bovina.

## ANTIGENS OF BOVINE LEUKOSIS VIRUS AND PRECIPITATING ANTIBODIES IN SERA OF CATTLE

**ABSTRACT** - Two antigens for agar gel immunodiffusion (AGID) test in diagnosing Bovine Leukosis Virus (BLV) infection were compared by examination of 117 bovine sera: a dual antigen, containing both glycoprotein gp 51 and internal polypeptide p 24/25 and the Leukassay B antigen that contains only the glycoprotein. Similar results were shown by both antigens. Seven hundred and forty six bovine serum samples, collected in 65 farms of 20 counties of Rio de Janeiro State, were examined by AGID test, using routinely the dual antigen. Only 49 sera from Petropolis county were checked with Leukassay B antigen. Two hundred and one sera showed positive reactions (26.99%), indicative of BLV infection which appeared well disseminated among cattle from different regions of the State.

Index terms: dual antigen, Leukassay B antigen, Agar gel immunodiffusion (AGID) test, bovine sera diagnosis of bovine leucosis.

## INTRODUÇÃO

Leucose bovina, linfossarcoma, leucemia, leucemia linfática, linfoblastoma, linfomatose e linfocitose persistente são designações hoje aceitas para descrever diferentes tipos de reação de bovídeos ao vírus da leucose bovina (Burny et al. 1978, Ferrer 1980). A leucose bovina (LB), ou, mais precisamente, leucose bovina enzoótica (LBE), possui uma distribuição geográfica cosmopolita, tendo sido registrada em vários países da Europa, Israel, Tunísia, África do Sul, Austrália, Japão, Canadá,

Estados Unidos da América, Venezuela e Chile (Burny et al. 1980, Ebert & Wittwer 1974, Ferrer 1980, Lombard 1968 e Marin et al. 1978).

A LB, registrada pela primeira vez por Bollinger (1874), difundiu-se na Europa, sobretudo depois da II Guerra Mundial (Bendixen 1970, Burny et al. 1980 e Ferrer 1980). No início, identificada pelas lesões e sinais clínicos, teve seu diagnóstico facilitado com a adoção dos exames hematológicos que resultaram no estabelecimento das conhecidas chaves leucósicas (Bendixen 1970, Goetze et al. 1953, Marshak 1968 e Mammerrickx et al. 1978), permitindo o reconhecimento precoce da doença. Com os novos conhecimentos sobre a LB, o esclarecimento de sua etiologia (Dutcher et al. 1964, Dutcher et al. 1967, Dutla et al. 1970, Ferrer et al. 1971, Malmquist et al. 1969, Miller et al. 1969 e Maaten et al. 1974) e o estudo físico-químico do vírus responsável (Burny et al. 1978 e 1980, Ferrer 1980 e Mussgay & Kaaden 1978), foi possível a introdução de provas sorológicas para verificação dos anticorpos específicos e conseqüente reconhe-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 21 de julho de 1982.

Trabalho realizado no Lab. de Biol. Animal da PESAGRO-RIO, Alameda São Boaventura, 770 - Fonseca, Niterói, RJ.

<sup>2</sup> Méd. Vet., Prof. Titular de Doenças Infecciosas, Fac. de Vet. da Universidade Federal Fluminense (UFF), Bolsista do CNPq e Consultor da PESAGRO-RIO. (Aposentado).

<sup>3</sup> Méd. Vet., Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro - (PESAGRO), Alameda São Boaventura, 770 - CEP 24000, Niterói, RJ.

<sup>4</sup> Méd. Vet. do LANARA-MA.

cimento da infecção (Malmquist et al. 1969, Miller & Olson 1972 e Onuma et al. 1975). Entre estas provas, a soroprecipitação, ou imunodifusão em gel (IDG), vem sendo aplicada em larga escala devido a sua fácil execução, sensibilidade e especificidade (Burny et al. 1978, House et al. 1977, Mitscherlich et al. 1976, Olson et al. 1973 e Phillips et al. 1978). Vários tipos de antígenos, caracterizados por seu conteúdo em polipeptídios ou glicoproteínas, foram estudados e os melhores resultados foram obtidos, quando se empregou antígeno contendo a glicoproteína de 45 a 50 ou de 60 a 70 quilodáltons, hoje identificada como gp 51 (Burny et al. 1978 e 1980 e Mussgay & Kaaden 1978).

