

## Contribuição para o estudo do diagnóstico de Leucemia bovina.\*

*Édimo Garcia de Lima \**

---

### RESUMO

Foi aplicada a reação de imunofluorescência para o diagnóstico de leucemia bovina, (LB) quando se experimentaram soros de coelhos inoculados com material suposto conter antígeno de leucemia bovina. Foram usados neste trabalho antígenos de leucócitos obtidos do sangue de bovinos doentes com leucemia, de leucócitos não cultivados e de leucócitos submetidos à cultura.

Os resultados demonstraram que somente o material de leucócitos cultivados possui a capacidade de induzir a produção de anticorpos. Os soros dos animais imunizados com material suposto conter partículas virais foram capazes de produzir reações de fluorescência com o anti-soro de cabra, conjugado com isotiocianato de fluoresceína.

Boa fluorescência foi verificada no âmbito celular, onde foram vistos uma "poeira fluorescente", assim como "grânulos fluorescentes", que chegaram a medir 0,8 micron em seu maior diâmetro.

Na tentativa de introduzir a microscopia eletrônica como meio de diagnóstico da LB, foram experimentadas, com a finalidade de serem evidenciadas, as partículas virais que pudessem caracterizar a LB.

Outro método empregado foi a precipitação, em que foram usados dois antígenos produzidos de culturas de leucócitos de animais leucêmicos. Na preparação dos antígenos foram usados: o polietilenoglicol 6.000 e o TWEEN 80, respectivamente. Com estes antígenos foram obtidas faixas de precipitação muito nítidas. Para contrastar as faixas de precipitação incluiu-se ao agar fundido o alaranjado de metila.

Ainda procurou-se empregar com a finalidade de diagnóstico o teste de imunoaderência que se mostrou ineficiente nas condições experimentais empregadas.

Descreveu-se ainda a pesquisa da fração da imunoglobulina M, que não estaria presente nos soros de animais leucêmicos, como descreveram Trainin & col. (1968). Pensou-se que a ausência daquela fração, se demonstrada pela imunoelectroforese, poderia abrir novo caminho para o diagnóstico da LB. O autor, entretanto, encontrou aquela imunoglobulina em todos os soros dos animais examinados: sadios e doentes com leucemia.

Foram levadas em consideração as observações clínicas e hematológicas dos animais empregados neste trabalho para melhor poder avaliar o estudo da LB.

---

### INTRODUÇÃO

A leucemia bovina é uma

doença dos sistemas linfático e reticulohistiocitário e está disseminada em vários países da Europa, como

---

\* Prof. Assistente do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

na Alemanha Ocidental, Alemanha Oriental, Polônia, Suécia, Bulgária, Romênia e França, onde é endêmica. Na América do Sul é endêmica no Uruguai e Argentina.

Belf (1965), estudando rebanhos intensamente infectados, verificou não existir obrigatoriamente relações de alteração entre exames hematológicos positivos e mudanças fisiológicas do animal infectado como: produção de leite, engorda e mesmo reprodução.

Alterações hematológicas como a persistência da linfocitose são, até nossos dias, tomadas como diagnóstico da leucemia bovina (LB).

Muitas vezes são encontrados animais com exames hematológicos negativos ou mesmo duvidosos mas com tumores característicos. Estes animais em contato com outros de rebanhos tidos como sadios, podem transmitir a leucemia dentro de quatro a oito anos.

Observações diversas têm mostrado que o contágio pode ser através do contato de animal com animal, da cópula, da amamentação em vacas contaminadas, do próprio homem, servindo como vetor e também como via diaplacentária.

A transmissibilidade da LB, através do leite, foi provada por Rosenberg (1961), e comprovada por Bederke & col. (1970) e também por Straub & Wheinhold (1971). A transmissão através da cópula foi estudada por Fortner (1964). A contaminação pelo contato direto de animal foi estudada por Wiesner (1961) quando colocou em estábulo, de modo alternado, animais sadios e portadores de leucemia. A via diaplacentária foi verificada por Berderke, Tolle & Schmidt (1968)

Levando-se em consideração a

transmissibilidade por esses meios é de se supor um agente etiológico que poderia ser do tipo viral a ser incriminado. Ueberschaer(1963) foi o primeiro pesquisador a tentar demonstrar o agente etiológico da LB. Também tentaram Schmidt Ueberschaer & Tiefenau(1970); Olson, Miller, Miller & Gillette(1970) e Wittman & Solisch (1972).

