

Universidade Federal de Minas Gerais  
Conselho de Pós-Graduação  
Escola de Veterinária

COMPARAÇÃO DAS PROVAS DE HEMOAGLUTINAÇÃO PASSIVA E SORONEUTRALIZAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DO HERPESVÍRUS BOVINO 1 (HVB 1)

Antônio Vicente Magnavita Anunciação

Belo Horizonte  
Minas Gerais  
1986

Antonio Vicente Magnavita Anunciação

COMPARAÇÃO DAS PROVAS DE HEMOAGLUTINAÇÃO PASSIVA E SORONEUTRALIZAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DO HERPESVÍRUS BOVINO 1 (HVB 1)

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Belo Horizonte  
Minas Gerais  
1986

Anunciação, Antonio Vicente Magnavita, 1956-  
A637c Comparação das provas de hemoaglutinação passiva e  
soroneutralização no diagnóstico do Hespervírus bovi  
no 1 (HVB 1). Belo Horizonte, Escola de Veterinária  
da UFMG, 1986.

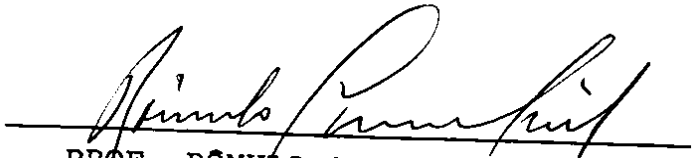
37p. ilustr.

Tese, Mestre em Medicina Veterinária.

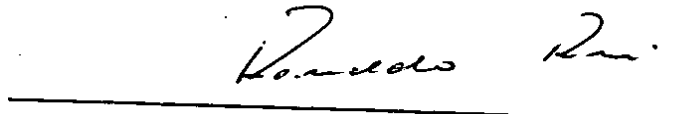
1. Hemoaglutinação passiva. 2. Hespervírus bovino  
1, diagnóstico. 3. Rinotraqueíte Infecciosa Bovina.  
I. Título.

CDD - 636.208 969 2

Aprovada em: 30/05/86

  
\_\_\_\_\_  
PROF. RÔMULO CERQUEIRA LEITE  
- Orientador -

  
\_\_\_\_\_  
PROF. ÉLVIO CARLOS MOREIRA

  
\_\_\_\_\_  
PROF. RONALDO REIS

Aos meus pais, João e Detinha;  
ao meu avô Vicente "in memoriam";  
à minha tia Helena; à minha irmã  
Therezinha e ao meu cunhado Joaquim;  
pelo estímulo e afeto.

À minha sogra Aracy e aos meus  
cunhados pela amizade.

À minha esposa Karla e ao meu  
filho Villi, pelo amor, dedi-  
cação e alegrias constantes.

Dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite pela dedicada orientação, ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Elvio Carlos Moreira, Diretor da Escola de Veterinária da UFMG, pela acolhida e orientação nos trabalhos de defesa.

Ao Prof. Ronaldo Reis pelas valiosas sugestões para a tese.

Ao Dr. Cyro de Lima Galvão e a Dra. Maria Bernadete Ribeiro, pela cessão do Laboratório de Virologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia (EBAPA), para a realização da prova de soroneutralização, e pelo apoio e amizade.

À Prof<sup>a</sup> Celina Maria Modena pelo empenho na obtenção de um professor orientador.

Ao Prof. Wagner Luiz Moreira dos Santos pela ajuda na colheitas das amostras de hemo-soros.

À Prof<sup>a</sup> Vera Alvarenga Nunes, Coordenadora dos cursos de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da UFMG e a Srta. Cláudia Kafuri pela acolhida.

Aos Profs. do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG.

Aos Profs. José Carlos Bahia Dantas, Edred Novaes Teixeira "in memoriam", Zenaide Lessa Liechti e Thereza Conceição Nunes Martinez, pelo incentivo e amizade.

Aos Profs. Eliel Judson Duarte de Pinheiro e Abdias Mendes da Silva, pela amizade.

A Universidade Federal da Bahia pela oportunidade

concedida para a realização deste curso.

Aos Profs. do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFBA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa concedida.

Aos colegas de Inspeção Federal e dirigentes do Frigorífico, Indústrias de Carnes e Derivados Amaral S/A, pela compreensão e acolhida.

À Dra. Teresinha Romano Vieira pelo apoio no tratamento dos hemo-soros.

Aos laboratoristas da Escola de Veterinária da UFMG Valéria Lima Falcão Campos, Ailton de Melo e Doracy de Fátima Reis, bióloga, pela ajuda e amizade.

Ao Sr. Guido Antônio de Caux pela revisão linguística.

À Srta. Eunice de Faria Lopes pela orientação bibliográfica.

À Sra. Sônia Maria Guimarães Araújo pelos serviços datilográficos.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação pela amizade e alegre convivência.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

O autor agradece.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

ANTONIO VICENTE MAGNAVITA ANUNCIAÇÃO, filho de João Evangelista da Anunciação e Hildete Magnavita Anunciação, nasceu em Itabuna - Bahia, no dia 4 de janeiro de 1956.

Em 1977 iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária na Escola de Veterinária da Universidade Federal da Bahia, graduando-se em 1981.

Trabalhou como Médico Veterinário no Instituto Biológico da Bahia - Secretaria da Agricultura, de setembro de 1981 a março de 1982, sendo que a partir de outubro de 1981 integrou-se ao convênio entre a Secretaria da Agricultura e a Escola de Veterinária da UFBA.

De maio de 1982 a setembro de 1982, trabalhou como Médico Veterinário da Companhia Brasileira de Alimentos (COBAL) no Laboratório de Referência Animal do Ministério da Agricultura (LARA) - Salvador, na área de análise físico-química de alimentos.

Em setembro de 1982, através de aprovação em concurso público, ingressou como Professor Auxiliar do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFBA.

Em fevereiro de 1984, iniciou o curso de Pós-Graduação a nível de Mestrado, na área de Medicina Veterinária Preventiva, na Escola de Veterinária da UFMG.

## RESUMO

Foram examinadas para Herpesvírus Bovino 1 (HVB 1) um total de 427 amostras bovinas procedentes de oito zonas fisiográficas, sendo seis do Estado de Minas Gerais, uma do Estado de Goiás e uma do Estado do Rio de Janeiro, constituídas de 400 amostras de hemo-soros, 26 raspados vulvo-vaginais (RVV) e um raspado prepucial (RP) de bovinos. Evidenciaram-se anticorpos em 280 (70,0%) das amostras de hemo-soros examinadas pela prova de hemoaglutinação passiva (HAP) e em 269 (67,2%) pelo teste de soroneutralização (SN). O vírus foi isolado em 21 (77,8%) das amostras de RVV e RP, em cultivo de células MDBK e identificado através da imunofluorescência direta (IFD).

