

T636.089 69

A553f

2001

**Giovanna Ivo Andrade**

**Padronização da Metodologia Utilizada nas Técnicas de Imunoperoxidase  
em Monocamada de Células e Imunohistoquímica para  
o diagnóstico da Diarréia Bovina a Vírus**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Dra. Zélia Inês Portela Lobato

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária - UFMG**  
**2001**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

27/11/01

1590401-06

0322 - 10660

A553p Andrade, Giovanna Ivo, 1969-  
2001 Padronização da metodologia utilizada nas técnicas de imuno-  
peroxidase em monocamada de células e imunohistoquímica para  
o diagnóstico da diarreia bovina a vírus / Giovanna Ivo Andrade.  
- Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 2001.  
62p.: il.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais, Escola de Veterinária  
1. Bovino - Doenças - Teses. 2. Diarreia em animais - Teses.  
3. Vírus da diarreia em bovino - Teses. 4. Imunohistoquímica -  
Teses. I. Título.

CDD - 636.208 96

Dissertação defendida e aprovada em 31 de julho de 2001, pela Comissão examinadora, constituída por:



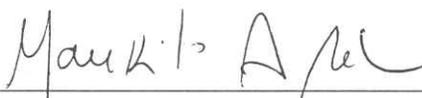
---

Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato  
Orientadora



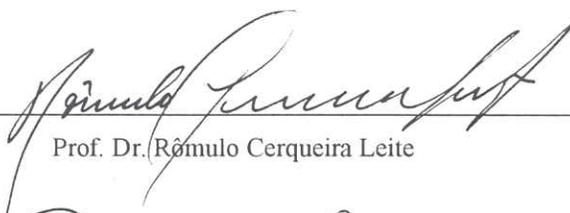
---

Dra. Isabella Bias Fortes Ferraz



---

Prof. Dr. Maurilio Andrade Rocha



---

Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite



---

Profa. Dra. Rogéria Serakides

À  
Dra. Maria Cristina de Oliveira Contigli  
com profunda gratidão e admiração.

Ao meu pai  
Mirabeau Araújo Andrade  
como provedor que foi em vários  
momentos da minha vida.

Ao meu irmão  
Helvécio Ivo Andrade (*in memoriam*)  
com enorme saudade.

*"E ali dentro está a vontade, que não morre. Quem conhece o mistério da vontade, com seu poder? Porque Deus é apenas uma grande vontade que penetra todas as coisas graças à força de Sua aplicação. O homem não se submete aos demônios, nem se rende inteiramente à própria morte, a não ser pela debilidade de sua fraca vontade". (Edgard Allan Poe)*

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Zélia Inês Portela Lobato pela orientação e dedicação, pelo aprendizado e pela amizade sincera durante todo esse período de convivência. “Querida Zélia, muitas vezes obrigada pela sua preocupação, carinho e atenção!”

Aos professores Rômulo Cerqueira Leite e Edel Figueiredo Barbosa com os quais mantive o primeiro contato antes de ingressar na EV como bolsista de aperfeiçoamento.

À professora Edel. F. Barbosa pelo aprendizado da técnica da RT-PCR.

Aos professores do setor de Patologia do Depto de Clínica e Cirurgia Veterinária da EV/UFMG, Rogéria Serakides e Ernane Fagundes do Nascimento pelo auxílio prestado, além da atenção, cordialidade e simpatia com a qual fui recebida neste departamento.

Agradeço especialmente ao Dr. Cláudio Wageck Canal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS, pela doação do anticorpo monoclonal Panpestivirus Mab PP DE9 e a Dra. Maristela Pituco do Instituto Biológico de São Paulo – SP, pela doação do anticorpo monoclonal Mab Px.

Agradeço especialmente ao Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes do “Veterinary Diagnostic Laboratory”, Universidade de Minnesota, pela doação dos controles positivos para a realização da técnica de Imunohistoquímica.

Ao prof. Anílton César Vasconcelos do Depto de Patologia Geral do ICB/UFMG pelo enorme auxílio prestado, atenção e disponibilidade.

Ao prof. Geovanni Dantas Cassali do Depto de Patologia Geral do ICB/UFMG pela colaboração com discussão de protocolos e pela doação do alúmen crômio.

Às técnicas do Laboratório de Histopatologia do Depto. de Clínica e Cirurgia Veterinária da EV/UFMG, Mardelene Geisa Gomes (Méio) e Marilene Campos de Almeida pelo grande apoio, atenção e pelo excelente trabalho prestado. Agradeço mais uma vez à Mardelene que auxiliou-me em todos os momentos, retirando dúvidas, ensinando-me histologia, discutindo técnicas, entre outros.

Ao colega André Almeida Fernandes do Depto de Medicina Veterinária Preventiva pelo belíssimo trabalho fotográfico, disponibilidade e simpatia.

Ao técnico de Laboratório de Histologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG), Rubens (Rubinho).

À grande amiga Andréa Lúcia T. de Souza que me deu o incentivo inicial para realizar a prova de mestrado. Valeu Dedéia!

Aos amigos Aiesca, Marcelo T. Camargo, Josely, Simone Renault (Chuck Line), Rizaldo, Patrícia Pinto, Fábio Viana, Juliana Raquel Pontello, Ana Paula R. Reinato, Cid Bastos, Nelson, Nádia Maria, Cláudio (Aves) e professores Zélia e Andrey da EV/UFMG, principalmente ao amigo José Renato (É poda!), que possibilitaram, com o seu auxílio, a realização da minha primeira matrícula neste Curso de Mestrado.

Agradeço especialmente à Simone Renault (Chuck Line) pelos cuidados, pelo carinho, pelas bobearias, por tudo!

À recente amizade adquirida da Lu (Chuck Lina). “Vamos manter contato, né Lu!”

À amiga Eliane Yorinori pelo enorme carinho e preocupação.

À Ana Paula Belchior pelo bons papos !

Ao colega Ricardo pela ajuda com o inglês, pelo ótimo cafezinho e boas conversas.

À aluna do curso de Medicina Veterinária, Cláudia Vieira Serra pela enorme ajuda com o processamento da técnica de RT-PCR, além da ajuda com a minha gatinha que estava prenha e que deu lindos filhotes.

À amiga Juliana Pontello (Zuuuuuu!!!!!!) pelos ensinamentos de todas as técnicas de rotina utilizadas na virologia, além da sua preciosa amizade.

Às funcionárias do DMVP/EV Doris, Creusa e D. Sônia pela amizade e ajuda em vários momentos.

À funcionária Nádia Maria pela atenção e disponibilidade, além do grande apoio na área de informática, DMVP/EV. Ah! Pelas bobearas também!

Aos funcionários Renata, Luciana, Jorge da secretaria do DMVP/EV pela atenção e cordialidade.

Ao funcionários Wellington e Eduardo do DMVP/EV pela ajuda e disponibilidade.

À Eliane e Nilda da secretaria de Pós-Graduação da EV pela simpatia e disponibilidade de sempre.

A todos àqueles que de alguma forma participaram de mais uma etapa importante da minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante 12 meses do Curso de Mestrado.

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	13
	<b>RESUMO .....</b>	15
	<b>ABSTRACT .....</b>	15
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	16
<b>2.</b>	<b>LITERATURA CONSULTADA .....</b>	16
2.1	Aspectos Gerais da Doença .....	16
2.1.1	Etiologia.....	16
2.1.2	A Diarréia Bovina a Vírus no Brasil .....	17
2.1.3	Sinais Clínicos .....	18
2.1.4	Controle da Diarréia Bovina a Vírus.....	18
2.2	Métodos de Diagnóstico.....	19
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	22
3.1	Padronização do Teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células.....	22
3.1.1	Células .....	22
3.1.2	Teste dos Insumos e da Linhagem Celular Utilizados .....	22
3.1.3	Vírus .....	22
3.1.4	Inoculação do Vírus Padrão no Cultivo Primário .....	22
3.1.5	Métodos de Fixação .....	23
3.1.6	Métodos de Bloqueio .....	23
3.1.7	Reação de Imunoperoxidase em Monocamada de Células .....	23
3.2	Imunoperoxidase em Monocamada de Células conjugada ao Isolamento Viral .....	24
3.2.1	Inoculação Experimental.....	24
3.2.2	Obtenção das Amostras do Bezerro Inoculado Experimentalmente.....	24
3.2.3	Obtenção de Amostras do Feto 1 .....	24
3.2.4	Processamento dos Fragmentos de Órgãos.....	24
3.2.5	Inoculação das Amostras no Cultivo Primário.....	25
3.3	Imunohistoquímica .....	26
3.3.1	Amostras Utilizadas .....	26
3.3.2	Processamento das Amostras.....	26
3.3.2.1	Preparação das Lâminas.....	26
3.3.2.2	Anticorpos Primários e Conjugados.....	26
3.3.2.3	Revelação .....	27
3.4	Observação e Registro dos Resultados.....	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	28
4.1	Teste de Imunoperoxidase em Monocamadas de Células .....	28
4.2	Imunoperoxidase em Monocamada de Células conjugada ao Isolamento Viral .....	35
4.3	Imunohistoquímica .....	37
4.3.1	Reação de Imunohistoquímica.....	37
4.3.1.1	Componentes da Reação.....	37
4.3.2	Achados Histopatológicos.....	41
4.3.3	Distribuição do Antígeno em Controles Positivos .....	45
4.3.3.1	Distribuição do Antígeno em Amostras do Inóculo Experimental e Fetos Suspeitos.....	53
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	58
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	58