Tolle (1966) empregou a reação de imunofluorescência com a finalidade de detectar antígeno ou partículas virais específicas em material proveniente de animal leucêmico, principalmente de elementos figurados do sangue. Por esta técnica encontrou antígenos associados a leucemia em leucócitos de esfregaços de sangue bovino doente com leucemia.

Trainin & Klopfer (1971) tentaram estabelecer e associar o papel da IgM circulante na leucemia bovina, através da imunofluorescência usando células de nódulos linfáticos e de baço de animais com leucemia.

Tem-se estudado a possibilidade de se detectar a presença de partículas virais em sangue de animais, através da microscopia eletrônica. Paulsen & col (1972), conseguiram partículas virais da cultura de leucócitos de carneiro estimulados pela fitohemaglutinina (PHA). Partículas semelhantes têm sido demonstradas no rato (Chopra, Woodside & Bagden, 1970), no hamster (Stenback, Hooster & Trentin, 1968), na cobra (Gilden & col, 1970), no macaco (Kawakami & col, 1972) e em linhagens de células humanas (Prior & col, 1971).

Com o objetivo de empregar novos métodos de diagnóstico para a LB produzimos um antígeno específico que foi usado no teste de precipitação. A idéia de sua prepa-

ração partiu do conhecimento de que são encontradas partículas virais nas culturas de leucócitos de animais portadores de leucemia e ainda que pela inoculação de material dessas culturas pode-se transmitir a leucemia a animais sadios.

Com o mesmo objetivo foi usado o teste de inibição da aderência de leucócitos, que é usado no prognóstico de diversos tumores malignos de crianças. Com ele é possível prognosticar neuroblastomas, hepatocarcinomas e nefroblastomas (Lampert & Dietmar, 1973). Por analogia procuramos empregar este teste no prognóstico da LB.

Ainda, através da imunoelectroforese pode-se determinar a presença da IgM em soros de reses de rebanhos não portadores da LB (Trainin & col. 1968). Trainin (1968), não encontrou esta fração globulínica em soros de animais leucêmicos, cujo diagnóstico de leucemia foi feito através do exame hematológico. Com esta informação pensávamos que a aplicação da imunoelectroforese pudesse ser um meio de diagnóstico seguro e rápido para a LB e ainda que viesse esclarecer casos duvidosos.

No presente trabalho o autor procurou estudar o emprego das técnicas citadas com a finalidade de tentar incorporá-las ao diagnóstico hematológico da LB, meios esses que pudessem corroborar na elucidação de casos duvidosos e mesmo dos casos com exames negativos hematologicamente, mas que, posteriormente o animal apresenta formações tumorais leucêmicas evidentes. Considerando o estudo comparativo dos vários métodos imunológicos, tendo em vista melhor diagnóstico da LB, o autor propõe que

dentre eles seja usado o método da imunodifusão no diagnóstico da leucemia bovina, nas condições propostas.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram usados sangue e soro de animais sadios e de portadores de leucemia, diagnosticados através de exames hematológicos repetidos.

No exame por imunofluorescência indireta foram empregados leucócitos de animais, cultivados como substrato da reação. O soro hiperimune foi obtido em coelhos por imunização, utilizando antígeno obtido em leucêmicos. O soro anti-immunoglobulina de coelho foi produzido em cabras, marcado com isotiocianato de fluoresceína e foi utilizado como conjugado.

No exame por imunodifusão em agar empregou-se soro de reses sadias e doentes com LB e antígenos preparados a partir de suspensão leucocitária e de culturas de leucócitos.

No exame por microscopia eletrônica empregaram-se cultura de leucócitos de animais sadios e doentes com leucemia.

Na pesquisa da imunoglobulina M, realizada por técnica de imunoelectroforese foram empregados soros de animais sadios e doentes com leucemia. Os animais, tidos como sadios, foram separados de mães de rebanhos igualmente sadios ao nascer e colocados em estábulos sem perigo de contaminação. Foram examinados a cada 15 dias, durante todo o tempo de duração da pesquisa.

Os animais doentes vinham apresentando exames hematológicos

característicos de LB por mais de dois anos. Foram igualmente examinados quinzenalmente.