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Material.....	9
3.1.1. Hemo-soros.....	9
3.1.2. Raspados vulvo-vaginais (RVV).....	10
3.1.3. Raspado prepucial (RP).....	10
3.1.4. Vírus de referência.....	10
3.1.5. Hemo-soro hiperimune.....	11
3.1.6. Cultivos celulares.....	11
3.1.6.1. Meios de cultivo.....	11
3.1.6.2. Linha celular.....	11
3.1.7. Eritrócitos.....	12
3.1.8. Diluente.....	12
3.2. Métodos.....	12
3.2.1. Provas sorológicas.....	12
3.3.1.1. Hemoaglutinação passiva (HAP)..	12
3.2.1.1.1. Titulação do vírus..	13

	Página
3.2.1.1.2. Preparação do anti- geno (Ag).....	13
3.2.1.1.3. Preparação de eri- trócitos formolados e taninizados (EFT) ....	14
3.2.1.1.4. Sensibilização dos EFT pelo Ag (EFT/Ag)..	14
3.2.1.1.5. Tratamento dos hemo- soros.....	14
3.2.1.1.6. Titulação dos hemo- soros.....	14
3.2.1.2. Soroneutralização (SN).....	15
3.2.1.3. Imunofluorescência direta (IFD)..	15
3.2.2. Isolamento do vírus.....	16
3.3. Procedimento estatísticos.....	16
3.3.1. Tamanho da amostra.....	16
3.3.2. Sensibilidade e especificidade.....	16
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Frequência de anticorpos.....	18
4.2. Frequência de isolamento.....	18
4.3. Avaliação da prova HAP.....	18
4.3.1. Em relação a prova de SN.....	23
4.3.2. Em relação ao método de isolamento.....	23
5. DISCUSSÃO.....	27
5.1. Frequência de anticorpos.....	27
5.2. Hemoaglutinação passiva.....	27
6. CONCLUSÕES.....	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

## LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA I - Modelo de tabela para cálculo de sensibilidade e especificidade da HAP.....	17
TABELA II - Freqüência de anticorpos contra o HVB 1, a través das provas de HAP e SN, em rebanhos bovinos de zonas dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, 1985/86.....	20
TABELA III - Distribuição de freqüência dos títulos de anticorpos contra o HVB 1, pela prova de HAP, nas zonas amostradas dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, 1985/1986.....	21
TABELA IV - Distribuição de freqüência dos títulos de anticorpos contra o HVB 1, pela prova de SN, nas zonas amostradas dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, 1985 / 1986.....	22
TABELA V - Avaliação de sensibilidade e especificidade da prova HAP em relação à SN.....	24

## Página

TABELA VI - Avaliação de sensibilidade e especificidade da prova HAP em relação ao método de isolamento de vírus.....	25
TABELA VII - Resultados obtidos pelo método de isolamento de vírus e a prova de IFD com as amostras de RVV e RP, e pelas provas de HAP e SN nos respectivos hemo-soros.....	26

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Procedência dos hemo-soros bovinos por esta <u>dos</u> e zonas fisiográficas.....	19

## 1. INTRODUÇÃO

O diagnóstico laboratorial das enfermidades causadas por herpesvírus baseia-se no isolamento do vírus e identificação mediante diversas provas sorológicas, tais como: soneutralização (SN) (DANNACHER & MARTEL, 1978), fixação de complemento (FC) (DOLL et alii, 1953), imunodifusão (ID) (SMITH & STEWART, 1978), imunofluorescência (IP) (ALLAN et alii, 1984), hemoaglutinação passiva (HAP) (LABADIE & TOMA, 1979) e o teste ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (ROSZKOWSKI et alii, 1978).

No caso específico do Herpesvírus Bovino 1 (HVB 1) agente etiológico da rinotraqueíte infecciosa bovina - vulvovaginite pustular infecciosa (IBR-IPV), o isolamento é feito em cultivos celulares primários, especialmente em células renais de feto bovino (MADIN et alii, 1956) e na linha celular MDBK (MADIN & DARBY bovine kidney) (STEVENS & GROMAN, 1963) produzindo efeito citopático (ECP) característico, visível ao microscópio e inclusões virais intranucleares do tipo A de Cowdry (CHEATHAN & CRANDELL, 1957). A identificação se faz pela prova de SN (JENNEY & WESSMAN, 1978).

As provas sorológicas mais utilizadas para evidenciar anticorpos contra o HVB 1 são SN (HOUSE & BAKER, 1971), IF (SCHIPPER & GROW, 1968), FC (WELLEMANS & LEUNEN, 1973) e ID (ESTELA, 1967).

A prova de HAP tem sido também aplicada ao estudo do HVB 1, e alguns pesquisadores consideram-na mais rápida e sensível do que a SN (WHITMAN & HETRICK, 1965; SHIMIZU et alii, 1972; ZYAMBO et alii, 1973b; ESPINASSE et alii, 1978; KIRBY et alii, 1974; BERRIOS et alii, 1983).

O HVB 1 foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos por MADIN et alii (1956). Após esta descrição, a IBR-IPV tem sido diagnosticada em diversos países do mundo, sendo responsável por graves perdas econômicas.

No Brasil, os primeiros isolamentos do HVB 1 foram feitos por ALICE (1978), no Estado da Bahia, examinando raspados das pústulas vaginais de vacas e por MUELLER et alii (1978), no Estado de São Paulo, de um rim de feto bovino proveniente de matadouro. A presença de anticorpos contra o HVB 1 foi constatada por GALVÃO et alii (1962-63), no Estado da Bahia, em 158 (34,4%) das amostras de hemo-soros de bovinos colhidas nas principais regiões de pecuária do estado e por WIZIGMANN et alii (1972), no Estado do Rio Grande do Sul, em 76 (33,18%) das amostras de 11 municípios.

Recentemente, GALVÃO (1984) examinando materiais de campo procedentes de rebanhos bovinos de Minas Gerais, conseguiu isolar o HVB 1 em 51,4% destes materiais.

O HVB 1 compromete diferentes órgãos e sistemas, inclusive os da reprodução. O complexo clínico-patológico, além do síndrome respiratório (MILLER, 1955), pode vir associado à querato-conjuntivite (PROVOST & BORREDON, 1965), vulvo-vaginite (SAXEGAARD, 1970), aborto (McKERCHER & WADA, 1964), balanopostite (HUCK et alii, 1971), encefalite (FRENCH, 1962) e enterite (WELLEMAN et alii, 1974).

A hemoaglutinação passiva ou indireta (HAP-HAI) é uma prova sorológica usada para antígenos que não possuem a propriedade de aglutinar eritrócitos. É aplicada a grande número de antígenos solúveis, protéicos ou polissacárides, os quais são adsorvidos à superfície dos eritrócitos que funcionam como partículas indicadoras. De um modo geral, antígenos polissacárides, quando não muito purificados, podem fixar-se di

retamente aos eritrócitos. Os antígenos protéicos, entretanto, requerem tratamento prévio dos eritrócitos com ácido tânico, com o que é possível obter suspensões celulares especificamente aglutináveis em presença dos respectivos anti-hemo-soros (BOYDEN, 1951).

É de grande importância no diagnóstico a nível laboratorial que a prova utilizada seja rápida e precisa, tanto para se eleger um tratamento mais adequado, como para acompanhar um programa de prevenção, controle ou erradicação da doença.

Em vista disso, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a prova de HAP por ser mais simples, rápida, sensível e específica, em comparação com a prova padrão de SN e o método de isolamento de vírus em cultivo celular, para determinar a prevalência.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas décadas tem-se pesquisado novos métodos para diagnóstico das infecções virais, visando simplificá-los, sem entretanto comprometer sua sensibilidade e especificidade.

WHITMAN & HETRICK (1965) foram os primeiros a desenvolver experimento com a prova HAP para detectar anticorpos contra o HVB 1, comparando-a com a SN. Utilizaram três hemo-soros de bovinos e três hemo-soros de coelhos, colhidos de animais imunizados com o HVB 1, anti-hemo-soros para herpes simples, herpes zoster e parainfluenza 3 e 16 hemo-soros de bovinos. Em todos os testes realizados os resultados obtidos pela HAP foram iguais aos da SN. Com relação aos títulos, em muitos casos, os encontrados pela HAP foram até oito vezes mais altos do que pela SN. Não verificaram qualquer reação cruzada entre o HVB 1 nos testes e herpes simples, herpes zoster e parainfluenza 3. Concluíram que a prova de HAP é tão específica quanto a SN e mais sensível.