No Brasil, o primeiro registro de linfossarcoma em bovino deve-se a Rangel & Machado (1943), que consignaram quatro casos, sendo dois de baço, um de coração e um de gânglio. Merkt et al. (1959) publicaram, no Rio Grande do Sul, a observação clínica de leucose em um bovino, confirmada por achados histopatológicos, e empregaram, pela primeira vez entre nós, o exame hematológico para reconhecimento da doença. Entre 140 animais examinados, foram encontrados 12 (8,6%) positivos e 22 (15,7%) suspeitos. Santos et al. (1959) registraram a doença em Nova Friburgo, Rio de Janeiro, descrevendo o caso de uma vaca importada da Suécia, com infarto ganglionar e exoftalmia. Os exames histológicos permitiram o diagnóstico de linfossarcoma. Dacorso Filho et al. (1966/67) descrevem quatro novos casos com base em achados de necrópsia e lesões histopatológicas; em um dos casos, foi notada exoftalmia e aumento ganglionar. Machado et al. (1963), num levantamento de blastomas por todo o Brasil, registraram 17 casos de linfossarcoma e 12 casos de leucose linfóide em bovinos. Ao trabalho de Merkt et al. (1959), seguiram-se outros consignando dados clínicos, hematológicos e histopatológicos, como os de Vaske et al. (1965) no Rio Grande do Sul, Freire & Freitas (1966), no Estado do Rio de Janeiro, Cavalcante et al. (1969), em Pernambuco, Alencar Filho (1970) e Alencar Filho et al. (1975), em São Paulo, e Muchaluat (1971) em Minas Gerais. Alencar Filho et al. (1979) realizaram um levantamento da infecção pelo vírus da LB em São

Paulo, utilizando a prova de imunodifusão em gel (IDG). De 1.013 soros examinados, 361 (35,6%) apresentaram resultados positivos. Romero & Rowe (1981), utilizando a mesma técnica, examinaram 1.444 soros de doze propriedades de exploração leiteira do Estado do Rio de Janeiro, encontrando 769 (53,25%) reações positivas.

No presente trabalho, apresentam-se os resultados obtidos com o emprego de dois antígenos para a prova de IDG ou soroprecipitação em gel e os resultados dos exames de soros de bovinos, coletados em 20 municípios do Estado do Rio de Janeiro.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 746 soros de bovinos, sendo a quase totalidade de fêmeas mestiças de Holandês x Zebu, acima de dois anos e meio de idade. Um lote de oito soros procedia de bezerros com cerca de oito meses. Estes soros foram coletados em 65 fazendas, distribuídas por 20 municípios do Estado do Rio de Janeiro. Os bovinos eram sangrados por punção da jugular e o sangue transportado ao laboratório, em condições de refrigeração, após coagulação e dessoramento. No laboratório, cada soro era clarificado por centrifugação, sendo o sobrenadante retirado para outro vidro e conservado a - 20°C até ser testado. Soros de doze municípios foram coletados para estudos bioquímicos, em 1979 e 1980. Os dos municípios de Itaguaí, Nova Friburgo, Petrópolis, Teresópolis, Angra dos Reis, Rio Bonito, Campos e São João da Barra foram obtidos em 1981 para o fim especial deste trabalho (Tabela 1).

Os soros foram examinados sem diluição e sem aquecimento prévio; além do soro dos bovinos em estudo, empregaram-se soros positivos conhecidos.

Utilizaram-se dois tipos de antígeno:

- a. antígeno elaborado no Brasil, contendo glicoproteína 45/55, hoje designada gp 51 (Burny et al. 1980), e polipeptídio interno P 24/25 (Romero & Rowe 1981), que passou a ser chamado de antígeno duplo;
- b. antígeno "Leukassay B" (Pittman-Moore, Inc.), importado dos Estados Unidos, contendo apenas a glicoproteína.

Ambos os antígenos provinham de cultivo do vírus em células de linhagem ovina. O antígeno duplo foi recebido congelado e o Leukassay B, liofilizado.