---

### LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 -	Classificação dos métodos de fixação utilizados na reação de imunoperoxidase segundo critério de manutenção da estrutura celular.....	29
Tabela 2 -	Classificação dos métodos de bloqueio utilizados na reação de imunoperoxidase em comparação com o controle não bloqueado.....	30
Tabela 3 -	Resultado do Isolamento Viral de segunda e quarta passagens em monocamada de cultivo primário de Pulmão Fetal Bovino das amostras provenientes do animal inoculado experimentalmente e feto 1.....	36
Tabela 4 -	Classificação da reação de imunohistoquímica utilizando-se anticorpo policlonal, kit comercial LSAB e revelação pelos cromógenos DAB e AEC.....	38
Tabela 5 -	Classificação da reação de imunohistoquímica utilizando-se os anticorpos monoclonais Mab PP e Mab Px, "pool" de monoclonais, kit comercial LSAB e revelação pelos cromógenos DAB e AEC.....	39
Tabela 6 -	Resultado da reação de imunohistoquímica em órgãos do bezerro inoculado experimentalmente e fetos suspeitos para a DBV provenientes de aborto.....	53

---

### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 -	Representação esquemática da reação de imunoperoxidase juntamente com os fixadores, bloqueadores, anticorpos primários, conjugados e reveladores utilizados.....	24
Figura 2 -	Representação esquemática dos processos de inoculação viral, obtenção e processamento de amostras do animal infectado experimentalmente e feto 1. ....	25
Figura 3 -	Representação esquemática da reação de imunohistoquímica utilizando os conjugados anti-cabra peroxidase, anti-camundongo peroxidase e proteína G peroxidase .....	27
Figura 4 -	Representação esquemática da reação de imunohistoquímica utilizando o kit comercial LSAB peroxidase.....	28
Figura 5 -	Deteção do vírus da DBV (cepa CP/NADL) pela utilização de anticorpo policlonal e método de Imunoperoxidase em Monocamada de Células de cultivo primário de Pulmão Fetal Bovino. A marcação antígeno-específica citoplasmática apresenta-se de cor vermelha pelo cromógeno AEC. 240X.....	33
Figura 6 -	Controle negativo da reação de Imunoperoxidase em Monocamada de Células de cultivo primário de Pulmão Fetal Bovino. Utilização de anticorpo policlonal e cromógeno AEC. 240X.....	33
Figura 7 -	Deteção do vírus DBV (cepa CP/NADL) pela utilização de anticorpo policlonal e método de Imunoperoxidase em Monocamada de Células de cultivo primário de Pulmão Fetal Bovino. A marcação antígeno-específica citoplasmática apresenta-se de cor marrom-amarelada pelo cromógeno DAB. 270X.....	33
Figura 8 -	Controle negativo da reação de Imunoperoxidase em Monocamada de Células de cultivo primário de Pulmão Fetal Bovino. Utilização de anticorpo policlonal e cromógeno DAB. 270X.....	33

Figura 9 - Secção de intestino mostrando necrose de vilosidades intestinais. Coloração por Hematoxilina-Eosina - HE. 54,1X .....	43
Figura 10 - Visão geral de secção de esôfago com alguns processos histopatológicos. Coloração por Hematoxilina-Eosina - HE. Pontas grandes de setas (>): região de necrose no epitélio pavimentoso estratificado; pontas pequenas de setas (>): hiperemia; seta de cauda longa (⇒): glândulas esofágicas; seta de cauda curta (♣): ducto de glândula esofágica. 54,1X .....	43
Figura 11 Detecção do antígeno viral da DBV pelo método de Imunohistoquímica no citoplasma de células epiteliais das criptas intestinais. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. 54,1X.....	47
Figura 12 - Detalhe de cripta intestinal com células epiteliais marcadas. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. 541,2X .....	47
Figura 13 - Marcação específica de células mononucleares em região de infiltrado inflamatório da mucosa intestinal. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. 270X.....	47
Figura 14 - Secção do esôfago mostrando marcação específica para o antígeno da DBV em células epiteliais da mucosa esofágica. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. Seta indicando célula com marcação específica. 541,2X .....	51
Figura 15 - Glândulas esofágicas e seus ductos com marcação específica para o antígeno da DBV. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. Seta cauda longa (⇒): glândula esofágica; seta cauda curta (♣): conteúdo do ducto de glândula esofágica mostrando marcação específica. 54,1X.....	51
Figura 16 - Granulação citoplasmática característica de imunomarcação específica em secção de língua. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. Seta indicando granulação presente no citoplasma da célula. 1353X.....	51
Figura 17 - Marcação específica de células musculares lisas da parede de vasos sanguíneos na região da submucosa intestinal. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. Seta indicando célula muscular marcada especificamente. 541,2X.....	51
Figura 18 - Marcação específica de células endoteliais de vasos sanguíneo nos septos de conjuntivo presentes entre os feixes de músculo cardíaco. Secção de coração do bezerro inoculado experimentalmente. Setas indicando as células endoteliais marcadas. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. 541,2X ...	55
Figura 19 - Controle negativo da reação de imunohistoquímica em secção de intestino na região de criptas intestinais. Foram mantidos os anticorpos primário e secundário. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. 135,3X.....	55
Figura 20 - Controle negativo da reação de imunohistoquímica em secção de intestino. Visão geral do corte mostrando região mucosa, muscular da mucosa, submucosa e muscular externa. O anticorpo primário foi substituído por PBS. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. 54,1X .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

4-CN: 4- Cloronaftol	LSAB: Biotina-Estreptavidina Marcada
ABC: Complexo Avidina-Biotina	M.O.: Microscópio Óptico
AEC: Aminoetilcarbazol	Mab: Anticorpo Monoclonal
CP: Citopático	MD: Doença das Mucosas
DAB: Diaminobenzidina	MEM: Meio Essencial Mínimo
DBV: Diarréia Bovina a Vírus	NCP: Não citopático
E: Proteína Estrutural	Pab: Anticorpo Policlonal
ECP: Efeito Citopático	PAP: Peroxidase Anti-peroxidase
ELISA: Enzime Linked Immunosorbent Assay	PFB: Pulmão Fetal Bovino
Fc: Região constante das Imunoglobulinas	PI: Persistentemente Infectado
gp: Glicoproteína	RA: Razão de Ampliação
HE: Hematoxilina-Eosina	RNA: Ácido Ribonucléico
IFD: Imunofluorescência Direta	RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase pela
IFI: Imunofluorescência Indireta	Transcriptase Reversa
Ig: Imunoglobulina	SBN: Sobrenadante
IHQ: Imunohistoquímica	SFB: Soro Fetal Bovino
IPM: Imunoperoxidase em Monocamada de	TMB: Tetrametilbenzidina
Células	UV: Ultra-violeta
IV: Isolamento Viral	VDBV: Vírus da Diarréia Bovina a Vírus
LAB: Biotina-Avidina Marcada	

## RESUMO

Esse estudo teve como objetivo a padronização da metodologia de técnicas de diagnóstico para a Diarréia Bovina a Vírus (DBV). Especificamente, duas técnicas foram padronizadas: o ensaio de Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPM) semeadas em microplacas de 96 pocilhos para a identificação de amostras suspeitas processadas no Isolamento Viral (IV) e a técnica de Imunohistoquímica (IHQ) para o diagnóstico etiológico da DBV. O método de IPM identificou com sucesso o VDBV, apresentando melhores resultados com a utilização do calor como agente fixador, a soroalbumina bovina a 4% em PBS como bloqueador e revelação com o cromógeno AEC. Como anticorpos primários, tanto o anticorpo policlonal como o monoclonal puderam ser utilizados com êxito nesta reação. A IHQ detectou satisfatoriamente o vírus da DBV nas secções histológicas e os melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se a combinação de anticorpos monoclonais como anticorpos primários e um kit comercial que utiliza o anticorpo secundário biotilado e estreptavidina conjugada à peroxidase. A melhor revelação foi obtida com o uso do cromógeno DAB.