MAGLIONE et alii (1971) desenvolveram uma pesquisa através das provas de HAI e eletforese, utilizando amostras de hemo-soros de dois bezerros, um macho e uma fêmea, infectados experimentalmente com o HVB 1. Os animais foram testados antes e após serem infectados. Os títulos de anticorpos contra o HVB 1 pela HAI, a partir do décimo primeiro dia até o

septuagésimo quarto dia, variaram de 1/16 a 1/32, baixando logo em seguida. No exame eletroforético ocorreu um aumento de gamaglobulina no período seguinte a infecção, voltando ao normal em cerca de quatro meses. Os resultados obtidos demonstraram que, em bezerros, baixos títulos de anticorpos podem também significar recente restabelecimento da doença.

VENGRIS & MARE (1971) compararam a HAP e a SN no sistema de microtítulo, usando diferentes cepas de herpesvírus (IBR-LA e IBR-BF). Concluíram que a HAP possui alto grau de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, e com relação as duas cepas de vírus usadas notaram que o mesmo anti-hemo-soro deu dois títulos mais baixos para IBR-BF do que para a cepa IBR-LA.

SHIMIZU et alii (1972) compararam a HAP e a SN, através de testes realizados em 130 amostras de hemo-soros de bovinos de corte, pertencentes a rebanho afetado pela IBR-IPV. A HAP deu títulos de anticorpos contra o HVB 1, dez vezes mais altos do que a SN, embora houvesse uma considerável variação de diferenças entre os títulos. Utilizaram ainda três vacas infectadas pela via nasal, com o HVB 1. Amostras de hemo-soros, foram colhidas periodicamente para titulação, e a HAI evidenciou anticorpos a partir do sétimo dia após a inoculação. No entanto, somente entre o nono e décimo primeiro dias ambas as provas detectaram anticorpos nas três vacas, persistindo por mais de seis semanas. Concluíram que, em estágio precoce de infecção, a HAI é melhor do que a SN, pois evidenciou anticorpos 19S e 7S, enquanto que a SN somente o 7S, que demonstra estágio mais avançado de infecção. A HAI mostrou-se mais sensível do que a SN, combinando relativa rapidez na execução, economia de reagentes e vidraria.

ZYAMBO et alii (1973b) analisaram a HAP, através de comparações entre seus vários parâmetros, tais como: preparação e concentração de reagentes, sensibilização dos eritrócitos, tratamento dos hemo-soros, tempo e temperatura para estocar os reagentes e manter a microplaca em teste. Deste modo determinaram de forma simplificada toda a prova. Em outra

pesquisa, ZYAMBO et alii (1973a) concluíram que quantitativamente a HAP deu títulos de anticorpos em média sete vezes mais altos aos obtidos pela SN, ao passo que, qualitativamente, se equivalem.

KIRBY et alii (1974) examinaram 900 amostras de hemo-soros de bovinos pertencentes a 40 rebanhos diferentes pelas provas de HAI e SN. Os títulos de anticorpos contra o HVB 1 foram dez vezes mais altos pela HAI do que pela SN. Das amostras testadas, 9,8% foram positivas para SN, com títulos 1/2, enquanto que 21,2% foram positivas para HAI, com títulos 1/8. Analisaram ainda dois bezerros da raça Jersey de 15 dias de idade, infectados pelas vias nasal e ocular com HVB 1. Amostras de hemo-soros e zaragatoa nasais foram colhidos em intervalos regulares. O vírus foi isolado 72 horas após inoculação e anticorpos foram confirmados pela HAI nove dias após a infecção. Enquanto que pela SN, anticorpos em níveis significativos não apareceram até o décimo sétimo dia. Concluíram que a HAI oferece maior sensibilidade e rapidez do que a SN e sua elaboração é simples, portanto de grande valor para o diagnóstico da IBR-IPV.

SWANEPOEL et alii (1976) utilizaram 11 bovinos infectados com o HVB 1 pelas vias nasal ou genital. Durante seis meses foram colhidas amostras de hemo-soros e analisados através de HAI, SN e FC. A HAI detectou títulos de anticorpos mais altos do que a SN, mas com níveis de flutuações proporcionais. A prova de FC apresentou uma maior flutuação e foi menos sensível.

DANNACHER et alii (1979) fizeram um levantamento sorológico para a IBR-IPV, analisando 841 amostras de hemo-soros de bovinos pelas provas de HAP e SN. Na análise dos resultados obtidos com as provas, 805 (95,7%) foram concordantes e apenas 36 (4,3%) discordantes.

BERRIOS et alii (1983) compararam as provas de SN, HAP, FC e ID através da resposta imune humoral de quatro coelhos inoculados com o HVB 1, cepa Puente Alto Chile. Todas as provas detectaram anticorpos a partir de sete dias da primei-

ra inoculação com um aumento gradual dos títulos, os quais alcançaram valores máximos entre 28 e 35 dias. Após uma segunda inoculação ocorreu um incremento dos títulos dos hemo-soros, com valores máximos entre 14 e 21 dias, que em seguida declinaram lentamente. Diante disso, recomendam o uso da prova de HAP para o estudo e diagnóstico do HVB 1 por ser econômica, rápida e sensível.

SURI BABU et alii (1984), na Índia, analisaram a prevalência da IBR-IPV em 1684 amostras de hemo-soros de bovinos pertencentes a cinco regiões diferentes, através da prova de HAI. Encontraram 64,7% (1090/1684) de amostras positivas, com títulos de anticorpos contra o HVB 1  $\geq$  1/8.

No Brasil a aplicação da prova de HAP-HAI não está sendo usada; apenas dois trabalhos relativos ao assunto foram encontrados.

Em Lavras, Estado de Minas Gerais, LIMA et alii (1977) examinaram 38 amostras de hemo-soros de bovinos Holandeses importado da Argentina pela HAP e identificaram 16 (42,1%) de amostras reagentes, com títulos, assim distribuídos: nove com títulos 1/2; seis, 1/4 e uma, 1/8.

Logo em seguida, LIMA (1978), com a finalidade de pesquisar a prevalência de anticorpos contra o HVB 1 no Município de Três Corações, Minas Gerais, examinou 733 amostras de hemo-soros de bovinos procedentes de 166 propriedades pela prova de HAP. Encontrou uma prevalência de 6,96% (51/733) de amostras positivas, que apresentavam títulos  $\geq$  1/4.

Recentemente, GALVÃO (1984), em abrangente trabalho de pesquisa, comparou a técnica de imunofluorescência direta (IFD) com os procedimentos convencionais para isolamento e identificação do HVB 1 em amostras de campo, além de observar a eficiência da linha celular MDBK para o isolamento do vírus. Analisou 230 amostras de raspado prepucial (RP), 47 de muco cêrvico-vaginal (MCV) e 38 de raspado vulvo-vaginal (RVV). Isolou e identificou o HVB 1 em 51,4% destas amostras. Pelo teste de IFD conseguiu revelar o vírus em 40,0% dos materiais examinados. Em alguns casos, como nas amostras de (MCV), apre

sentaram 74,5% de positivos pelo isolamento de vírus e 68,0 % pela IFD. O teste de IFD apresentou-se menos sensível, mas de especificidade idêntica ao do método de isolamento do vírus. Quanto à linha celular MDBK mostrou-se adequada para a evidênciação do HVB 1.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

O material de pesquisa utilizado neste trabalho constituiu-se de 400 amostras de hemo-soros, 26 raspados vulvo-vaginais (RVV) e um raspado prepucial (RP), oriundo de rebanhos bovinos localizados em oito zonas fisiográficas, assim distribuídas: seis no Estado de Minas Gerais, uma no Estado de Goiás e uma no Estado do Rio de Janeiro.