#### Prova de imunodifusão em gel (IDG)

Com o antígeno duplo utilizou-se Agar Noble (Difco) a 0,7% em solução tampão de pH 7,3 contendo NaCl-1,45 M, KCl 0,003 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,008 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0015 M e EDTA (disódio) 0,001 M. Para cada 1.000 ml agregava-se 0,1 g de azida sódica.

TABELA 1. Resultados dos exames de soros de bovinos em municípios de diferentes microrregiões homogêneas (MRH) do Rio de Janeiro, pela prova de imunodifusão em gel para leucose bovina.

MRH	Municípios	Fazendas	Nº de soros examinados	Nº de soros positivos	% de positivos nos municípios
213	Campos	A	17	07	25,64
		B	22	03	
	São João da Barra	A	16	08	50,00
214	Itaocara	A	10	01	18,42
		B	10	02	
		C	10	00	
		D	08	04	
	Carmo	A	06	00	9,37
		B	08	01	
		C	09	01	
		D	09	01	
	Cantagalo	A	10	01	13,04
		B	10	03	
		B	08	00	
		C	36	08	
		D	51	03	
215	Três Rios	A	10	03	43,33
		B	10	04	
		C	10	06	
216	São Sebastião do Alto	A	09	01	23,07
		B	09	02	
		C	08	03	
	Santa Maria Madalena	A	10	01	10,25
		B	10	00	
		C	10	01	
		D	09	02	
	Trajano de Moraes	A	10	03	47,50
		B	10	03	
		C	10	04	
		D	10	09	
217	Resende	A	09	07	35,08
		B	09	05	
		C	09	05	
		D	10	01	
		E	10	00	
		F	10	02	
	Barra do Piraj	A	10	00	00
		B	10	00	
		C	10	00	

TABELA 1. Continuação.

MRH	Municípios	Fazendas	Nº de soros examinados	Nº de soros positivos	% de positivos nos municípios
218	Nova Friburgo	A	07	02	42,85
		B	07	04	
	Teresópolis	A	07	03	28,57
		B	07	03	
		C	07	00	
	Petrópolis	A	09	03	24,48
		B	10	05	
		C	10	00	
		D	10	03	
		E	10	01	
219	Piraí	A	10	04	25,00
		B	10	01	
	Vassouras	A	10	02	38,00
		B	10	04	
		C	10	02	
		D	10	06	
		E	10	05	
	Rio Claro	A	10	02	30,00
		B	10	04	
	220	Rio Bonito	A	20	08
B			15	14	
221	Itaguaí	A	10	00	19,60
		B	11	02	
		C	10	00	
		D	10	06	
		E	10	02	
223	Angra dos Reis	A	24	10	41,66
Totais		65	746	201	26,99

B \* Animais com cerca de oito meses de idade.

A mistura era aquecida em banho-maria até completa diluição e, ainda quente, distribuída em volume de 100 ml, em frascos estéreis. Quando esfriada, era guardada em geladeira até ser usada dentro de quatro semanas. No dia da realização da prova, o ágar era aquecido em banho-maria até completa transparência e esfriado a 50-56°C para ser pipetado em placa-de-petri, na proporção de 6 ml para cada placa de 5 cm de diâmetro. As placas eram deixadas à temperatura ambiente, com a tampa ligeiramente

levantada, para completo resfriamento. Usando-se um cortador apropriado, estabelecia-se em cada placa um conjunto de sete furos, um central e seis em volta. Com pipeta ligada a vácuo, retirava-se o ágar de cada perfuração, ficando um pequeno orifício. Cada orifício tinha 6 mm de diâmetro e distava 3 mm um do outro. No orifício central, depositava-se soro positivo conhecido; nos orifícios acima e abaixo, antígeno; e nos quatro orifícios restantes, soros em exame (Fig. 1). As placas eram incubadas em câmara

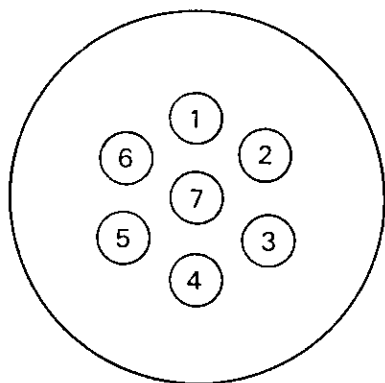


FIG. 1. IDG - antígeno duplo - distribuição dos reagentes.