Palavras-chave: DBV, VDBV, Métodos de Diagnóstico, Imunoperoxidase, Imunohistoquímica, Isolamento Viral.

## ABSTRACT

The aim of this study was to standardize the methodology of diagnosis technics to Bovine Viral Diarrhea (BVD). Specifically, two technics were standardized: Immunoperoxidase in Cell Monolayer Assay (IPMA) in 96 wells microplates for identification of suspect samples in viral isolation (VI) and Immunohistochemistry (IHC) technic for etiological diagnosis of BVD. The IPMA identified BVDV succesfully presenting better results using heat for fixation, BSA 4% solution in PBS like blockage agent and revelation with AEC chromogen. Mabs and Pab, when utilized like primary antibodies, were succesfully used in this reaction. The IHC detected BVDV satisfactorily in histological sections and better results were obtained using Mab like primary antibody and the comercial kit consisting of labelling streptavidin biotin. Better revelation was obtained when using DAB chromogen.

Key-words: BVD, BVDV, Diagnostic Methods, Immunoperoxidase, Immunohistochemistry, Viral Isolation.

## 1. INTRODUÇÃO

A Diarréia Bovina a Vírus (DBV) é uma enfermidade complexa, com uma variedade de sinais clínicos associados à infecção causada pelo vírus da DBV (VDBV). O VDBV está amplamente disseminado na maioria dos países com criação intensiva de bovinos, onde tem gerado impacto econômico significativo devido às perdas reprodutivas e de produção. Em vários países da Europa, como por exemplo, Suécia, Dinamarca e Finlândia, seu impacto na economia foi suficiente para justificar um programa de erradicação da doença. No Brasil, a partir da década de 60, vêm sendo realizados inúmeros estudos que demonstram que o vírus está amplamente difundido no país.

O VDBV é um vírus-RNA de fita simples pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Pestivirus*, assim como os vírus da peste suína clássica e doença das fronteiras em ovinos. Dois biótipos, citopático (CP) e não citopático (NCP) e dois genótipos, tipos I e II são descritos, além da enorme variação antigênica entre as cepas, demonstrada por painel de anticorpos monoclonais. O biótipo não citopatogênico pode infectar o feto e gerar uma prole persistentemente infectada (PI) e imunotolerante ao NCP-VDBV. Os animais PI são a principal fonte de disseminação do vírus e podem desenvolver, após uma infecção pela cepa citopatogênica homóloga, a doença das mucosas (MD), que apresenta altos índices de mortalidade. Infecções pelo VDBV podem resultar, ainda, em imunossupressão, tornando o animal mais susceptível aos patógenos oportunistas, além de gerar falhas na concepção, abortos, mumificação e defeitos congênitos.

Entre as principais medidas de controle da DBV estão a detecção e eliminação de animais PI, vacinação, detecção do vírus em amostras de sêmen e prevenção da transmissão do agente infeccioso via transferência de embriões bovinos. Também, outro grande desafio para os pesquisadores é detectar a presença deste agente no soro fetal bovino e, conseqüentemente, nos cultivos celulares e nas vacinas virais bovinas.

Como a patogenia das infecções pelo VDBV é complexa e resulta em um amplo espectro de condições, variando em severidade de

assintomática a letal, o exame laboratorial das amostras clínicas é necessário para a obtenção do diagnóstico definitivo, tornando, assim, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico para a DBV um componente imprescindível para o controle e prevenção dessa enfermidade.

Inúmeros procedimentos têm sido utilizados para o diagnóstico da DBV. Testes clássicos como a soroneutralização e o isolamento viral em culturas de tecidos, juntamente com a identificação do antígeno pela imunofluorescência e imunoperoxidase, métodos imunohistológicos, vários ensaios de ELISA e a reação da polimerase em cadeia pela transcriptase reversa (RT-PCR) fornecem uma gama de possibilidades para o estudo do VDBV.

O isolamento viral é um método sensível e o mais amplamente utilizado para o diagnóstico etiológico das infecções pelo VDBV. Quando realizado em microplacas um grande número de amostras pode ser testado simultaneamente e a identificação viral feita pelo ensaio de imunoperoxidase ou imunofluorescência. Alguns métodos como a imunohistoquímica e a RT-PCR têm sido desenvolvidos como adjuntos ao isolamento viral para aumentar a rapidez, sensibilidade e praticidade do diagnóstico do VDBV. Assim, este estudo teve como objetivo a padronização de metodologias utilizadas para o diagnóstico etiológico da DBV pela técnica de Imunoperoxidase em Monocamadas de Células (IPM) conjugada ao Isolamento Viral (IV) e pela técnica de Imunohistoquímica (IHQ).

## 2. LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 Aspectos Gerais da Doença

A Diarréia Bovina a Vírus (DBV), causada pelo vírus da diarréia bovina a vírus (VDBV), foi diagnosticada pela primeira vez por Olafson et al. em 1946 e foi descrita como uma doença entérica de bovinos. O VDBV é um patógeno economicamente importante e está amplamente disseminado nas principais regiões do mundo onde há criação de bovinos (Houe, 1999).

#### 2.1.1 Etiologia

Vários autores têm discutido sobre a classificação do VDBV, sua caracterização

molecular, relação com o hospedeiro e relação com outros pestivírus (Donis, 1995; Nettleton & Entrican, 1995; Meyers & Thiel, 1996). O VDBV é um vírus RNA monocatenário, de polaridade positiva, que corresponde morfologicamente a uma partícula esférica de 40-50 nm de diâmetro, constituída por um nucleocapsídeo icosaédrico envolto por um envelope de estrutura lipídica carregado de glicoproteínas. Pertence à família *Flaviviridae* e é membro do gênero *Pestivirus* cuja nomenclatura oficial considera, além do VDBV, mais duas espécies: o vírus da peste suína clássica e o vírus da doença das fronteiras em ovinos (Donis, 1995).

Como resultado de sua multiplicação em células susceptíveis é separado em dois biótipos, citopatogênico (CP) e não citopatogênico (NCP). O biótipo NCP é responsável por mais que 90% das infecções e poderia infectar o feto durante os quatro primeiros meses de gestação, levando ao surgimento de prole persistentemente infectada (PI). Os animais PI representam o principal mecanismo de disseminação do vírus da DBV e, portanto, são considerados como o ponto chave da epidemiologia dessa enfermidade. Estes animais, após sofrerem infecção, ou por uma cepa CP do campo antigenicamente similar ao biótipo NCP persistente ou por uma cepa CP originada de mutação a partir dessa cepa NCP persistente, podem desenvolver a doença das mucosas (MD) aguda ou crônica, uma condição fatal caracterizada, principalmente, por diarreia profusa, além de erosões severas e úlceras na mucosa do trato gastrointestinal (Tremblay, 1996).

Além da divisão em biótipos, o VDBV possui variações genéticas suficientes para apresentar dois genótipos, tipos I e II. O grupo I compreende as cepas clássicas e vacinais; o grupo II inclui, principalmente, isolados provenientes de surtos graves, com presença de síndrome hemorrágica, ocorridos na América do Norte e Grã-Bretanha. Essa classificação baseou-se nos estudos de Pellerin et al. (1994) e Ridpath et al. (1994). Pellerin et al. (1994) provaram que as cepas provenientes de surtos em Quebec, com altas taxas de mortalidade, pertenciam a um grupo distinto ao das cepas clássicas, o qual foi denominado VDBV II. Esse grupo também inclui isolados que causam trombocitopenia, descritos nos Estados Unidos e outros provenientes de surtos na região oeste do

Canadá. Os autores ainda dividem o grupo I em Ia (amostras Oregon, Singer, NADL, SD-1) e Ib (amostras NY-1, Draper, Osloos). Ridpath et al. (1994) identificaram vários vírus como tipo II que foram isolados de animais PI nascidos de fêmeas vacinadas contra VDBV a partir de vacinas produzidas com vírus do tipo I, de surtos de síndrome hemorrágica ou de soro fetal bovino.