As zonas para efeito descritivo foram denominadas em:

- A - Campos das Vertentes (MG)
- B - Mata (MG)
- C - Metalúrgica (MG)
- D - Montes Claros (MG)
- E - Triângulo (MG)
- F - Sul (MG)
- G - Rio Verde (GO)
- H - Rio de Janeiro (RJ)

As amostras de RVV e RP foram colhidas de bovinos com sintomas clínicos da doença, inclusive aborto.

##### 3.1.1. Hemo-soros

As amostras de hemo-soros de bovinos foram colhi-

das em tubos de 10 ml próprios para sangria ("vacuteiner") e deixados em repouso à temperatura ambiente, até a formação do coágulo. O transporte foi feito sob refrigeração. No laboratório, após centrifugação a 800 g (2.500 r.p.m.) por 10 minutos, os hemo-soros foram colocados em tubos de 100 x 10mm com tampa de rosca, previamente esterilizados, identificados e posteriormente estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das provas.

### 3.1.2. Raspados vulvo-vaginais (RVV)

Foram colhidas 26 amostras com uso de pipeta preconizada por BARTLETT (1949). O material era colocado em frascos estéreis contendo 10 ml de salina a 0,85%, tamponada, pH 7,2 e transportados sob refrigeração.

No laboratório, separava-se uma alíquota de 3 ml, tratando-a com antibióticos (1000 UI de penicilina G potássica\*, 1000  $\mu\text{g}$  de sulfato de estreptomicina\* e 50  $\mu\text{g}$  de anfotericina - B\*\* por ml) durante 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, estocava-se a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de isolar o vírus.

### 3.1.3. Raspado prepucial (RP)

Foi procedido como descrito em 3.1.2.

### 3.1.4. Vírus de referência

Cepa IBR-LA, cedida pela Universidade de Davis, Califórnia, foi utilizada como antígeno nas provas sorológicas para a produção de hemo-soros hiperimune.

---

\* Fontoura Wyeth, São Bernardo do Campo, São Paulo (Brasil).

\*\* Squibb Ind. Quim. S/A, Santo Amaro, São Paulo (Brasil).

### 3.1.5. Hemo-soro hiperimune

Para a produção de hemo-soro hiperimune foram utilizados coelhos adultos, machos, infectados com a cepa viral de referência. O inóculo foi preparado usando-se  $10^{8.5}$  DICC 50/ml da cepa IBR-LA, emulsionada em partes iguais com adjuvante completo de Freund. Os animais foram submetidos ao seguinte esquema de hiperimunização:

Inoculação de 0,5 ml de vírus puro por via intravenosa (IV) e 2,5 ml da emulsão viral com adjuvante completo de Freund, por via intramuscular (IM), em quatro sítios diferentes, seguida de quatro inoculações subcutâneas (SC), com intervalo de uma semana.

A sangria total, através de punção cardíaca, foi procedida uma semana após a última inoculação.

### 3.1.6. Cultivos celulares

#### 3.1.6.1. Meios de cultivo

Para crescimento da linha celular, foi utilizado o MEM-Eagle\* suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado e antibióticos (200 UI de penicilina G potássica, 200 µg de sulfato de estreptomicina e 5 µg de anfotericina - B por ml), sendo em seguida filtrado. Para replicação do vírus, o meio de manutenção (MM) utilizado foi idêntico ao de crescimento, exceto por conter 0,3% de albumina bovina (AB) ao invés de SFB.

#### 3.1.6.2. Linha celular

Foi utilizada a linha celular MDBK, cedida pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa - Duque de Caxias, Rio de

---

\* GIBCO Laboratorie, Grand Island, New York (USA).

Janeiro, Brasil.

Os monoextratos celulares foram lavados com solução salina fosfatada (PBS) pH 7,2 e incubados a 37°C, por cinco minutos, com solução de tripsina versene (STV), preparada, com tripsina\* a 0,5% e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)\*\*. A suspensão celular assim obtida foi diluída em meio de crescimento na concentração de  $3 \times 10^5$  células/ml e distribuída em garrafas de Roux (100 ml/garrafa). Estas foram mantidas em estufa a 37°C por 48-72 horas para a formação da monocamada celular.

### 3.1.7. Eritrócitos

Sangue de ovinos sadios foi colhido em solução de Alsever e estocado a 4°C por um período máximo de sete dias.

### 3.1.8. Diluente

Na prova de HAP foi utilizado, como diluente, salina a 0,85% suplementada com 2% de hemo-soro de coelho, previamente inativado em banho maria (BM) a 64°C por 30 minutos.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Provas sorológicas

#### 3.2.1.1. Hemoaglutinação passiva (HAP)

Para pesquisar anticorpos contra o HVB 1, foi utilizada a prova de hemoaglutinação passiva descrita por ZYAMBO et alii (1973b).

---

\* DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan (USA)

\*\* REAGEN Quimibrás Ind. Quim. S/A, Rio de Janeiro (Brasil).

### 3.2.1.1.1. Titulação do vírus

A titulação da cepa IBR-LA foi feita através de diluições decimais ( $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ ) em microplacas\* de fundo plano. Para cada diluição foram usados cinco poços. Em cada poço foi colocado 0,025 ml de MEM-Eagle, sem soro, com auxílio de micropipetas\*\* simples ou micropipetas\*\*\* de canais múltiplos; em seguida distribuía-se cada diluição do vírus (0,025ml) nos poços correspondentes, mantendo a microplaca em temperatura ambiente por 60 minutos e acrescentou-se a cada poço 0,050ml da suspensão celular ( $10^4$  células/ml) em meio de crescimento, suplementado com 5% de SFB. A microplaca foi colocada a  $37^{\circ}\text{C}$  em incubador contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 72 horas efetuou-se a leitura microscópica, e o título infectante do vírus foi calculado pelo método de REED & MUENCH (1938).

### 3.2.1.1.2. Preparação do antígeno (Ag)

Para a produção do antígeno, as garrafas de Roux apresentando a monocamada foram lavadas com PBS pH 7,2 e inoculadas com  $10^{6.5}$  DICC 50/ml do vírus. Após um período de 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , foi adicionado MM, e as garrafas foram incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  até apresentação de efeito citopático (ECP), completo. Depois de três ciclos de congelação e descongelação, o fluido de células infectadas com o vírus foi centrifugado a 1.800g por 15 minutos e o sobrenadante centrifugado a 60.000g por 90 minutos em centrífuga\*\*\*\* Beckman modelo C<sup>3</sup> - 50, sob refrigeração. O sedimento final foi suspenso em salina na proporção de 1/10 do volume original, distribuído em alíquotas de 1,8 ml e estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , por um período máximo de 66 dias.

---

\* LIBRO Chemical Co., Inc. New Haven, Connecticut (USA).

\*\* DINATECH Laboratories Inc., Alexandria, Virginia (USA).

\*\*\* EFLAB OY, Helsinki (Finlândia).

\*\*\*\* BECKMAN, Inc., Palo Alto, Califórnia (USA).

### 3.2.1.1.3. Preparação de eritrócitos formolados e taninizados (EFT)

Os eritrócitos colhidos em solução de Alsevaer foram lavados três vezes com PBS pH 7,2 e diluídos para obter-se uma suspensão a 10%. Adicionou-se igual volume de salina formolada a 3%, e a mistura foi incubada em estufa a 37°C por 20 horas. Em seguida foi lavada três vezes com PBS pH 7,2 e o sedimento suspenso a 10%.

A taninização foi feita misturando ácido tânico\* na concentração de 1/20.000 em salina a 0,85% com igual volume da suspensão anterior e estocada a 4°C por um período máximo de 16 dias.

### 3.2.1.1.4. Sensibilização dos EFT pelo Ag (EFT/Ag)

O método de VENGRIS & MARÉ (1971) foi usado para sensibilização dos EFT/Ag.