- 1.4 = Antígeno  
2.3.5.6 = Soros desconhecidos  
7 = Soro padrão positivo.

seca, à temperatura ambiente, e a leitura final feita 72 horas após a distribuição dos reagentes. Leituras intermediárias de 24 e 48 horas eram anotadas.

Quando se utilizou o antígeno Leukassay B, foram seguidas as indicações que acompanham o reagente. Para o preparo de Agar Noble a 0,7%, empregou-se solução tampão de pH 8,6 preparada juntando-se, a um litro de água destilada, 2 g de NaOH, 70 g de NaCl e 9 g de  $H_3BO_3$ .

O ágar fervido até completa dissolução, quando atingia 50-56°C, era distribuído em placas de 90 mm, na proporção de 14 ml por placa.

Com o cortador já referido, estabeleciam-se, em cada placa, quatro moldes, com sete orifícios cada. Em cada molde, o orifício central recebia o antígeno; em seguida, três dos orifícios circundantes, alternadamente, eram ocupados por soro em exame, um em cada orifício; nos três orifícios restantes, colocava-se soro positivo conhecido. Em cada placa, um molde era usado para controle de reagentes: antígeno, soro positivo, soro fracamente positivo e soro negativo (Fig. 2).

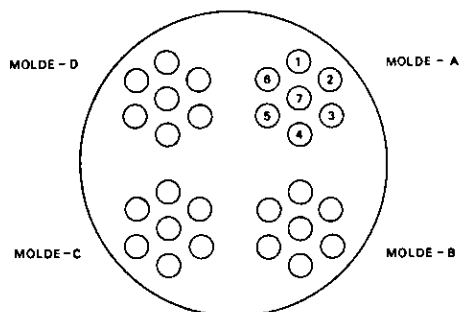


FIG. 2. IDG - antígeno Leukassay B - distribuição dos reagentes.

- 1.3.5. = Soro padrão positivo  
2.4.6. = Soros desconhecidos  
7 = Antígeno.

Após a leitura final de 72 horas, os soros em exame eram considerados:

- negativo - nenhuma linha de precipitação entre os soros em exame e o antígeno. As linhas de precipitação do soro positivo (antígeno duplo) ou dos soros positivos (antígeno Leukassay) tocam ou se aproximam do orifício com soro negativo;
- fracamente positivo - linha do soro positivo apresenta ligeira curvatura junto ao soro em exame, ou pequena linha com formação tardia entre o soro em exame e o antígeno duplo, ou as linhas dos soros positivos conhecidos sofrem curvatura ao se aproximarem do orifício com soro em exame (antígeno Leukassay);
- positivo - linha de precipitação entre o soro em exame e o antígeno.

Os resultados fracamente positivos, quando não especificados, foram considerados como positivos.

#### Comparação entre os dois antígenos

Cento e dezessete soros foram examinados, comparativamente, com os dois antígenos, em suas metodologias respectivas.

#### Exame de soros de bovinos pela IDG

A verificação de anticorpos precipitantes foi levada a efeito pela prova de IDG. Foram examinados 697 soros com o antígeno duplo, incluindo os 117 do estudo comparativo. Apenas 49 soros, do município de Petrópolis, foram testados exclusivamente com o antígeno Leukassay B.

#### RESULTADOS

##### Comparação entre antígenos

Cento e dezessete soros foram examinados, comparativamente, pelos dois antígenos já descritos, respeitadas suas peculiaridades de distribuição, apresentando concordância de resultados no que diz respeito à positividade e negatividade. Na graduação de fracamente positivo, observou-se ligeira divergência, conforme a Tabela 2. De 59 soros positivos com antígeno duplo, 45 deram o mesmo resultado com Leukassay B e 14 foram fracamente positivos. De 18 soros fracamente positivos com antígeno duplo, 14 mostraram resultado idêntico com Leukassay B e quatro foram positivos. Quarenta soros revelaram-se negativos com ambos os antígenos.

##### Exame de soro de bovinos pela prova de IDG

Setecentos e quarenta e seis soros de bovinos, incluídos os 117 já mencionados, foram examina-

TABELA 2. Resultado do exame comparativo de 117 soros pela prova de imunodifusão para leucose bovina com dois antígenos em estudo.