### 1 - Imunofluorescência

Pesquisaram-se partículas virais em leucócitos, empregando-se a imunofluorescência indireta. Usaram-se "soros hiperimunes" de coelhos inoculados com material preparado a partir de culturas de leucócitos de animais sadios e doentes para LB e também material preparado de tumores, assim:

#### Preparo dos antígenos

Os leucócitos para serem cultivados foram obtidos de sangue de reses sadias e de doentes com LB. As amostras de sangue foram hemolisadas por choque hipotônico. As culturas foram obtidas por incubação por quatro dias em meio TC 199 (Difco) e PHA.

Os tumores dos animais leucêmicos foram guardados a  $-70^{\circ}\text{C}$  e no ato do uso foram descongelados e separados de aponevroses e de tecido gorduroso, cortados com auxílio de uma tesoura e liquidificador do tipo caseiro. Juntou-se PBS (Phosphat Buffer Solution), na proporção de 3:1, de PBS - massa tumoral. O conjunto foi tamisado através de malhas de 2 mm de diâmetro e em seguida juntado com PBS em igual volume.

A seguir, tanto a suspensão de leucócitos obtidos em cultura, como a suspensão celular da massa tumoral, foram congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e descongeladas a  $+37^{\circ}\text{C}$  e ainda ultrassonadas a 250 mA, por 15 minutos, passadas em gaze e centrifugadas a 100.000 g, por 120 minutos a  $+4^{\circ}\text{C}$ .

Foram desprezados os sobrenadantes e os precipitados juntados

e diluídos em 4,0 ml de uma solução de citrato de sódio, 0,153 M. A mistura foi juntada, gota a gota, uma solução de laurilsulfato de sódio a 10,0%, até uma concentração final de 0,5%. Após cinco minutos de incubação foram juntadas duas gotas de uma solução saturada de cloreto de potássio (Speck, 1969).

#### Obtenção dos soros

Os antígenos obtidos de leucócitos de animais sadios, de animais doentes e de tumores leucêmicos foram emulsionados com adjuvante de FREUND completo e incompleto: uma quantidade de 0,8 ml das preparações foi emulsionada com 1,3 ml de adjuvante e inoculada em coelhos, nas almofadas plantares, na região cervical, na região lombar e ainda por via intramuscular.

Foram inoculados 13 coelhos: um lote de cinco foi inoculado com antígeno preparado de cultura de leucócitos; outro lote de quatro recebeu antígeno preparado de tumor, e outro de quatro recebeu antígeno de leucócitos de reses sadias. Os coelhos foram inoculados durante 8 semanas e depois submetidos à sangria total.

Com a finalidade de eliminar reações inespecíficas os soros foram previamente absorvidos com células liofilizadas de timo e com pó de nódulos linfáticos de origem bovina.

Foi preparado um soro de cabra anticoelho, conjugado com isotiocianato de fluoresceína, conforme Riggs & col. (1958); Marshall, Eveland & Smith (1958); Coons & Kaplan (1950); Shimmelpfennig & Mitscherlich (1964) e Henle & Henle (1966).

Para exame foram preparados esfregaços em lâminas com leucócitos cultivados e não cultivados de animais sadios e de doentes com leucemia.

Os esfregaços foram tratados com os soros dos coelhos hiperimunizados por 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  e com o soro de cabra anticoelho e azul de Evans, na concentração de 0,01%. As reações foram lidas em microscópio de fluorescência.

### 2 - Microscopia eletrônica

Para a pesquisa de partículas virais em leucócitos foram feitas colheitas de sangue e cultivados os leucócitos. Ao fim do período de incubação os leucócitos foram lavados e examinados para se detectar contaminação bacteriana e também contaminação por vírus diferentes daquele procurado. A seguir as células foram preparadas para a prova de microscopia eletrônica: foram fixadas em glutaraldeído a 1,0%, lavadas em PBS, tratadas com óxido de tetraóxsmio a 1,5%, passadas pela série de alcoóis e embebidas em ACM-Durcupan (Fluca). Após contrastar os cortes foram tratados com acetato de uranil e citrato de chumbo e examinados ao microscópio eletrônico (em a-Zeiss-Goettingen).

### 3 - Imunoprecipitação

Na preparação de antígenos foram usados tumores de animais leucêmicos, leucócitos cultivados e não cultivados de animais sadios e de doentes com leucemia. Parte dos substratos dos leucócitos e dos tumores foram tratados com polietile-

noglicol 6.000 (PEG) e parte com TWEEN 80.