Três partes do Ag diluído 1/4 em salina a 0,85% foram misturadas com duas partes de PBS pH 6,4 e uma parte de EFT, nesta ordem. Esta mistura foi incubada em BM a 37°C por 30 minutos, lavada três vezes com PBS pH 7,2 e o sedimento suspenso a 2% no diluente. O EFT/Ag foi estocado a 4°C por um período máximo de sete dias.

### 3.2.1.1.5. Tratamento dos hemo-soros

Os hemo-soros foram inativados em BM a 64°C por 30 minutos.

### 3.2.1.1.6. Titulação dos hemo-soros

A titulação dos hemo-soros foi feita em microplacas\*\* de fundo em "V" com diluições duplas de 1/2 a 1/4096 dos

---

\* MERCK Ind. Quim. S/A, Rio de Janeiro (Brasil).

\*\* LIBRO Chemical Co., Inc., New Haven, Connecticut (USA).

hemo-soros em volume de 0,025 ml no diluente, utilizando micropipetas simples e microdiluidores\* de 0,025 ml de capacidade. Em cada poço das respectivas diluições, foi adicionado 0,025 ml de EFT/Ag sendo as placas agitadas e mantidas a 4°C. Controles apropriados de hemo-soros positivo e negativo, EFT/Ag, hemo-soro teste mais EFT/Ag e EFT, foram mantidos nas mesmas condições. Após um período de oito horas, as microplacas foram examinadas, sendo o título expresso na maior diluição do hemo-soro que apresentava aglutinação do EFT/Ag.

#### 3.3.1.2. Soroneutralização (SN)

Foi realizada em microplacas de fundo plano, seguindo a técnica descrita por ROSSI & KIESEL (1971).

Os hemo-soros foram inativados em BM a 56°C por 30 minutos. A titulação foi feita através de diluições duplas de 1/2 a 1/4096 em volumes de 0,025 ml em MEM-Eagle, suplementado com 2% de SFB, adicionando-se igual volume da cepa IBR-LA contendo 200 DICC<sub>50/0,025ml</sub> (doses infecciosas 50% em cultivo de células). A microplaca foi mantida em estufa a 37°C por 12 horas. Em seguida foi acrescentado a cada poço 0,025 ml da suspensão celular em meio de crescimento, suplementado com 8% de SFB. Foram usados controles do meio de crescimento, da suspensão celular e do vírus. A microplaca foi colocada a 37°C em incubador contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A leitura microscópica realizava-se 72 horas após e o título neutralizante era expresso como a recíproca da maior diluição do hemo-soro que neutralizava 200 DICC<sub>50</sub> do vírus.

#### 3.2.1.3. Imunofluorescência direta (IFD)

Para detectar a presença do HVB 1 em cultivo celular MDBK, foi utilizada a prova de imunofluorescência direta (IFD) descrita por SILIM & ELAZHARY (1983).

---

\* DYNATECH Laboratories Inc., Alexandria, Virginia (USA).

### 3.2.2. Isolamento de vírus

Para pesquisa do HVB 1 nos RVV e RP, foi seguido o método desenvolvido por GALVÃO (1984).

### 3.3. Procedimentos estatísticos

#### 3.3.1. Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi estimado por amostragem aleatória simples, aplicando-se a fórmula recomendada pelo CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (1979).

$$n = \frac{p (100 - p) Z^2}{d^2}$$

onde: n = número de amostras a serem testadas;

p = prevalência esperada = 50%;

d = margem de erro esperada = 10%;

Z = grau de confiança = 1,96

$$n = \frac{50 (100 - 50) \cdot (1,96)^2}{100} = 400 \text{ amostras de he-}$$

mo-soros

$$\frac{50 \cdot 100^2}{100}$$

#### 3.3.2. Sensibilidade e especificidade

O cálculo de sensibilidade e especificidade da HAP com relação à prova de SN e o método de isolamento de vírus, foi realizado segundo THORNER & REMEIN (1961). Os dados foram registrados em tabelas de cálculo e processados de acordo com as fórmulas de THORNER & REMEIN (1961) (TAB. I).

TABELA I - Modelo de tabela para cálculo de sensibilidade e especificidade da HAP

HAP	SN ou Isolamento de vírus		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Nota: a = bovinos positivos pela prova  
 b = falsos positivos para a prova  
 c = falsos negativos para a prova  
 d = bovinos não doentes negativos para a prova

$$\text{Sens.} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Esp.} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

#### 4. RESULTADOS

A Figura 1 mostra os estados e zonas fisiográficas, de onde os animais amostrados são provenientes.

##### 4.1. Freqüência de anticorpos

Pela prova de HAP, 280 (70,0%) das 400 amostras de hemo-soros bovinos foram positivas para HVB 1 e pela SN 269 (67,2%) também o foram (TAB. II).

Dos 280 hemo-soros positivos ao teste de HAP, 110 (39,2%) apresentavam título 1/8, 162 (57,8%) tinham variações de 1/16 a 1/64 e apenas 8 (2,8%) amostras apresentavam título  $\geq 1/124$  (TAB. III).

No teste de SN dos 269 hemo-soros positivos, 18 (6,6%) apresentavam título 1/4 e a maioria 251 (93,3%) com título variando de 1/8 a  $\geq 1/124$  (TAB. IV).

##### 4.2. Freqüência de isolamento

Foi isolado o HVB 1 em 21 (77,8%) das 27 amostras de RVV e RP examinadas. O isolamento foi confirmado pela prova de IFD,