Antígeno duplo		Antígeno Leukassay-B	
Resultado	Nº de soros	Resultado	Nº de soros
Positivo	59	Positivo	45
		Fracamente positivo	14
Fracamente positivo	18	Positivo	04
		Fracamente positivo	14
Negativo	40	Negativo	40

dos pela IDG. Os resultados obtidos figuram na Tabela 1, onde os municípios foram citados pelas suas respectivas microrregiões homogêneas (Fundação IBGE 1974). Duzentos e um apresentaram resultado positivo, ou seja, 26,99%. Examinando-se os resultados por fazenda, verificou-se que a proporção de positividade variou de zero a 93,33%. A comparação por município resultou numa variação de zero a 62,86% (Tabela 1).

#### DISCUSSÃO

Ambos os antígenos usados no presente trabalho continham a glicoproteína viral. Na comparação levada a efeito entre eles, com o exame de 117 soros, verificou-se coincidência de resultados no que diz respeito a positividade ou negatividade. Uma ligeira discrepância anotada na qualificação fracamente positivo não afeta o julgamento do animal. Quando se ensaiaram comparativamente os sistemas de distribuição dos reagentes, os autores tiveram a impressão de que a distribuição alternada (Leukassay) nos soros fracamente positivos proporciona uma leitura mais fácil e segura, pois a pequena curvatura da linha, observada de um lado, é confirmada por observação idêntica do outro, servindo de comparação e de confirmação.

A especificidade, eficácia e sensibilidade da prova de IDG são reconhecidas por vários pesquisadores (Burny et al. 1978 e 1980, Ferrer 1980 e Mussgay & Kaaden 1978). O seu valor prático pode ser confirmado pela observação de que, no Brasil, até 1978, haviam sido diagnosticados cerca de 190 casos de LB; com a introdução da IDG, em 1979, já foram examinados 2.457 soros com

1.130 resultados positivos (Alencar Filho et al. 1979 e Romero & Rowe 1981). A estes números, somam-se os resultados do presente trabalho, com 746 soros examinados dos quais 201 mostram reação positiva. A variação anotada entre fazendas, de zero a 93,33%, concorda com observações prévias (Alencar Filho et al. 1979, House et al. 1977, Mitscherlich et al. 1976 e Onuma et al. 1975) e enquadra-se no conceito epizootiológico de que a LB deve ser considerada como uma doença do rebanho. A negatividade de um município decorre, muito provavelmente, do reduzido número de soros examinados dele procedentes.

Os resultados do presente trabalho, indicando uma percentagem de 26,99% de reações positivas, estão mais próximos dos de Alencar Filho et al. (1979) que encontraram 35,6% de reagentes, no Estado de São Paulo. O percentual mais alto (53,25%), registrado por Romero & Rowe (1981), talvez se deva ao sistema de criação dos animais testados ou ao simples acaso.

Convém registrar que estes resultados indicam apenas a percentagem de animais infectados com o vírus da LB e é aceito que menos de 10% chegam a desenvolver uma forma clínica da doença: linfossarcoma ou linfocitose persistente.

#### CONCLUSÕES

1. Ambos os antígenos testados forneceram, praticamente, os mesmos resultados.
2. Dos 746 soros de bovinos examinados, 201 (26,99%) mostraram possuir anticorpos precipitantes para o vírus da LB, indicando uma ampla difusão deste vírus entre a população bovina do Estado do Rio de Janeiro.

3. A alta variação de positividade (de zero a 93,33%), encontrada entre as fazendas, é própria de epizootiologia da LB.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos H. Romero, da EMBRAPA-MA, pela gentileza de proporcionar o antígeno duplo, sem o que este trabalho não teria sido realizado; ao Dr. Domingos I. Pinkosky, Diretor do LANARA, pelo interesse na importação do antígeno "Leukassay-B" e ao Dr. Ricardo Pohl, do Laboratório Johnson & Johnson, pelo fornecimento; ao Dr. José Diocleciano Peixoto, pela obtenção dos soros nos municípios de Itaguaí, Nova Friburgo, Teresópolis e Petrópolis; ao Técnico de Laboratório Walter Moreno Gonçalves, pela colaboração no preparo do material utilizado.