A diversidade antigênica dos pestivírus foi estabelecida, inicialmente, por meio de estudos de soroneutralização, mas somente com o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais tornou-se possível defini-la mais precisamente (Edwards & Paton, 1995). Elahi et al. (1997) demonstraram a variação antigênica entre cepas do VDBV empregando um painel de anticorpos monoclonais. Deregt et al. (1998) utilizaram um painel de anticorpos monoclonais contra a proteína gp53/E2 de isolados de VDBV tipo II e demonstraram que os epitopos de gp53/E2 são altamente conservados entre estes isolados, além de comprovar as diferenças antigênicas entre os dois genótipos do VDBV. Deregt & Prins (1998) sugerem o uso de anticorpos monoclonais em lugar dos anticorpos policlonais para a detecção dos genótipos I e II do VDBV.

### 2.1.2 A Diarreia Bovina a Vírus no Brasil

O vírus da DBV foi primeiramente isolado por Vidor em 1974 e, hoje, conta com ampla distribuição nos rebanhos brasileiros (Lemos, 1998). Na tentativa de realizar um controle efetivo da DBV, inúmeros pesquisadores brasileiros têm somado esforços para ampliar o conhecimento acerca dessa doença. Lemos (1998) relata a situação da enfermidade no Brasil desde sua primeira identificação. Canal et al. (1998) encontraram que a prevalência da infecção por esse vírus no Brasil é tão alta quanto a encontrada na Europa e Estados Unidos. Além disso, analisando as sequências de isolados coletados em rebanhos brasileiros, estes autores mostraram que ambos os genótipos de VDBV circulam no país. Confirmando esses achados, Flores et al. (2000) realizaram uma análise filogenética e de sequenciamento em isolados de campo de VDBV provenientes de rebanhos brasileiros. Quatro isolados foram identificados como pertencentes ao genótipo II e revelaram marcada variação antigênica na principal glicoproteína do envelope, a gp53/E2. Segundo

os autores, a identificação do VDBV tipo II no rebanho brasileiro poderia ter importantes implicações em estudos epidemiológicos, de diagnóstico e em estratégias de imunização. Os autores também questionam sobre o grau de proteção das vacinas produzidas a partir de cepas do tipo I, já que os isolados recém-identificados como tipo II, praticamente, não foram neutralizados com o anti-soro proveniente de cepas do tipo I.

Em estudo recente, Kreutz et al. (2000) produziram dois anticorpos monoclonais (Mabs) a partir de três isolados brasileiros de VDBV, antigenicamente distintos dos isolados norte-americanos. Os Mabs foram reativos às proteínas estruturais do VDBV, a gp25/E1 e gp53/E2. Os Mabs foram capazes de reconhecer todos os isolados de VDBV da América do Sul e do Norte testados e falharam no reconhecimento de isolados do vírus da peste suína clássica. Os autores sugerem que esses anticorpos monoclonais podem ser utilizados para o desenvolvimento de testes de diagnóstico, tais como, a imunoperoxidase e o ELISA de captura para a identificação de animais PI em um rebanho e para um rápido diagnóstico diferencial em áreas onde há programas de erradicação da peste suína clássica.

### 2.1.3 Sinais Clínicos

Estudos sorológicos têm demonstrado que a maioria dos bovinos em todo o mundo contrai uma infecção pelo VDBV durante o curso de sua vida e apresentam anticorpos contra o vírus da DBV. Tais anticorpos são induzidos pelo biótipo NCP, demonstrado pela maioria dos isolamentos de casos provenientes do campo. A ausência de doença clínica atribuível ao vírus sugere que grande parte das infecções naturais são subclínicas ou causam somente uma enfermidade leve. Contudo, uma condição clínica grave em bovinos associada ao VDBV foi recentemente descrita e é caracterizada por marcada trombocitopenia e hemorragia (Nettleton & Entrican, 1995; Meyers & Thiel, 1996). Outra condição grave, aguda e, algumas vezes, fatal foi observada em surtos da doença ocorridos entre 1992 e 1993 no Reino Unido e no Canadá, respectivamente. Os sinais clínicos incluíram diarreia, pirexia, redução da produção de leite, altas taxas de morbidade (40%) e altas taxas de mortalidade, próximas a 20% (Baker, 1995).

No campo, ocorrem duas síndromes distintas que, desde sua descrição inicial, permanecem com as mesmas denominações: a diarreia bovina a vírus (DBV) que é uma doença aguda caracterizada por diarreia, pirexia e leve depressão, com alta morbidade e baixa mortalidade e a doença das mucosas (MD), enfermidade aguda ou crônica, caracterizada por baixa morbidade, diarreia profusa, erosões da mucosa, depressão profunda e morte (Nettleton & Entrican, 1995; Meyers & Thiel, 1996).

Infecções de fêmeas gestantes por pestivírus usualmente resultam em doença leve ou inaparente na fêmea. Já a infecção transplacentária, dependendo do período de gestação em que ocorre, pode resultar no nascimento de animais PI, reabsorção fetal, mumificação, aborto, natimortos ou o nascimento de bezerros fracos e de estatura reduzida que poderiam sofrer danos no sistema nervoso central, nos olhos ou na pelagem. Outras infecções podem estar associadas ao VDBV, como é o caso das infecções mistas com outros microrganismos co-infectantes (por exemplo, herpesvírus bovino, *Pasteurella* e *Salmonella* sp.) que podem acarretar síndromes de doença respiratória ou entérica, cuja severidade tem sido maior do que aquela causada por um único agente, o que tem sido atribuído aos efeitos imunossupressores do VDBV (Baker, 1995; Nettleton & Entrican, 1995; Meyers & Thiel, 1996).

### 2.1.4 Controle da DBV

O controle e erradicação da infecção pelo VDBV pressupõe suficiente conhecimento de sua epidemiologia e, particularmente, das fontes de infecção e modos de transmissão. Isso implica na verificação da condição de saúde dos animais que entram no rebanho, principalmente, dos animais PI; do sêmen utilizado para a inseminação artificial, dos procedimentos de transferência de embriões e de vacinas vivas modificadas, além da avaliação minuciosa do soro fetal bovino e linhas celulares frequentemente utilizados em procedimentos laboratoriais e como insumos na indústria farmacêutica.

O primeiro passo para o controle da DBV é a identificação e eliminação de todos os animais PI presentes no rebanho, que representam uma fonte

continua de infecção, já que eliminam o vírus constantemente. Vários métodos de diagnóstico têm sido empregados com esta finalidade e Sandvik (1999) discute as metodologias mais utilizadas para a identificação de animais persistentemente infectados pelo vírus da DBV. Um dos locais apropriados para a detecção de animais PI são os centros de inseminação artificial, onde a avaliação do sêmen de reprodutores é essencial para a eficácia de um programa de controle da DBV, com consequente diminuição das perdas causadas pela enfermidade (Afshar et al., 1991).

Com relação ao controle da DBV realizado por meio da vacinação, Ames & Baker (1990) publicaram extensa revisão sobre o assunto e Van Oirschot et al. (1999) abordaram os esquemas de vacinação mais utilizados, descrevendo os tipos e a qualidade de vacinas para a diarreia bovina a vírus que estão no mercado ou sob desenvolvimento. Leite (1999) discute sobre a utilização da vacinação nos rebanhos brasileiros, recomendando a maneira mais adequada de se vacinar para permitir um controle e equilíbrio da doença dentro do rebanho.

O perigo de contaminação com a cepa NCP do VDBV existe em qualquer procedimento que utilize o soro fetal bovino, como por exemplo, manutenção de cultivos celulares, produção de vacinas e transferência de embriões (Castro et al., 1997). Além disso, os soros de origem bovina também podem apresentar-se contaminados com anticorpos contra o vírus da DBV, caso a infecção venha a ocorrer no último trimestre de gestação (Oliveira et al., 1996). Vários trabalhos citam a importância da detecção de contaminações causadas por vírus ou anticorpos anti-pestivírus. Booth et al. (1995) mostraram o papel das infecções por VDBV nos programas de transferência de embriões bovinos, além da contaminação de soro bovino e, conseqüentemente, dos cultivos celulares. Muñoz et al. (1996) alertaram sobre a contaminação do SFB e cultivos celulares utilizados na indústria farmacêutica pelos pestivírus e consequente contaminação de vacinas e outros produtos biológicos. Zabal et al. (2000) detectaram VDBV em lotes de SFB provenientes de distribuidores locais, na Argentina e laboratórios fornecedores deste insumo.