##### 4.3. Avaliação da prova HAP

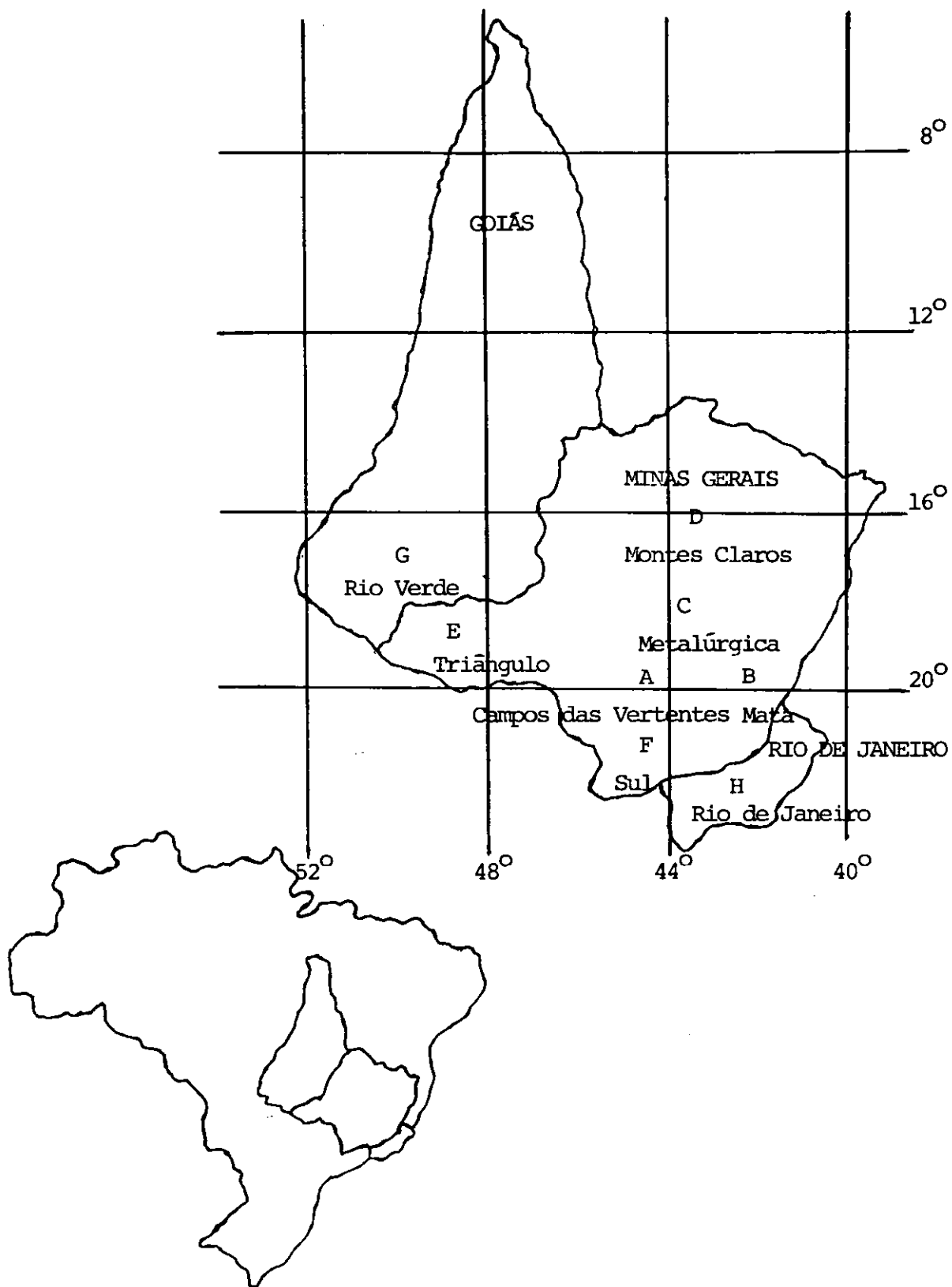


FIGURA 1 - Procedência dos hemo-soros bovinos por estados e zonas fisiográficas.

TABELA II - Frequência de anticorpos contra o HVB 1, através das provas de HAP e SN, em rebanhos bovinos de zonas dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, 1985/86

Estados	Zonas	Número de amostras	HAP		SN	
			Positivo	%	Positivo	%
A) Minas Gerais						
	Campos das Vertentes	58	27	46,6	31	53,4
	Mata	04	04	100,0	04	100,0
	Metalmúrgica	64	32	50,0	37	57,8
	Montes Claros	115	98	85,2	82	71,3
	Triângulo	66	45	68,2	44	66,7
	Sul	10	04	40,0	-	-
B) Goiás						
	Rio Verde	56	48	85,7	49	87,5
C) Rio de Janeiro						
	H	27	22	81,5	22	81,5
	TOTAL	400	280	70,0	269	67,2

HAP = Hemoaglutinação passiva

SN = Soroneutralização

TABELA III - Distribuição de freqüência dos títulos de anticorpos contra o HVB 1, pela prova de HAP, nas zonas amostradas dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, 1985/86

Zonas	Nº de Hemo- soros tes- tados	T í t u l o s									
		0 %	1/2 %	1/4 %	1/8 %	1/16 %	1/32 %	1/64 %	>1/124 %		
A	58	17 29,3	07 12,1	07 12,1	17 29,3	06 10,3	04 6,9	-	-	-	
B	04	-	-	-	02 50,0	02 50,0	-	-	-	-	
C	64	04 6,3	13 20,3	15 23,4	11 17,2	08 12,5	10 15,6	03 4,7	-	-	
D	115	05 4,4	03 2,6	09 7,8	39 33,9	26 22,6	16 13,9	11 9,6	06 5,2	-	
E	66	07 10,6	04 6,1	10 15,2	12 18,2	22 33,3	08 12,1	03 4,5	-	-	
F	10	04 40,0	02 20,0	-	02 20,0	01 10,0	-	01 10,0	-	-	
G	56	04 7,1	02 3,6	02 3,6	23 41,1	13 23,2	04 7,1	06 10,7	02 3,6	-	
H	27	01 3,7	02 7,4	02 7,4	04 14,8	11 40,8	03 11,1	04 14,8	-	-	
TOTAL	400	42 10,5	33 8,2	45 11,3	110 27,5	89 22,2	45 11,3	28 7,0	08 2,0	-	

TABELA IV - Distribuição de frequência dos títulos de anticorpos contra o HVB 1, pela prova de SN, nas zonas amostradas dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro, 1985/86

Zonas	Nº de Hemo- soros tes- tados	T í t u l o s													
		1/2 %	1/4 %	1/8 %	1/16 %	1/32 %	1/64 %	≥128 %							
A	58	27	46,5	04	6,9	08	13,8	07	12,1	07	12,1	05	8,6	-	
B	04	-	-	-	-	-	-	-	-	01	25,0	02	50,0	01	25,0
C	64	27	42,2	02	3,1	09	14,1	10	15,6	08	12,5	04	6,3	04	6,3
D	115	33	28,7	02	1,7	28	24,3	14	12,2	15	13,0	12	10,4	11	9,6
E	66	22	33,3	04	6,1	08	12,1	08	12,1	13	19,7	05	7,6	06	9,1
F	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	56	07	12,5	03	5,4	06	10,7	09	16,0	14	25,0	07	12,5	10	17,9
H	27	05	18,5	03	11,1	05	18,5	07	25,9	07	25,9	-	-	-	-
TOTAL	400	131	32,8	18	4,5	64	16,0	55	13,8	65	16,2	35	8,7	32	8,0

#### 4.3.1. Em relação a prova de SN

Verificou-se, dentro dos hemo-soros analisados pelos dois testes, heterogeneidade de títulos de anticorpos para o HVB 1 variando de 0 a  $\geq 1/128$ . Nos títulos 1/8, 1/16 e 1/32 foram encontrados maiores índices de anticorpos (TAB.III e IV).

A TAB.V mostra os resultados de sensibilidade 73,3% e especificidade 42,4% da prova de HAP quando comparados com a SN.

#### 4.3.2. Em relação ao método de isolamento

A TAB. VI apresenta os resultados da prova HAP, usando-se, como referencial comparativo, o método de isolamento de vírus em cultivo celular MDBK. A HAP apresentou sensibilidade 86,4%, especificidade de 40,0% e concordância de 77,8%.

TABELA V - Avaliação de sensibilidade e especificidade da prova HAP em relação à SN

HAP	SN		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	231	49	280
Negativo	84	36	120
TOTAL	315	85	400

$$\text{Sens.} = \frac{a}{a + c} \times 100 \quad S = \frac{231}{315} \times 100 = 73,3$$

$$\text{Esp.} = \frac{d}{b + d} \times 100 \quad E = \frac{36}{85} \times 100 = 42,4$$

TABELA VI - Avaliação de sensibilidade e especificidade da prova HAP em relação ao método de isolamento de vírus

HAP	Isolamento de HVB 1		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	19	03	22
Negativo	03	02	05
TOTAL	22	05	27

$$\text{Sens.} = \frac{a}{a + b} \times 100 \quad S = \frac{19}{22} \times 100 = 86,4\%$$

$$\text{Esp.} = \frac{d}{b + d} \times 100 \quad E = \frac{2}{5} \times 100 = 40,0\%$$

TABELA VII - Resultados obtidos pelo método de isolamento de vírus e a prova de IFD com as amostras de RVV e RP, e pelas provas de HAP e SN nos respectivos hemo-soros

Número de animais	Isolamento do HVB 1	IFD	Título	
			HAP	SN
01	-	N	1/4	1/2
02	I	P	1/32	1/8
03	I	P	1/16	1/32
04	I	P	1/16	1/16
05	I	P	1/16	1/16
06	-	N	1/4	1/2
07	I	P	1/16	1/16
08	I	P	1/16	1/8
09	I	P	1/16	1/16
10	-	N	1/8	1/8
11	I	P	1/64	1/32
12	-	N	1/16	1/16
13	I	P	1/64	1/16
14	I	P	1/64	1/32
15	I	P	1/64	1/32
16	I	P	1/16	1/32
17	I	P	1/16	1/32
18	I	P	1/2	1/2
19	I	P	1/16	1/8
20	I	P	1/16	1/16
21	I	P	1/8	1/4
22	I	P	1/8	1/4
23	-	N	NR	1/2
24	I	P	1/2	1/2
25	-	N	1/8	1/8
26	I	P	1/32	1/32
27	I	P	1/32	1/4

I = Isolamento

P = Positivo

NR = Não reagiu

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Freqüência de anticorpos

As freqüências 70,0% e 67,2% de anticorpos contra o HVB 1, obtidas respectivamente pelas provas de HAP e SN, foram consideradas expressivas, como demonstra a TAB.II. Resultados aproximados foram conseguidos por GALVÃO (1984) e SURI BABU et alii (1984).