#### REFERÊNCIAS

- ALENCAR FILHO, R.A. Linfadenose aleucêmica em bovinos. *O Biológico*, São Paulo, 36:209-12, 1970.
- 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.
- ALENCAR FILHO, R.A.; MAZANTI, M.T.; SAAD, A.D. & POHL, R. Levantamento preliminar da infecção pelo vírus da leucose linfática crônica (L.L.C.) dos bovinos no Estado de São Paulo. *O Biológico*, São Paulo, 45:47-54, 1979.
- BENDIXEN, H.J. Leukosis. In: GIBBONS, W.J.; CATTOTT, E.J. & SMITHCORS, J.F., ed. *Bovine medicine & surgery*. Amer. Vet. Publ., 1970. p.547-60.
- BOLLINGER, O. Ueber Leukaemie bei den haustieren. *Virchow Arch.*, 59:341-9, 1874.
- BURNY, A.; ABEX, F.; CHANTRENNE, H.; CLEUTER, Y. & DEKEGEL, Y. Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. *Adv. Cancer Res.*, 28:251-311, 1978.
- BURNY, A.; BRUCK, C.; CHANTRENNE, H.; CLEUTER, Y.; DEKEGEL, D.; GHYSDAEL, J.; KETTMANN, R.; LECLERCG, M.; LEUNEN, J.; MAMMERICKX, M. & POTELLE, D. Bovine leukemia virus: molecular biology and epidemiology. In: KLEIN, G., ed. *Viral oncology*. s.l., Raven Press, 1980. p.231-89.
- CAVALCANTE, M.I.; BARRETO, S.C.P. & COSTA FILHO, A. da. Sobre a ocorrência da leucose bovina no Estado de Pernambuco. *Pesq. agropec. bras.*, 4: 225-7, 1969.
- DACORSO FILHO, P.; LANGENEGGER, J.; FARIA, J.F. de & AGUIAR, A.A. Casos de leucose bovina no Estado do Rio de Janeiro. *Veterinária*, Rio de Janeiro, 19:44-53, 1966/67. Trabalho apresentado no VII Congresso Bras. Vet. 1962.
- DUTCHER, R.M.; LARKIN, E.P. & MARSHAK, R.R. Virus-like particles in cow's milk from a herd with a high incidence of lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 33:1055-64, 1964.
- DUTCHER, R.M.; LARKIN, E.P.; TUMILOWICZ, J.J.; NAZERIAN, K.; EUSEBIO, C.P.; STOK, N.D.; GUEST, G.B. & MARSHAK, R.R. Evidence in support of a virus etiology for bovine leukemia. *Cancer*, 20:851-6, 1967.
- DUTLA, S.K.; LARSON, V.L.; SORENSEN, D.K.; PERMAN, A.; WEBER, A.F.; HAMMER, R.F. & SHOPE, R.E. Isolation of C-type virus particles from leukemic and lymphocytotic cattle. *Comp. Leuk. Res. Bibl. Haemat.*, 36:547-54, 1970.
- EBERT, J. von & WITTEW, F. Betrachtungen über die enzootische leucose des Rindes in Chile. *Dtsch. Tierartl. Wschr.*, 81:579-80, 1974.
- FERRER, J.F. Bovine lymphosarcoma. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 24:1-68, New York, 1980.
- FERRER, J.F.; STOCK, N.D. & PECK-SUN LIN. Detection of replicating C-type viruses in continuous cell cultures established from cows with leukemia: effect of the culture medium. *J. Natl. Cancer Inst.*, 47: 613-21, 1971.
- FREIRE, M.H. da R. & FREITAS, V.M. Constatación de la leucose bovina dans l'État de Rio de Janeiro, Brésil. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 66:775-82, 1966.
- FUNDAÇÃO IBGE. Rio de Janeiro, RJ. Censo agropecuário Rio de Janeiro; VIII recenseamento geral 1970. Rio de Janeiro, 1974. 333p.
- GOETZE, R.; ZIEGENHAGEN, G. & MERKT, H. Zur Diagnose der Leukose des Rind. *Mhefte Tierhk.*, 5: 202-11, 1953.
- HOUSE, C.; HOUSE, J.A. & GLOVER, F.L. Antibodies to the glycoprotein antigen of bovine leukemia virus in the cattle population of five states. *Cornell Vet.*, 67:510-22, 1977.
- LOMBARD, C. Les leucoses animales. s.l., Inst. Nation. de la Rech. Agron., 1968, 1v, 215p.
- MAATEN, M.J. van der; MILLER, J.M. & ROOTHE, A.D. Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle with lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 52:491-7, 1974.
- 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.; DOBEREINER, J.; FARIA, J.F.; NOVLOSKI, G. & PEREIRA, E.F.C. Incidência de blastomas em animais no Brasil. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais*, 15:327-401, 1963.
- MALMQUIST, W.A.; MAATEN, M.J. van der & BOOTHE, A.D. Isolation, immunodiffusion, immunofluorescence and electron microscopy of a syncytial virus of lymphosarcomatous and apparently normal cattle. *Cancer Res.*, 29:188-200, 1969.