Para o tratamento dos substratos com PEG, usou-se na concentração de 6,0%, deste sob incubação por 16 horas a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Os precipitados obtidos foram centrifugados a 800 g, por 30 minutos e resuspensos em citrato de sódio tribásico dihidratado 0,05 M, pH 7,2. As suspensões obtidas foram tratadas por gradiente de sacarose e centrifugadas a 63.000 g, por três horas. A camada branco-acinzentada intermediária foi diluída em solução tamponada de citrato e centrifugada a 30.000 g. Os precipitados resultantes foram diluídos em solução tamponada de citrato de sódio, na proporção de 1:200, em volume do extrato original. A suspensão obtida foi tratada com éter, na proporção de 1:9, sob agitação constante e novamente centrifugada a 30.000 g. O sobrenadante foi tratado com cialit (2(etil-mercúrio-mercaptop-benzoxazol - 5 - carbonsaure Natrium) 1:10.000 e guardado a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Este constituiu nosso antígeno.

No preparo dos substratos com TWEEN 80, este foi usado na concentração de 1,0%. As suspensões foram tratadas com éter sob agitação constante a  $+22^{\circ}\text{C}$ , e centrifugadas a 1.000 g, por 15 minutos. A fase aquosa foi retirada e tratada por borbulhamento com nitrogênio para livrar a suspensão do éter restante e novamente centrifugada a 15.000 g, por 30 minutos. O sobrenadante tratado com cialit, constituindo o antígeno preparado.

A técnica usada na imunoprecipitação foi a de Ouchterlony, em que se usaram os antígenos diluídos a 1:4 e soros dos animais sem

diluição. Ao agar foi incorporado o alaranjado de metila na concentração de 0,03%

#### 4 - Imunoaderência

A prova de inibição de aderência aplicada ao diagnóstico da LB foi realizada, empregando-se suspensões de monócitos e polimorfonucleares neutrófilos e também soros de reses sadias e de portadoras de leucemia e ainda antígenos preparados de tumores.

As suspensões de monócitos foram preparadas segundo Otto & Schmid (1970), para a separação dos leucócitos. Usou-se o Uromiro-380, na concentração de 22,5%. A camada leucocitária foi colhida e submetida à cultura. Após quatro dias de incubação foram contados os macrófagos.

Os antígenos usados no teste de aderência ao vidro foram preparados de tumores livres de sangue. Os fragmentos de tumores foram homogeneizados, centrifugados e esterilizados por filtração em filtro Millex 0,22 µm.

Para a realização do teste foram usados frascos plásticos, contendo cada um 30 pérolas de vidro de 5 mm de diâmetro. Foram distribuídos em tubos as suspensões leucocitárias, o antígeno e o soro bovino diluído, e incubados à parte por 30 minutos a 37° C, com agitação a cada 10 minutos. Terminado o tempo de incubação foram utilizados 0,02 ml das misturas que foram colocadas nos tubos plásticos, contendo as pérolas de vidro e 10,0 ml de uma solução isotônica. Após agitação por três vezes por inversão dos tubos foram contadas as células em suspensão com auxí-

lio de um "Coulter Counter". Após duas horas nova contagem foi procedida das células não aderentes.

Foram calculados os percentuais das células aderentes para cada tubo, da primeira e segunda contagens.

Para o resultado de dez tubos da mesma suspensão foi calculada a média e o desvio padrão da média e aplicado o teste de t.

#### 5 - Determinação da imunoglobulina M

Foram usados nesta determinação soros de animais de 100 rebanhos com idades, variando entre dois a 12 anos, ao todo 1.600 reses. Os animais doentes foram subdivididos em 60 portadores de leucemia e 30 outros portadores de outras moléstias como: doença de mucosa, pneumonia, mastite, brucelose e salmonelose.

Para a determinação das imunoglobulinas foi empregada a imunoelectroforese como descreveram Grabar & Burtin, (1960) e Grabar & Burtin (1964), usando antisoro específico.

## RESULTADOS

A caracterização dos animais em sadios e doentes para leucemia foi baseada, simplesmente, no exame hematológico. Para o diagnóstico por imunofluorescência foram usados leucócitos cultivados de animais sadios e doentes com leucemia.

Na reação de imunofluorescência indireta, contratada com azul de Evans, leucócitos foram vistos, mostrando-se vermelhos e nítida fluorescência amarelo-esverdeada



com padrão granular. Esta permaneceu exclusivamente no citoplasma das células. Não foi vista nas áreas dos núcleos nem das membranas dos núcleos.