Comparando nossos resultados com aqueles obtidos por LIMA et alii (1977), 42,1% dos animais testados no Município de Lavras - MG foram reagentes ao HVB 1 e LIMA (1978) 6,9 % de animais positivos com títulos  $\geq 1/4$  no município de Três Corações - MG, verificamos divergências entre as freqüências encontradas; estas divergências podem estar ligadas na execução da técnica, que tinha limitações no Brasil e também no tipo de amostragem realizada.

### 5.2. Hemoaglutinação passiva

Analisando as zonas fisiográficas estudadas individualmente através das duas provas, verificou-se que a freqüência de amostras de hemo-soros positivas em seis zonas (A, B, C, E, G e H) foi semelhante, exceto em duas das zonas (D e F), onde este percentual teve grande diferença.

Das 21 cepas de vírus detectadas pelo método de isolamento e comprovadas pela prova de IFD, 19 (90,4%) foram igualmente positivas em suas amostras de hemo-soros correspondentes para a HAP (TAB.VI). Não foi encontrada na literatura disponível trabalho que permitisse comparar esses dados.

Para a sensibilização dos EFT, a diluição do Ag que melhor título obteve com seus recíprocos anti-hemo-soros foi 1/4, concordando com os experimentos de ZYAMBO et alii (1973b).

Com o tratamento dado aos hemo-soros em BM a 64° C por 30 minutos, procurou-se remover as aglutininas não específicas. Devido à inativação de IgM, alguns hemo-soros de altos títulos foram reduzidos em duas casas decimais, mas os de baixos títulos não foram afetados (ZYAMBO et alii, 1973b). No presente trabalho, este tratamento não afetou a positividade dos hemo-soros, ao ponto de torná-los negativos, com a vantagem de eliminar aglutinações inespecíficas.

A incubação da microplaca, em teste, a 37° C produz pobre sedimentação dos eritrócitos nos poços de controle (WHITMAN & HETRICK, 1965; ZYAMBO et alii, 1973b). ZYAMBO et alii (1973b), verificaram que a 24° C a sedimentação dos eritrócitos e os títulos dos hemo-soros são semelhantes aos mantidos a 4° C. No entanto, a incubação a 24° C tem a desvantagem da reação se desfazer após três a quatro horas (WHITMAN & HETRICK, 1965; ZYAMBO et alii, 1973b). Na incubação a 4° C a leitura foi feita de oito a 18 horas, concordando com os achados de WHITMAN & HETRICK (1965), VENGRIS & MARÉ (1971), SHIMIZU et alii (1972), KIRBY et alii (1974), BERRIOS et alii (1983) e SURI BABU et alii (1984) e a reação se manteve por 48-72 horas, semelhante aos descritos por WHITMAN & HETRICK (1965) e ZYAMBO et alii (1973b).

Consideraram-se positivos para a prova de HAP os hemo-soros que, a partir da diluição 1/8 (ZYAMBO et alii, 1973a), apresentavam ao menos 50% de aglutinação dos eritrócitos (KIRBY et alii, 1974; SURI BABU et alii, 1984). Os títulos de anticorpos  $\geq$  1/8 foram confirmados pela prova de SN.

Os títulos dos hemo-soros obtidos pela prova de

HAP na maioria das amostras mantiveram certo equilíbrio com os da SN, não sendo superiores (WHITMAN & HETRICK, 1965; SHIMIZU et alii, 1972; ZYAMBO et alii, 1973a; KIRBY et alii, 1974; SWANEPOEL et alii, 1976), provavelmente devido ao tratamento que foi dado aos hemo-soros (ZYAMBO et alii, 1973a), ou por causa do estágio de infecção nos animais (MAGLIONE et alii, 1971; SHIMIZU et alii, 1972).

Diante dos resultados obtidos, sugerimos para novos trabalhos a sorologia sequenciada em animais infectados naturalmente ou artificialmente.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir:

1. A prova de HAP é tão sensível quanto a SN.
2. A HAP é mais rápida, mais econômica e mais fácil de executar do que a SN.
3. A especificidade da HAP foi menor em relação a SN e ao método de isolamento de vírus.
4. A concordância de 77,8% da HAP com o método de isolamento de vírus foi satisfatória, demonstrando a eficiência da prova.
5. Os altos índices de hemo-soros positivos (70,0%) demonstram que o HVB 1 existe de forma enzoótica em nosso meio.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALICE, F.J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), no Brasil. *Rev. Brasil. Biol.*, Rio de Janeiro, 38(4):919-20, 1978.
2. ALLAN, G.M.; McNULTY, M.S.; McCracken, R.M.; McFERRAN, J. B. Rapid diagnosis of Aujeszky's disease in pigs by immunofluorescence. *Res. Vet. Sci.*, London, 36(2):235-39, 1984.
3. BARTLETT, D.E. Procedures for diagnosing bovine venereal trichomoniasis and handling affected herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 114(866):293-305, 1949.
4. BERRIOS, P.; CELEDÓN, M.O.; IBARRA, L.; ACUNA, M. Respuesta immune humoral de conejos inoculados com vírus herpes bovino tipo 1. Comparación de las pruebas de seroneutralización, fijación del complemento, inmunodifusión y hemaglutinación passiva. *Zbl. Vet. Med. B.*, Hamburg, 30(2):180-88, 1983.
5. BOYDEN, S.V. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Expt. Med.*, New York, 93(2):107-20, 1951.

6. CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES, Ramos Mejia. Procedimientos para estudios de prevalência por nuestro. Ramos Mejia. Buenos Aires, 1979. 35p. (Nota técnica, 18 Rev.1).
7. CHEATHAM, W.J. & CRANDELL, R.A. Occurrence of intranuclear inclusions in tissue cultures infected with virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* New York, 96(3):536-38, 1957.
8. DANNACHER, G. & MARTEL, J.L. Le titrage des anticorps contre le virus de la maladie des muqueses par une microméthode de seroneutralization. *Recl. Méd. Vét.*, Paris, 154(1):31-7, 1978.
9. DANNACHER, G.; PERRIN, M.; PERRIN, B. Utilisation d'une technique d'hémagglutination passive pour la détection des anticorps contre le virus de la rhinotrachéite bovine infectieuse. *Recl. Méd. Vét.*, Paris, 155(7-8):633-37, 1979.
10. DOLL, E.R.; MCCOLLUM, W.H.; WALLACE, M.E.; BRYANS, J. T.; RICHARDS, M.G. Complement-fixation reactions in equine virus abortion. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 14( ):40-5, 1953.
11. ESPINASSE, J.; LE LAYEC, C.; FAYE, P. Hémagglutination passive: application de la méthode au diagnostic sérologique des affections respiratoires virales des jeunes bovins. *Recl. Méd. Vét.*, Paris, 154(3):227-32, 1978.
12. ESTELA, L.A. Application of agar gel technique in the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 28(127):1903-4, 1967.
13. FRENCH, E.L. Relationship between infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus and a virus isolated from calves with encephalitis. *Austr. Vet. J.*, Brunswick, 38(11):555-56, 1962.