## 2.2 Métodos de Diagnóstico

Vários métodos laboratoriais têm sido empregados para o diagnóstico da DBV e excelente revisão dessas metodologias é discutida por Sandvik (1999). O isolamento viral é a técnica clássica para o diagnóstico etiológico da DBV, apresentando-se como um teste efetivo e de alta especificidade. As linhagens celulares mais comumente utilizadas para o isolamento do VDBV são as células de rim, baço, testículo, timo e turbinado, todas de origem bovina, mas cultivos primários também podem ser utilizados (Carbrey, 1971). O teste de grande número de amostras pode ser realizado em placas de microtitulação, sendo a detecção feita pelo teste de imunoperoxidase ou imunofluorescência. O isolamento viral realizado em placas identifica com sucesso os animais PI. Tipicamente, os resultados desse teste estão disponíveis dentro de quatro a cinco dias (Brock, 1995; Dubovi, 1996; Sandvik, 1999), mas poderiam demorar semanas para serem obtidos (Laamanem et al., 1997). Uma limitação importante do isolamento viral é a triagem de animais recém-nascidos devido à presença de anticorpos colostrais. Cortese et al. (1998) comentam sobre a inadequação da coleta de amostras de soro e sangue em animais que já ingeriram o colostro e cita trabalhos em que o potencial para resultados falso-positivos no isolamento viral é grande devido à presença de anticorpos colostrais em animais com menos de três meses. Porém, Dubovi (1996) descreve resultados satisfatórios em animais tão jovens quanto três meses. Já Saino et al. (1994) sugerem a utilização da "papa" de leucócitos para a detecção do VDBV pelo teste de imunoperoxidase em animais PI recém-nascidos como uma forma de evitar resultados falso-positivos devido à presença dos anticorpos colostrais.

Aliadas ao isolamento viral, as técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase são utilizadas para a detecção do antígeno do VDBV em cultivo de células (Edwards, 1990; Kirkland & Mackintosh, 1993; Horner et al., 1995; Castro et al. 1997; Dubovi, 1996; Oliveira et al., 1996; Graham et al., 1998), resultando em um método de diagnóstico rápido, eficiente e sensível (Ward & Kaerberle, 1984; Haines & Clark, 1991; Afshar et al., 1991). Como ocorre com os tecidos e órgãos na imunohistoquímica, a monocamada de células pode ser fixada por inúmeros agentes,

como o calor, a acetona, formalina, etanol, entre outros (Lillie, 1947; Thompson, 1966). Em 1984, Meyling descreveu, pela primeira vez, o método de isolamento viral conjugado à imunoperoxidase para a triagem do VDBV de um rebanho (Nettleton & Entrican, 1995). Estas técnicas também podem ser aplicadas como reveladores eficientes em conjunto com outras técnicas de diagnóstico (Ward & Kaeberle, 1984; Haines & Clark, 1991; Haines & Ellis, 1994; Saino et al., 1994; Saliki et al., 1997).

Alguns trabalhos apresentam resultados satisfatórios para a detecção de animais persistentemente infectados pelo VDBV, obtidos a partir da associação entre isolamento viral em microplacas e imunoenaios enzimáticos. Saino et al. (1994) demonstraram que a detecção do antígeno viral do VDBV em "papa" de leucócitos foi eficiente para o diagnóstico de animais PI, recém-nascidos. Segundo Saliki et al. (1997), quando se utiliza soro como amostra a ser testada, a imunoperoxidase conjugada ao isolamento é recomendada para a triagem de todo o rebanho, no intuito de verificar a condição de persistentemente infectado pelo VDBV.

Além de serem utilizados em estudos sobre a variação antigênica de isolados de VDBV, os anticorpos monoclonais (Mabs) têm sido utilizados para fins de detecção desse agente viral e têm substituído eficientemente os anticorpos policlonais (Elahi et al., 1997). Em geral, os anticorpos monoclonais são utilizados em conjunto com algumas técnicas, tais como, imunoperoxidase, imunohistoquímica, ELISA de captura. Exemplo de detecção do VDBV por meio de anticorpos monoclonais foi realizada por Smith et al. (1988) em amostras provenientes de fetos abortados e linfócitos do sangue periférico. Já Cay et al. (1989) demonstraram com seu uso que há grande variação intra-cepas de VDBV provenientes de diferentes laboratórios e com histórias de passagem variadas. Dereg et al. (1990) identificaram o VDBV em cultivo de células, comprovando a eficiência do anticorpo monoclonal para a detecção de contaminação de cultivos celulares pelo vírus da DBV. Dereg & Prins (1998) produziram anticorpos monoclonais com ampla reatividade cruzada, especificidade e avides pelo antígeno viral da DBV e sugeriram a sua utilização em lugar do anti-soro policlonal para estudos de variação antigênica. Dereg et al. (1998) utilizaram um painel de Mabs contra a

proteína gp53/E2 do VDBV tipo II e demonstraram que os epitopos de gp53/E2 são altamente conservados entre os isolados de VDBV tipo II, comumente associados à doença grave ou hemorrágica em bovinos.

Outro método importante para a detecção do VDBV é a imunohistoquímica. A imunohistoquímica é uma técnica relativamente recente e seu impacto na patologia, oncologia e histologia foi devido ao seu elevado nível de especificidade (Elias, 1990). As técnicas de imunohistoquímica são rápidas, sensíveis e práticas (Haines & Ellis, 1994; Baszler et al., 1995; Dubovi, 1996) e para a detecção, vírus viável não é necessário (Haines & Clark, 1991; Haines & Ellis, 1994). Essas técnicas têm sido conduzidas mais rapidamente do que o isolamento viral clássico realizado em cultivo de células (Haines & Ellis, 1994).

Inicialmente, os métodos de imunohistoquímica utilizavam, para a detecção do antígeno, anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína. Bielefeldt-Ohmann & Dalsgaard (1980), localizaram o antígeno da DBV em criosecções de tecido linfóide pela imunofluorescência indireta. Um grande avanço neste sentido foi a detecção do agente baseada na utilização de enzimas (Harlow & Lane, 1988; Haines & Ellis, 1994). Anticorpos marcados com enzimas produzem colorações permanentes, visíveis à microscopia de luz comum, em contraste com as preparações fluorescentes, que são lábeis e visíveis somente com luz UV. Além disso, as marcações realizadas por métodos imunoenzimáticos podem ser contracoradas com reagentes químicos, como por exemplo, a hematoxilina, que permitem o exame simultâneo da histopatologia e da distribuição do antígeno no espécime (Harlow & Lane, 1988; Haines & Ellis, 1994).

Os testes de imunohistoquímica podem ser realizados em secções de tecido congelado, mas devido à preservação precária de detalhes histológicos em criosecções, são rotineiramente realizados em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (Haines et al., 1992; Dubovi, 1996). Outros agentes fixadores podem ser utilizados nos ensaios de imunohistoquímica (Lillie, 1947; Thompson, 1966) e todos podem alterar ou mascarar muitos epitopos importantes para a detecção do antígeno de interesse (Harlow

& Lane, 1988; Elias, 1990; Ramos-Vara & Beissenherz, 2000). A detecção imunológica em tecidos fixados possui algumas vantagens quando comparada às outras técnicas de diagnóstico, como por exemplo, ausência de requerimentos especiais para o transporte do espécime, precisa associação do vírus com células específicas, tecidos e lesões histológicas (Haines et al., 1992), habilidade para detectar antígenos em espécimes estocados possibilitando estudos retrospectivos a curto e longo prazo (Haines & Clark, 1991; Haines et al., 1992; Haines & Ellis, 1994), produção de preparações permanentes (Ward & Kaerberle, 1984; Haines & Clark, 1991; Haines & Ellis, 1994), aumento da sensibilidade no diagnóstico de doenças infecciosas, identificação eficiente de organismos de baixo crescimento ou de difícil identificação pelo isolamento viral ou cultura bacteriológica e redução dos riscos de manuseio de microrganismos que são patógenos potenciais para o homem (Haines & Clark, 1991).

As técnicas de imunohistoquímica ainda obtiveram melhorias com a utilização de sistemas de detecção altamente amplificados como os métodos que utilizam um anticorpo secundário biotinilado ligado à estreptavidina conjugada a moléculas de peroxidase (LAB), o complexo avidina-biotina (ABC) e o método peroxidase-antiperoxidase (PAP) (Harlow & Lane, 1988; Elias, 1990; Prophet et al., 1992; Haines & Clark, 1991; Haines & Ellis, 1994). Segundo Polak & Van Noorden (1986), a disponibilidade de tais métodos altamente sensíveis é de particular relevância quando há necessidade de se localizar antígenos presentes em pequenas quantidades no tecido. Estes autores discutem que devido à sua sensibilidade, estas técnicas possibilitam a redução de ligações inespecíficas porque permitem um aumento na diluição do anticorpo primário e/ou redução no tempo de incubação desse reagente, amplificando a reação. Além disso, consideram os métodos como o LAB e o ABC, técnicas de primeira escolha, definitivamente superiores aos procedimentos tradicionais indiretos de imunoperoxidase ou imunofluorescência.