A fluorescência mostrou-se muitas vezes como uma "poeira" ou como pequenos "grânulos fluorescentes". Estes se apresentavam como massas que chegavam a medir aproximadamente 0,8 micron em seu maior diâmetro. Estes achados foram vistos nos esfregaços de leucócitos de animais com leucemia somente.

Através da microscopia eletrônica foram vistas partículas tomadas como virais. Não foram necessários muitos cortes ou que esses fossem muito finos para que pudessem ser vistas. Apresentavam-se isoladas e agrupadas. As partículas encontradas assemelhavam-se grandemente entre si, mostrando denso núcleo rodeado por uma zona menos densa e uma aparência lisa. Não se pode afirmar que as partículas tenham membrana única, pois que em algumas delas observou-se dupla camada. O tamanho das partículas foi variável, com a média de 90-120 µm. As partículas também foram vistas extracelularmente, isoladas ou associadas, parecendo material difuso, atingindo frequentemente as proximidades das membranas celulares.

No teste de imunodifusão verificaram-se reações de precipitação específica somente entre os antígenos preparados com PEG e TWEEN 80 e os soros de animais portadores de leucemia.

Apresentaram resultados negativos de precipitação antígenos preparados de tumores e de leucócitos não submetidos a cultivo, mes-

mo sendo de animais leucêmicos.

O teste de aderência aplicado no intuito de diagnosticar leucemia bovina apresentou resultados positivos concordantes em somente 31,0% dos animais doentes examinados, quando submetidos à repetição.

Todos os soros dos animais examinados (sadios e doentes com leucemia) através da imunoelectroforese apresentaram a fração IgM.

## DISCUSSÃO

A sorologia fluorescente tem sido pouco empregada no exame de elementos figurados do sangue periférico de animais com a finalidade de se detectarem partículas virais.

Tolle (1966), aplicou a imunofluorescência no estudo de víruses do camundongo. Trainin & Klopfer (1970) a aplicaram no sentido de estabelecer o papel da IgM de animais portadores de LB, usando células de nódulos linfáticos.

A microscopia fluorescente empregada no estudo de partículas virais poderia ser prejudicada devido ao tamanho das mesmas. Vimos no estudo da microscopia eletrônica que as partículas apresentam-se isoladas e em aglomerados bem visíveis, o que seria suficiente para mostrar à sorologia fluorescente o descrito como "poeira" e "grânulos" fluorescentes entre as células, facilitando sobremaneira obter-se uma sorologia fluorescente positiva.

Os animais selecionados para este trabalho foram rigorosamente mantidos sob condições especiais para não se contaminarem. Os doentes com leucemia foram man-

tidos em igualdade de condições dos sádios.

Na preparação dos soros de coelhos hiperimunizados procurou-se usar material de leucócitos de reses com linfocitose mais elevada com a finalidade de obter teores mais altos na concentração do material antigênico.

Para o preparo do material antigênico, as amostras de sangue foram hemolisadas, empregando-se o choque hipotônico sem que houvesse prejuízo algum para a série leucocitária. Os coelhos inoculados com os antígenos preparados das culturas leucocitárias foram submetidos a injeções subcutâneas múltiplas, durante 8 semanas, produzindo alto teor de anticorpos.

Para evitar fluorescência espontânea foi usada a coloração de contraste com azul de Evans, seguindo-se as indicações de Engler, Urbaneck & Olechnowitz (1970), e as de Engler & col. (1972).

A "poeira" e "grânulos" fluorescentes descritos mostram fortes indícios da presença de partículas virais aglomeradas e consequentemente é de se sugerir a sua incriminação na etiologia da leucemia bovina.

A microscopia eletrônica usada foi a clássica. Procurou-se desde o início conduzir as culturas de leucócitos a maior esterilidade, evitando-se fundamentalmente a contaminação por parvovirus que indevidamente pudessem ser incriminados como partículas virais procuradas. Não foi necessário que se fizessem muitos cortes das células para encontrar partículas de vírus.

As partículas encontradas assemelham-se às descritas na literatura da leucemia do carneiro por

Enke, Jungwitz & Roessger (1964), por Ulbrich, Best & Paulsen (1970), por Paulsen & col. (1972), por Rudolph & Paulsen (1972) e por Paulsen, Rudolph & Müller (1974).