- MAMMERICKX, M.; LORENZ, R.J.; STRAMB, O.C.; DONNELLY, J.C.; FLENSBURG, J.C.; GENTILE, G.; MARKSON, L.M.; RESSANG, A.A. & TAYLOR, S.M. Bovine hematology. III. Comparative breed studies on the leukocyte parameters of several European cattle breeds as determined in the common reference laboratory. *Zbl. Vet. Med. B*, 25: 257-67, 1978.
- MARIN, C.; LOPEZ, N.; LOZANO, O.; PABENCIA, L.; ESPAÑA, W.; CASTANOS, H. & LEON, A. Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. *Ann. Rech. Vet.*, 9:743-6, 1978.
- MARSHAK, R.R. Criteria for the determination of the normal and leukotic state in cattle. *J. Natl. Cancer Inst.*, 41:243-51, 1968.
- MERKT, H.; GIUDICE, J.C.O. & MÜLLER, J.A. Leucose bovina. *Rev. Esc. Agron. Vet. Univ. Rio G. Sul.*, 2:7-27, 1959.
- MILLER, J.M.; MILLER, L.D.; OLSON, C. & GILLETTE, K.G. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 43: 1297-305, 1969.
- MILLER, J.M. & OLSON, C. Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 49:1459-62, 1972.
- MITSCHERLICH, E.; PLÜNNECKE, A.; SCHMIDT, F.W. & ALBRECHT, A. Techniques and results of immunodiffusion test in field trials. *Vet. Microbiol.*, 1:219-30, 1976.
- MUCHALUAT, M.A. Leucose bovina em um rebanho de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais*, 23:321-8, 1971.
- MUSSGAY, M. & KAADEN, O.R. Progress in studies on the etiology and serologic diagnosis of enzootic bovine leucosis. In: *CURRENT topics in microbiology and immunology*. Berlin, Springer-Verlag, 1978. v.79, p.43-72.
- ONUMA, M.; OLSON, C.; BAUMGARTENER, L.E. & PEARSON, L.D. An ethersensitive antigen associated with bovine leukemia virus infection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55:1155-8, 1975.
- OLSON, C.; HOSS, H.E.; MILLER, J.M. & BAUMGARTENER, L.E. Evidence of bovine C-type (Leukemia) virus in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 163:355-7, 1973.
- PHILLIPS, M.; MILLER, J.M. & MAATEN, J. van der. Isolation of a precipitating glycoprotein antigen from cell cultures persistently infected with bovine leukemia virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, 60:213-7, 1978.
- RANGEL, M.M. & MACHADO, A.V. Contribuição à 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 M. Gerais*, 1:83-96, 1943.
- ROMERO, C.H. & ROWE, C. Enzootic bovine leucosis virus in Brazil. *Trop. Anim. & Hlth. Prod.*, 13:107-11, 1981.
- SANTOS, J.A.; PINHEIRO, P.V. & SILVA, L.J. da. Linfossarcoma com lesões da língua e das câmaras cardíacas em bovino. *An. Esc. Flum. Med. Vet.*, 2: 28-35, 1959.
- VASKE, T.R.; GRUNERT, E.; TEIXEIRA, J.S.A.; SIQUEIRA, C.S. & PIANCA, P. A ocorrência de leucose bovina num rebanho do Estado do Rio Grande do Sul. *Rev. Fac. Agron. Vet. Univ. Rio G. Sul, Porto Alegre*, 7:71-9, 1965.