Elias (1990) inclui três fatores que desempenham um papel crucial no ensaio de imunohistoquímica: a afinidade dos anticorpos aos antígenos fixados na amostra de tecido, a concentração do anticorpo específico e a

concentração do antígeno de interesse. Além disso, este autor informa que a marcação inespecífica pode ocorrer devido a várias causas, sendo a principal o baixo grau de especificidade do anticorpo primário. Dessa forma, o uso de anticorpos monoclonais pode favorecer a especificidade do método (Elias, 1990; Haines et al., 1992; Haines & Ellis, 1994; Baszler et al., 1995).

Recentemente, foi produzido um anticorpo monoclonal, o 15C5, que reconhece um epítipo do vírus da DBV altamente conservado e resistente aos efeitos desnaturantes da fixação pela formalina (Baszler et al., 1995; Dubovi, 1996). Haines et al. (1992) detectaram, com o 15C5, o antígeno viral da DBV em 44 de 45 casos de doença das mucosas. Baszler et al. (1995) provaram que esse anticorpo forneceu maior sensibilidade ao método imunohistoquímico para o diagnóstico de infecções pelo VDBV. Njaa et al. (2000) também utilizaram o Mab 15C5 para o diagnóstico imunohistoquímico de VDBV em secções de pele, obtendo excelente resultado. Outros autores fazem uso dos Mabs como ferramenta fundamental para o diagnóstico imunohistoquímico do VDBV, como Hewicker et al. (1990) que pesquisaram a distribuição do VDBV no sistema nervoso central de 25 bovinos PI.

As técnicas de imunohistoquímica têm proporcionado inúmeras possibilidades de esclarecimentos quanto às síndromes geradas pela infecção pelo VDBV, incluindo a doença das mucosas, aguda ou crônica (Bielefeldt-Ohmann, 1995; Liebler-Tenorio et al., 1997; Taniyama et al., 1999; Liebler-Tenorio et al., 2000), síndrome hemorrágica (Stoffregen et al., 2000), doença respiratória (Baszler et al., 1995), infecções fetais (Muñoz et al., 1996; Fredriksen et al., 1999 a,b), abortos (Baszler et al. 1995; Thür et al., 1997), além de animais PI (Njaa et al. 2000).

Em outros estudos como o de Booth et al. (1995) e Fray et al. (1998), foi demonstrado pela imunohistoquímica o tropismo do VDBV pelo trato reprodutivo e consequente importância do seu controle nos programas de transferência de embriões bovinos. Por sua vez, Grooms et al. (1996) e Grooms et al. (1998) detectaram o VDBV em ovários de fêmeas PI e em ovários de

fêmeas soronegativas que sofreram imunização com vacina viva modificada, respectivamente; estes autores sugeriram que essas mudanças podem reduzir a performance reprodutiva das fêmeas PI, o que ajudaria a explicar as baixas taxas de concepção descritas em rebanhos infectados pelo vírus da DBV.

Através da imunohistoquímica, vários autores analisaram a distribuição do VDBV e seus efeitos no hospedeiro após inoculação experimental de vírus citopático e/ou não citopático, promovendo a doença aguda ou doença das mucosas (Marshall et al., 1996; Spagnuolo-Weaver et al., 1997; Brusckhe et al., 1998; Marshall et al., 1998).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Padronização do Teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPM).

##### 3.1.1 Células

Para a padronização da técnica foi utilizado o cultivo primário de pulmão fetal bovino (PFB). O cultivo de células foi realizado em garrafas "milk" (36cm<sup>2</sup>), semeando-se 50.000 células/cm<sup>2</sup> de PFB em meio essencial mínimo - MEM<sup>1</sup> com 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (2U/ml de Penicilina, 2µg/ml de Estreptomicina, 10µg/ml de Fungizona).

##### 3.1.2 Teste dos Insumos e da Linhagem Celular Utilizados

Utilizou-se SFB<sup>2</sup> previamente testado para VDBV e para anticorpos contra VDBV. Após três passagens, as monocamadas de cultivo primário foram testadas para a presença do VDBV pela RT-PCR "Nested" desenvolvida pelo Laboratório de Microrganismos Intracelulares<sup>3</sup>, pela técnica de IFD<sup>4</sup>, utilizando anticorpo policlonal anti-DBV de origem suína<sup>5</sup>

e pela técnica de IFT<sup>4</sup>, utilizando o anticorpo monoclonal Panpestivirus anti-DBV DE9 (Mab PP)<sup>6</sup>, além dos Mabs 31, 37, 39, 42 e 45<sup>7</sup>.

##### 3.1.3 Vírus

Para o inóculo em monocamada de células foram utilizadas as cepas de referência citopatogênica (CP), NADL 1422<sup>8</sup> de terceira passagem em PFB (10<sup>5,2</sup> Dose Infectante em Cultivo de Células - DICC/50µl) e não citopatogênica (NCP), NY-1 524<sup>8</sup> de segunda passagem em PFB (10<sup>6</sup> DICC/50µl).

##### 3.1.4 Inoculação do Vírus Padrão no Cultivo Primário

Após a quarta passagem do cultivo primário de PFB em garrafas, a cultura celular foi semeada em placas de 96 pocilhos na concentração de 50.000 células/cm<sup>2</sup> em MEM com 5% de SFB. As placas foram levadas à estufa de CO<sub>2</sub> e mantidas a 37°C por 12 horas. A partir de uma confluência de 80-90% da monocamada de células foi feita a inoculação viral. O meio foi retirado e, então, quatro fileiras alternadas das placas de 96 pocilhos foram lavadas com PBS por três vezes. Inoculou-se 50µl por pocilho do vírus diluído 1:10 em MEM sem SFB. A adsorção viral ocorreu por 1h a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> e após esse período foram adicionados 100µl por pocilho de MEM com 2% de SFB. As placas foram, então, levadas novamente à estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. No período de 24 - 48h, após o aparecimento de efeito citopático (ECP) de 40 a 50% (cepa CP/NADL 1422), a monocamada de células foi fixada por diferentes métodos e bloqueada com diferentes soluções, conforme itens 3.1.5 e 3.1.6. As células inoculadas com a amostra NCP foram incubadas por quatro dias, quando, então, foram realizados os passos de fixação e bloqueio. As quatro fileiras alternadas restantes serviram como controle negativo contendo apenas a monocamada celular não inoculada.

<sup>1</sup> SIGMA, Cat. n° M 0643

<sup>2</sup> GIBCO BRL, Cat n° 10270-106

<sup>3</sup> ICB/UFMG - Depto. de Microbiologia, Av. Antônio Carlos, 6627, CP 486, CEP:31270-910

<sup>4</sup> EV/UFMG - Depto. de Medicina Veterinária Preventiva, Av. Antônio Carlos, 6627, CP 567, CEP: 30123-970

<sup>5</sup> VMRD, Cat. N° 210-61-BVD

<sup>6</sup> Gentilmente cedido pelo Dr. Cláudio Wageck Canal, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRS

<sup>7</sup> Gentilmente cedidos pelo LARA - Laboratório de Referência Animal/MAAB

<sup>8</sup> ATCC - American Type Culture Collection

### 3.1.5 Métodos de Fixação

Foram utilizados quatro tipos de fixadores:

#### A. Calor a 80°C

Na fixação pelo calor, retirou-se o meio das placas, descartando-o em solução de hipoclorito a 3%, em capela de fluxo laminar. As placas foram imersas em solução salina 0,15M/Tween 80 0,05% por três vezes e o excesso dessa solução foi retirado, batendo-se a placa, vigorosamente, em papel toalha. As placas permaneceram a 80°C por 1 h em estufa, sendo posteriormente embaladas em papel alumínio e mantidas a 4°C.

#### B. Acetona a 20% em PBS

No método de fixação pela acetona, os procedimentos de descarte do meio e lavagem das placas foram os mesmos utilizados para a fixação pelo calor. Após estas etapas, adicionou-se 100µl por pocilho de acetona a 20% em PBS por 10 minutos à temperatura ambiente. O fixador foi retirado com o auxílio de bomba de vácuo e as placas foram mantidas em estufa a 37°C, por 3 – 4 h. As placas foram embaladas em papel alumínio e mantidas a 4°C. Esse método de fixação baseou-se em ensaios previamente descritos (Oliveira et al., 1996; Elahi et al., 1997).