Para o exame dos soros através do teste de imunodifusão o autor produziu antígenos tratados pelo polietilenoglicol 6.000 e pelo TWEEN 80. Estes agentes químicos facilitaram sobremaneira o teste, evidenciando as propriedades antigênicas das partículas virais contidas nas culturas de leucócitos. Introduziu-se ainda ao agar fundido o alaranjado de metila para facilitar o contraste das faixas de precipitação.

Os soros dos animais doentes somente reagiram com os antígenos preparados a partir da cultura dos leucócitos de animais portadores de LB. O fato de os soros terem reagido somente com os antígenos preparados de leucócitos cultivados talvez seja devido à necessidade da proliferação de partículas virais nas culturas, de modo a atingir uma concentração adequada para produzir bom antígeno.

O teste de aderência está sendo usado com bastante sucesso no prognóstico de neuroblastomas, hepatocarcinomas e nefroblastomas de crianças por Lampert & Dietmar, na Alemanha e por Halliday & Miller, nos Estados Unidos. Por analogia aos trabalhos dos pesquisadores acima o autor aplicou a imunoaderência com sentido também de prognóstico da LB porque muitas vezes há produção de tumores nos animais leucêmicos.

A imunoaderência aplicada como diagnóstico da LB apresenta resultados positivos, porém inseguros, para afirmar pura e simples-

mente que se trata de leucemia. Nas bases experimentadas o teste funcionou precariamente.

Trainin & col (1968), e Trainin & Klopfer (1970/1971) chamaram a atenção para a pesquisa da imunoglobulina M, em reses portadoras de leucemia nas quais verificaram ausência total daquela fração nos soros de animais leucêmicos examinados. Procuramos reproduzir os trabalhos desses autores e obtivemos resultados completamente discordantes. Verificamos, além da presença da IgM em todos os soros examinados, uma oscilação do teor dessa fração. Julga-se necessária uma investigação para determinar a variação do teor de IgM em soros de animais portadores de leucemia.

## CONCLUSÕES

1 - O exame hematológico não é suficientemente informativo quando são envolvidos casos duvidosos e negativos (leucemia aleucêmica), mesmo quando o animal possui formações tumorais características;

2 - O método da sorologia fluorescente pode ser empregado como diagnóstico da LB, em que uma "poeira" ou "grânulos" fluorescentes servem como indicador da presença de partículas virais;

3 - Com auxílio da microscopia eletrônica foram examinadas culturas de leucócitos de animais infectados com material de outros tidos como doentes com leucemia. O exame das fotografias obtidas ao microscópio eletrônico sugere que as partículas encontradas são de vírus. As referidas partículas

não foram encontradas no material controle normal;

4 - Recomenda-se o uso rotineiro da reação de imunodifusão para o diagnóstico sorológico da LB, usando-se antígenos feitos com leucócitos cultivados, tratados com polietilenoglicol 6.000 e com TWEEN 80;

5 - A imunoaderência empregada na tentativa de diagnóstico não foi convincente nas bases em que foi empregada;

6 - A aplicação da imunoelectroforese em soros de animais portadores de LB, para evidenciar a imunoglobulina M, mostrou que ela está presente tanto nos soros dos animais sádios como nos soros de animais portadores de leucemia.

## SUMMARY

Immunofluorescence technique was used in the diagnosis of bovine leukaemia. Antisera against bovine leukaemia antigen was obtained in rabbit previously immunized.

The results showed that only antigens obtained from leucocytes cultures were able to induce specific antibodies. Sera from animals immunized with antigens supposed containing viral leukaemia particles were able to show positive fluorescence in cells obtained from animals with leukaemia, for this demonstration was utilized goat anti rabbit immunoglobulin, labelled with fluorescein isotiocyanate. The fluorescence pattern was granular and intracellular.

Electronic microscopy was also used, as a possible method of bovine leukaemia diagnosis, looking

for viral particles which could characterize bovine leukaemia.

Another method used for diagnosis was immunoprecipitation in agar with two antigens prepared from cultures of leucocytes obtained from leukaemic animals.

The immunoadherence test also applied in diagnosis did not show conclusive results.

IgM in leukaemic animals sera was searched by immunoelectrophoresis and all sera present this immunoglobulin fraction.