14. GALVÃO, C.L. *Diagnóstico da infecção genital do herpesvírus bovino (HVB 1) pelo métodos de isolamento e imunofluorescência direta*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1984, 42p. (Tese M.M.V.).
15. GALVÃO, C.L.; DOREA, J.D.; ALICE, F.J. Anticorpos neutralizantes para o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos no Brasil. *Bol. Inst. Biol.*, Bahia, Salvador, 6 (1):15-25, 1962-63.
16. HOUSE, J.A. & BAKER, J.A. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. *Cornell Vet. Ithaca*, 61(2):320-35, 1971.
17. HUCK, R.A.; MILLAR, P.G.; EVANS, D.H.; STABLES, J.W.; ROSS, A. Penoposthitis associated with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in a stud of bulls. *Vet. Rec.*, London, 88 (12):292-96, 1971.
18. JENNEY, E.W. & WESSMAN, S.J. Microtitration serology methods for bovine virology. In: SEROLOGIC MICROTITRATION TECHNIQUES. Ames, 1978. Ames, National Veterinary Services Laboratories. 1978, p.16-20.
19. KIRBY, F.D.; MARTIN, H.T.; OSTLER, D.C. An indirect haemagglutination teste for the detection and assay of antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Vet. Rec.*, London, 94(16):361-62, 1974.
20. LABADIE, J.P. & TOMA, B. Mise au poin d'une technique hémagglutination passive pour le diagnostic sérologique de la maladie d'Aujeszky. *Red. Méd. Vét.*, Paris, 155(1): 47-55, 1979.
21. LIMA, S.N. *Prevalência de anticorpos contra o herpesvírus bovino -1 (H.V.B. - 1) em bovinos do município de Três Corações Sul de Minas Gerais, Brasil*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1978, 42p. (Tese M.M.V.).

22. LIMA, S.N.; BRAUTIGAM, F.E.; AYCARDI, E. Prevalência de anticorpos contra o Herpes Vírus Bovino - 1 (H.V.P. -1) em bovinos importados da Argentina para a região de Lavras/MG, In: VI ENCONTRO DE PESQUISA, Escola de Veterinária da UFMG, 1977.
23. MADIN, S.H.; YORK, C.J.; MCKERCHER, D.G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science*, Washington, 124(3223):721-22, 1956.
24. MAGLIONE, E.; DECCARIA, E.; ABATE, O. Prova di emoagglutinazione indireta e di eletroforesi sul siero di sangue di vitelli sperimentalmente infecttati col vírus della rinotracheite infettiva (IBR). *Ann. Fact. Med. Vet. Torino*, Torino, 19:67-73, 1971.
25. MCKERCHER, D.G. & WADA, E.M. The virus of infectious bovine rhinotracheitis as a cause of abortion in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 144(2):136-42, 1964.
26. MILLER, N.J. Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 126(9):463-67, 1955.
27. MUELLER, S.B.K.; IKUNO, A.A.; CAMPOS, M.T.G.R.; RIBEIRO, L.O.C. Isolamento e identificação do vírus da rinotracheite infecciosa dos bovinos de um rim de feto de bovino (IBR/IPV). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 45(3):187-90, 1978.
28. PROVOST, A. & DORREDON, C. Infectious keratoconjunctivitis in cattle. *Vet. Rec.*, London, 77(51):1568, 1965.
29. REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimative fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, Baltimore, 27(3) : 493-7, 1938.
30. ROSSI, C.R. & KIESEL, G.K. Microtiter tests for detecting antibody in bovine serum to parainfluenza-3 virus, in-

- fectious bovine rhinotracheitis virus, and bovine virus diarrhea virus. *App. Microbiol.*, Washington, 22(1):32-6, 1971.
31. ROSSKOWSKI, J.; BARTOSZCIE, M.; ZADURA, J.; SWIATEK, Z. Use of immunoenzyme technique for the detection of Aujeszky's disease virus in cell culture. *Vet. Rec.*, London, 102(21):462-463, 1978.
  32. SAXEGAARD, F. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus infection of cattle with particular reference to genital infections. *Vet. Bull. Farnham Royal*, 40(8):605-11, 1970.
  33. SCHIPPER, I.A. & GROW, T.L. Detection of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) by immunofluorescence. *Can. J. Comp. Med.*, Ottawa, 32(4):412-5, 1968.
  34. SHIMIZU, Y.; KAWAKAMI, Y.; ISAYAMA, Y.; MURASE, N.; KAWANO, T. Micro indirect hemagglutination test for detecting antibody against infectious bovine rhinotracheitis virus. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, Tsukuba-Gur, 12(1):1-7, 1972.
  35. SILIM, A. & ELAZHARY, M.A.S.V. Detection of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea viruses in the nasal epithelial cells by direct immunofluorescence technique. *Can. J. Comp. Med.*, Ottawa, 47(1):18-22, 1983.
  36. SMITH, P.C. & STEWART, W.C. Agar-gel immunodiffusion for pseudorabies virus antibody. *J. Clin. Microb.*, Washington, 7(5):423-25, 1978.
  37. STEVENS, J.C. & GROMAN, N.B. Properties of infectious bovine rhinotracheitis virus in a quantitated virus-cell culture system. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 24(103):1158-63, 1963.

38. SURI BABU, T.; MALLICK, B.B.; DAS, S.K. Prevalence of infectious bovine rhinotracheitis virus (BHV 1) antibodies in bovines. *Indian Vet. J.*, Madras, 61(3):195-200, 1984.
39. SWANEPOEL, R.; BLACKBURN, N.K.; WILSON, A. A comparison of methods for demonstrating antibodies to the virus of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. *Br. Vet. J.*, London, 132(4):423-27, 1976.
40. THORNER, R.M. & REMEIN, O.R. *Principles and procedures in the evaluation of screening for diseases*. Washington. United States Government Printing Office, 1961. 24p.
41. VENGRIS, V.E. & MARÉ, C.J. A micro-passive hemagglutination test for the rapid detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Can. Vet. Com. Med.*, Ottawa, 35(4):289-93, 1971.
42. WELLEMANS, G. & LEUNEN, J. La rhinotracheite infectieuse des bovins (IBR) et sa serologie. *Ann. Med. Vet.*, Bruxelles, 117(7):507-18, 1973.
43. WELLEMANS, G.; LEUNEN, J.; LOMBA, F.; GOUFFAUX, M. Le tropisme digestif du virus IBR. *Ann. Méd. Vét.*, Bruxelles, 118(3):175-84, 1974.
44. WHITMAN, J.E. & HETRICK, F.M. An indirect hemagglutination test for detecting antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Cornell Vet.*, Ithaca, 55(4):613-22, 1965.
45. WIZIGMAN, G.; VIDOR, T.; RICCI, Z.M.T. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e da diarreia a vírus-enfermidade das mucosas dos bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Bol. Inst. Pesq. Vet. "Desidério Finamor"*, Porto Alegre, (Esp. 1): 52-8, 1972.

46. ZYAMBO, G.C.N.; ALLAN, P.J.; DENNET, D.P.; JOHNSON, R. H.  
A passive hemagglutination test for the demonstration of antibody to infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. 2. Studies on antibody incidence and the serological response after infection. *Aust. Vet. J.*, Brunswick, 49(9):413-17, 1973a.
47. ZYAMBO, G.C.N.; DENNET, D.P.; JOHNSON, R.H. A passive hemagglutination test for the demonstration of antibody to infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus. *Aust. Vet. J.*, Brunswick, 49(9) : 408-12, 1973b.