#### C. Formalina a 3% em PBS

Seguiu-se o método descrito por Kirkland & MacKintosh (1993) com modificações. Adicionou-se quantidades iguais de formalina a 3% em PBS (100µl/pocilho) ao volume de meio presente nos pocilhos, por 15 minutos à temperatura ambiente. O meio acrescido do fixador foi retirado com o auxílio de bomba de vácuo e, então, realizou-se o procedimento de lavagem como descrito anteriormente para os métodos de fixação pelo calor e acetona. As placas permaneceram à temperatura ambiente por 12 horas e, em seguida, foram embaladas em papel alumínio e mantidas a 4°C.

#### D. Paraformaldeído a 4% em PBS

Utilizou-se o mesmo procedimento descrito para a fixação pela formalina a 3% em PBS.

### 3.1.6 Métodos de Bloqueio

Os bloqueios de ligações inespecíficas foram realizados com leite em pó desnatado comercial a 5% em PBS, gelatina<sup>9</sup> a 1% em PBS e soro albumina bovina<sup>10</sup> a 4% em PBS, além de monocamadas não bloqueadas que serviram como controle negativo. Foram utilizados 100µl por pocilho de cada bloqueador, sendo que, nos pocilhos onde não ocorreu o bloqueio, adicionou-se 100µl de PBS. O tempo de bloqueio foi de 30 minutos em estufa a 37°C. O procedimento de lavagem ocorreu como descrito para os métodos de fixação. O método baseou-se na descrição de trabalhos anteriores (Kirkland & Mackintosh, 1993; Elahi et al., 1997).

### 3.1.7 Reação de Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPM)

As monocamadas infectadas como descrito em 3.1.4 e fixadas e bloqueadas como descrito em 3.1.5 e 3.1.6, respectivamente, foram submetidas à reação de imunoperoxidase (Figura 1). Utilizou-se o anticorpo monoclonal Panpestivírus anti- DBV DE9 (Mab PP) diluído 1:20, 1:40, 1:100 e 1:400 em PBS. A reação também foi testada utilizando-se diluições de 1:50 a 1:1000 do anticorpo policlonal anti-DBV de origem caprina (Pab)<sup>11</sup>. Em placas de 96 pocilhos, adicionou-se 30µl, em duplicata, de cada diluição dos anticorpos primários utilizados por pocilho. O tempo de incubação após a adição dos anticorpos monoclonais e policlonal anti-VDBV foi de 1h em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. As placas foram, então, lavadas com salina 0,15M/Tween 80 a 0,05% por três vezes. Após esta etapa adicionou-se os respectivos conjugados e houve nova incubação com duração de 45 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. O conjugado anti- IgG camundongo-peroxidase produzido em coelho<sup>12</sup> foi diluído 1:100 e 1:200 em PBS e o conjugado anti- IgG caprino peroxidase produzido em coelho<sup>13</sup>, diluído em 1:50 em PBS, adicionando-se 30µl por pocilho de cada diluição. Repetiu-se o procedimento de lavagem.

<sup>9</sup> REAGEN, Cat. n° 10393

<sup>10</sup> SIGMA, Cat n° b 4287

<sup>11</sup> VMRD, Cat. n° 210-70-BVD

<sup>12</sup> SIGMA; Cat. N° A-9044

<sup>13</sup> SIGMA; Cat. N° A-5420

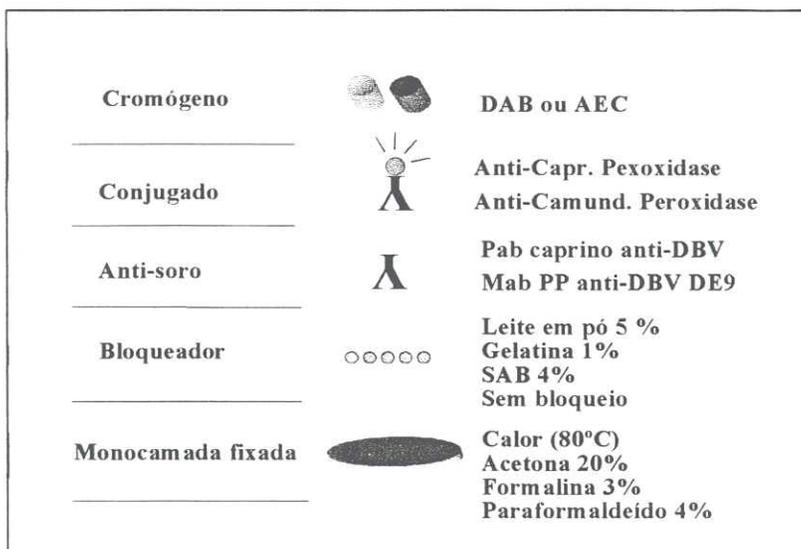


Figura 1: Representação esquemática da reação de imunoperoxidase mostrando os fixadores, bloqueadores, anticorpos primários, conjugados e cromógenos utilizados.

A reação foi revelada pela adição de 30µl por pocilho do substrato 3-amino-9-etil-carbazol (AEC)<sup>14</sup> ou 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB)<sup>15</sup> por um período de 2 a 10 minutos, à temperatura ambiente. A reação de IPM baseou-se em ensaios previamente descritos (Afshar et al., 1991; Elahi et al., 1997).

### 3.2 Imunoperoxidase em Monocamada de Células conjugada ao Isolamento Viral

#### 3.2.1 Inoculação Experimental

Para a obtenção de controle positivo, inoculou-se experimentalmente um bezerro recém-nascido, sem ingestão de colostro e soronegativo para DBV (testado pelo ensaio de soroneutralização), com 2 ml da cepa citopatogênica, CP/NADL 1422 de terceira passagem em PFB (TCID<sub>50</sub> = 10<sup>5,2</sup>/50µl) e 2 ml da cepa não citopatogênica, NCP/NY-1 524 de segunda passagem em PFB (TCID<sub>50</sub> = 10<sup>6</sup>/50µl) pela via intranasal e 4 ml de cada cepa por via oral. O animal foi acompanhado para observação de sinais clínicos, quando foi então sacrificado por choque elétrico sete dias pós-infecção e realizada a necrópsia.

<sup>14</sup> Gentilmente cedidos pelo LARA - Laboratório de Referência Animal/MAAB

<sup>15</sup> Kit Substrate DAB Peroxidase - VECTOR

#### 3.2.2 Obtenção de Amostras do Bezerro Inoculado Experimentalmente

Para o isolamento viral foram coletados fragmentos de fígado, pulmão, baço, esôfago, linfonodos axilar e mesentérico, intestino e traquéia. As amostras foram mantidas a - 80°C até o processamento.

#### 3.2.3 Obtenção de Amostras do Feto 1

Amostras de um feto abortado com suspeita clínica para a DBV foram trazidas ao laboratório, identificadas como feto 1 e congeladas a - 80°C. Retirou-se deste material fragmentos de pulmão, coração, rim e fígado.

#### 3.2.4 Processamento dos Fragmentos de Órgãos

Os fragmentos de órgãos do bezerro inoculado experimentalmente e do feto 1 foram descongelados e mantidos em banho de gelo durante o procedimento realizado em fluxo laminar. A partir da inoculação experimental, pequenas partes de cada órgão foram maceradas separadamente em graal e pistilo com adição de areia estéril.

Para o feto 1, vários fragmentos de órgãos foram agrupados em duplicata e em seguida macerados. Adicionou-se ao macerado PBS tratado com antibióticos (penicilina e estreptomicina) (Penicilina 200 u/ml; Estreptomicina 200 µg/ml) até a obtenção de uma suspensão de 20%. A mistura foi transferida para tubos estéreis e mantida a 4°C por 12 horas. Em seguida centrifugou-se a mistura a 3076 x g<sup>16</sup>, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi vertido em tubo estéril e mantido a - 80°C.

A Figura 2 mostra em esquema todo o procedimento descrito acima, desde a inoculação experimental até o processamento dos fragmentos de órgãos.

### 3.2.5 Inoculação das Amostras no Cultivo Primário

Para a inoculação das amostras utilizou-se o cultivo primário de PFB, semeando-se em placa de 96 pocilhos 50.000 células/cm<sup>2</sup> em MEM com 5% de SFB, sendo a confluência de 80 a 90% atingida em 24h.

Como inóculo, utilizou-se as amostras provenientes do sobrenadante resultante do macerado de órgãos (3.2.4). A diluição das amostras foi de 1:10 em 200µl de MEM sem SFB e o inóculo foi feito em 4 repetições de 20µl por pocilho, por amostra. Lavou-se rapidamente a monocamada de células com PBS por três vezes e, então, foram adicionadas as amostras que sofreram adsorção durante 1h a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>. Após adsorção, adicionou-se meio MEM suplementado com 2% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> e monitoradas por quatro dias. Duas placas foram congeladas a - 80°C para utilização em passagens posteriores e duas foram fixadas para a identificação viral através da técnica de IPM (3.1.7). O isolamento viral prosseguiu na terceira e quarta passagens, descongelando-se e congelando-se por três vezes as placas mantidas a - 80°C e inoculando-se cada uma das repetições em nova monocamada de células, como descrito anteriormente.