Finally we considered clinical and haematological achieves in order to evaluated better the studies of bovine leukaemia.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BEDERKE, G.; SCHMIDT, F.W.; TOLLE, A. & UEBERCHAE, S. - Versuche zur Uebertragung der Rinderleukose mit Rohmilch und pasteurisierter Milch. *Zbl. Vet. Med.*, 17:701-717, 1970.
- 2 BEDERKE, G.; TOLLE, A. & SCHMIDT, F.W. - Zur placentaren Uebertragbarkeit der Rinderleukose. *Zbl. Vet. Med.*, 15:782-793, 1968.
- 3 BELF, A. - In: Rinderleukose in der Praxis. *Tierarztl. prax.*, 1:149-158, 1965.
- 4 CHOPRA, H.C.; WOODSIDE, N.J. & BOGDEN, A.E. - Virus particles in rat leukemias. *Cancer Res.*, 30:1544-1597, 1970.
- 5 COONS, A.H. & KAPLAN, M.H. - Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.*, 91:1-13, 1950.
- 6 ENGLER, E.; URBANECK, O. & OLECHNOWITZ, F. - Immunhistologische Untersuchungen bei Schweinepest. I. Methode zum Nachweis des Schweinepestvirus in Organmaterial experimentell infizierter Schweine mit der direkten immunofluoreszenz unter Verwendung der Kontrastfärbung mit Evans blau. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 24: 481-501, 1970.
- 7 ENGLER, E.; LUDWIG, C.; FRITZCH, W.; PULST, H. & ULBRICH, F. - Immunhistologische untersuchungen bei Schweinepest. II. Die Bedeutung des Kontrastimmunofluoreszenzverfahrens fuer die routinemaessige Laboratoriumsdiagnose der Schweinepest. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 26:661-682, 1972.
- 8 ENKE, K.H.; JUNGWITZ, M. & ROESSGER, M. - Vermutlicher Uebertragungsweg der Leukose vom Rind auf das Schaf. *Mh. Vet. Med.*, 19:45, Oktober, 1964.
- 9 FORTNER, J. - Untersuchungen ueber die Rinderleukose. *Zbl. Infektionskr. Haustiere*, 60:215, 1964.
- 10 GILDEN, R.V.; LEE, L.; OROZIAN, S.; WALKER, J.L. & HUEBNER, R.J. - Reptilian C-type-virus: Biological, biophysical and immunological properties. *Virology*, 41:187-190, 1970.
- 11 GRABAR, P. & BURTIN, P. - Immunoelectrophoretic analyses. Amsterdam, Elsevier, 1960
- 12 GRABAR, P. & BURTIN, P. - Immunoelectrophoretic analyses. Amsterdam, Elsevier, 1964.

- 13 HENLE, G. & HENLE, W. - Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bacteriol.*, 91:1248-1256, 1966.
- 14 KAWAKAMI, T.G.; HUFF, S.D.; BUCKLEY, P.M.; DUNGWORTH, D.L. & SNYDER, St. P. - C-type-virus associated with gibbon lymphosarcoma. *Nature (LONDON)*, 235:170-171, 1972.
- 15 LAMPERT, F. & DIETMAR, E. - Leukozyten-Adhaerenz-inhibitor: Ein einfacher in-vitro-Test zum Nachweis tumorspezifischer immunitaet und blockferender Serumfaktoren bei Rindern mit Malignomen. *Infektion*, 1:17-23, 1973.
- 16 MARSHALL, J.D.; EVELAND, W.C. & SMITH, C. W. - Superiority of fluorescein isothiocyanate (RIGGS) for fluorescent antibody technic with a modification of its application. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98:898-900, 1958.
- 17 OLSON, C.; MILLER, L.D.; MILLER, J. M. & GILLETTE, K. G. - Progress on transmission of bovine lymphosarcoma. *Bibl. Haemat.*, 36:476-492, 1970.
- 18 OTTO, F. & SCHMID, D. O. - Lymphozytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere. *Blut.*, 21:118-122, 1970.
- 19 PAULSEN, J.; RUDOLPH, R.; HOFFMANN, R.; WEISS, E. & SCHLISSER, T. - C-type virus particles in phytohemagglutinin stimulated lymphocyte cultures with reference to enzootic lymphatic leukosis in sheep. *Med. Microbiol. Immunol.*, 158: 105-112, 1972.
- 20 PAULSEN, J.; RUDOLPH, R. & MILLER, J. M. - Antibodies to commum ovine and bovine C-type-virus specific antigen in serum from sheep with spontaneous leukosis and from inoculated animals. *Med. Microbiol. Immunol.*, 159:105-114, 1974.
- 21 PRIOR, E.S.; DMOCHOWISKI, L.; MYERS, B. & WILBUR, J. R. - Constant production of C-type-virus particles in a continous tissue culture derived from pleural cells of a lymphoma patients. *Nature*, 32:61-62, 1971.
- 22 RIGGS, J. L.; SEIWALD, R.J.; BUCKHALTER, J.H.; DOWNS, C.M. & METCALF, T. G. - Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Amer. J. Path.*, 34: 1081-1097, 1958,
- 23 ROSENBERG, G. - Ergebnisse zehnjähriger Leukoseuntersuchungen an der Rinderklinik Hannover. *Dtsch. Akademie des Landwirtschaftswissenschaften*, Berlin, Tagungsbericht, 49:33-45, 1961.
- 24 RUDOLPH, R. & PAULSEN, J. - Ultrastruktur lymphatischen Zellen bei Leukose des Schafes. Berlin, Muenchen Tieraerztl. Wschr., 85:85-87, 1972.
- 25 SCHIMMELPFENNIG, H. & MITSCHERLICH, E. - Zum Anwendung der Fluoreszenzserologie in der bakteriologischen Diagnostik. 1. Mitteilung: Differenzierung von *Vibrio fetus* und *Vibrio Eltor* - Staemmen mittels fluoreszierender Antikoerper. *Zbl. Vet. Med.*, 11:393-406, 1964.
- 26 SCHMIDT, F.W.; UEBERCHAE, S. & TIEFENAU, M. - Viruspartikel in Leuko-

- zytenkulturen von experimentell infizierten Leukoserindern. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 77:451-452, 1970.
- 27 SPECK, J. - Untersuchungen in Deutschland isolierter Huenleukosevirusstaemme. Habil. Schrift. Landw. Fakultät, Univ. Goettingen, 1969.
- 28 STENBACK, W.A.; van HOOSTER, G.L. & TRENTIN, J. J. - Biophysical, biological and cytochemical features of a virus associated with transplantable hamster tumor. J. Virol., 2: 1.115 - 1.121, 1968.
- 29 STRAUB, D.C. & WEINHOLD, E. - Zur Frage der Uebertragung boviner Leukose durch Kolostrum und Milch. Dtsch. Tierärztl., Wschr., 73:441-444, 1971.
- 30 TOLLE, A. - Uebertragbarkeit der Rinderleukose. Zbl. Bakteriologie I. Orig., 198:142-149, 1966.
- 31 TRAININ, Z.; NOBEL, P.A.; KLOPFER, T.A. & NEUMANN, F. - Absence of macroglobulin (IgM) in the sera of leukotic cattle and the diagnosis of bovine leukosis. Hefuah. Vet., 25: 185-187, 1968.
- 32 TRAININ, Z. - Immunoelctrophoretic finding in sera of cattle affected with bovine leukosis. Proceeding to the third Internat. Sympos. of Comprehensive leukemia Res., 214-216, Basel. S. Karger, AG, 1968.
- 33 TRAININ, Z. & KLOPFER, U. - Immunofluorescent studies in lymph nodes from cattle affected with bovine leukosis. Bibl. Haematol., 36:500-503, 1970.
- 34 TRAININ, Z. & KLOPFER, U. - Immunofluorescent studies of lymph nodes and spleens of leukotic cattle for cells producing IgM and IgG. Cancer Res., 31:1968-1970, 1971.
- 35 UEBERSCHAER, S. - Elektronenoptische Untersuchungen an den Zellen der Tumorerkrankung Form der Leukose des Rindes. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 70:417-422, 1963.
- 36 ULBRICH, F.; BEST, E. & PAULSEN, J. - Beobachtungen an einer von Leukose befallenen Schafheide. Tierärztl. Umschau, 25:277-282, 1970.
- 37 WIESNER, E. - Die Leukose des Rindes. Verlag G. Fischer, Jena, 1961.
- 38 WITTMANN, W. & SOLICH, P. - Typ-C-Virus Partikeln in Phytohaemagglutininstimulierten Milzzellenkulturen eines leukosekranken Rindes. Arch. Exp. Vet. Med., 26: 111-114, 1972.