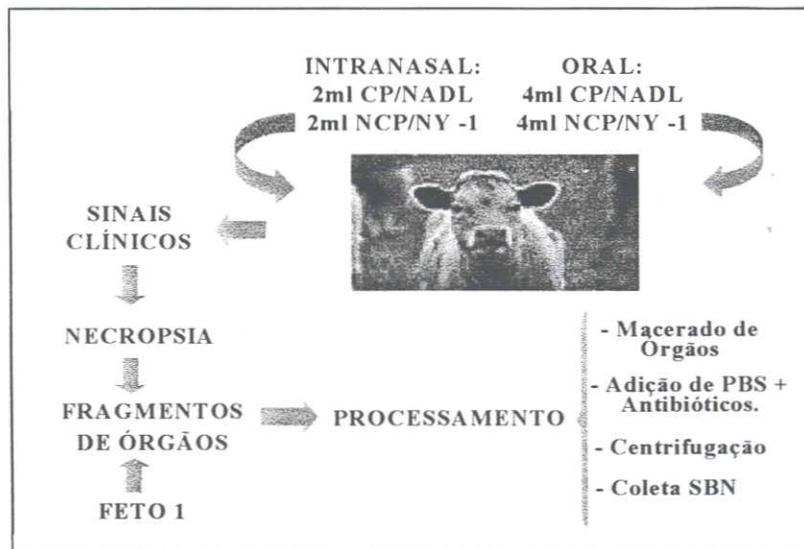


Figura 2: Representação esquemática dos processos de inoculação viral, obtenção e processamento de amostras do animal infectado experimentalmente e feto 1.

<sup>16</sup> Centrifuga CR 4 22 – Jouan; Rotor C/G4.22

### 3.3 Imunohistoquímica (IHQ)

#### 3.3.1 Amostras Utilizadas

Do animal inoculado experimentalmente descrito no item 3.2.1, foram retirados pequenos fragmentos de aproximadamente 1 cm de diâmetro e 0,3 cm de espessura do intestino, linfonodos, língua, baço, pulmão e coração. Foram coletados fragmentos de órgãos do feto<sup>1</sup>, descrito em 3.2.3 e amostras de um feto (feto 2) também proveniente de caso de aborto com suspeita clínica para DBV. Esse feto chegou ao laboratório já fixado em solução de formol a 10% e, portanto, não pôde ser utilizado para o isolamento viral realizado anteriormente. Todas as amostras foram fixadas em solução de formol a 10% e processadas segundo técnicas histológicas de rotina (Luna, 1968).

Controles positivos, incluídos em parafina<sup>17</sup> provieram de uma novilha holandesa com lesões macroscópicas características de doença das mucosas (MD) e incluíram secções de intestino delgado, esôfago, orofaringe e língua. O diagnóstico deste animal foi previamente confirmado pela técnica de imunohistoquímica no laboratório de origem. Para a histopatologia as secções de controles positivos e amostras obtidas foram coradas por Hematoxilina-Eosina.

Controles negativos da prova foram obtidos a partir de fragmentos de intestino, esôfago e língua de animais de abatedouro, negativos ao teste de RT-PCR "Nested" já citado. Além disso, substitui-se o anticorpo primário por PBS em secções de controle positivo a fim de verificar as marcações inespecíficas.

#### 3.3.2 Processamento das Amostras

##### 3.3.2.1 Preparação das Lâminas

Adotou-se o protocolo de imunohistoquímica em parafina, utilizado pelo "Veterinary Diagnostic Laboratory", Universidade de Minnesota, com modificações e descrição detalhadas a seguir. Para maior aderência aos cortes, inicialmente, as lâminas foram preparadas com uma solução de

gelatina a 0,5% e sulfato de cromo III de potássio (alúmen cromo) a 0,05% em água destilada. Mergulhou-se as lâminas, rapidamente, por duas vezes em água destilada e, em seguida, na solução preparada durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Então, foram deixadas por 24 h à temperatura ambiente para secar. Desparafinizou-se os cortes em quatro banhos de xilol com duração de 3 minutos cada. A remoção do xilol foi feita pela imersão dos cortes em álcool absoluto e hidratação em soluções alcólicas decrescentes de 90%, 80% e 70%, durante 3 minutos cada, seguida pela imersão em água destilada por 3 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em solução de peróxido de hidrogênio a 30% em PBS por 30 minutos. Lavou-se em água corrente por 10 minutos, seguido de lavagem com PBS, por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada por digestão enzimática com proteinase K<sup>18</sup> a 0,05% em tampão fosfato 0,1 M por 5 minutos a 37°C. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com solução de soro albumina bovina a 4% em PBS, com os tempos de incubação de 10 minutos à temperatura ambiente ou 30 minutos a 37°C quando em uso de anticorpos monoclonais e 10 minutos à temperatura ambiente e 30 minutos ou 1 hora a 37°C para anticorpo policlonal, seguido de lavagem com PBS.

##### 3.3.2.2 Anticorpos primários e conjugados

Foram utilizados dois anticorpos monoclonais, o Panpestivírus anti-DBV DE9 (Mab PP) e anticorpo monoclonal Px (Mab Px)<sup>19</sup>, subclasse IgG1, dirigido contra a principal glicoproteína do envelope viral do VDBV, gp53/E2, um "pool" destes dois anticorpos monoclonais e anticorpo policlonal anti-DBV de origem caprina (Pab). Adicionou-se aos cortes os anticorpos primários diluídos em PBS em várias concentrações. O Mab PP foi utilizado nas diluições de 1:30, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300 e 1:400 em PBS; o Mab Px foi diluído em PBS nas concentrações de 1:100, 1:400, 1:600 e 1:1000, enquanto o "pool" dos anticorpos monoclonais foi diluído a 1:200. A diluição do Pab variou de 1:300 a 1:32000. Os anticorpos monoclonais foram incubados por 40 minutos em câmara úmida e à temperatura

<sup>17</sup> Doados pelo "Veterinary Diagnostic Laboratory", Universidade de Minnesota, por intermédio do Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes.

<sup>18</sup> GIBCO BRL, Cat. n° 25530-015

<sup>19</sup> Gentilmente cedido pela Dra. Maristela Pituco, Instituto Biológico - SP

ambiente, enquanto o anticorpo policlonal, além da incubação anterior foi testado com incubação por 12h a 4°C, em câmara úmida. Após lavagem com PBS durante 5 minutos, utilizou-se o kit biotina – estreptavidina conjugada à peroxidase<sup>20</sup> com tempos de incubação com o anticorpo secundário biotinilado e reação com a estreptavidina de 15 minutos cada, alternados pelo procedimento de lavagem. Também foram utilizados como anticorpos secundários os conjugados anti-camundongo peroxidase, anti-cabra peroxidase e proteína G peroxidase<sup>21</sup> diluídos em 1:100 e 1:200; 1:200; 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800 e 1600, respectivamente. Estes foram adicionados aos cortes sofrendo incubação por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente seguido de nova lavagem com PBS.

### 3.3.2.3 Revelação

A revelação da reação de IHQ foi realizada com a utilização de dois cromógenos, o DAB e o AEC. Adicionou-se aos cortes o cromógeno

3-amino-9-etil-carbazol (AEC) durante 7 a 15 minutos, lavando-se em seguida em água corrente por 5 minutos. Foi feita a imersão em Hematoxilina de Mayer por 45 segundos, seguida de nova lavagem em água corrente por 5 minutos. A montagem das lâminas foi feita em meio aquoso (Prophet et al., 1992). Na revelação por 3,3 diaminobenzidina tetrahydrocloroeto (DAB) fez-se a coloração contraste com Hematoxilina de Mayer, como realizado com o cromógeno anteriormente utilizado. Em seguida foram realizados passos de desidratação em concentração de álcoois crescentes (1 minuto cada) e xilol (1 minuto). O tempo de incubação com o cromógeno DAB foi o mesmo utilizado para o AEC. Após revelação pelo DAB, foi feita a montagem das lâminas utilizando-se Bálsamo do Canadá natural.

Nas Figuras 3 e 4, representação esquemática da reação de imunohistoquímica com os conjugados anti-camundongo peroxidase, anti-cabra peroxidase, proteína G peroxidase e o kit comercial LSAB, respectivamente.



Figura 3: Representação esquemática da reação de imunohistoquímica utilizando os conjugados anti-cabra peroxidase, anti-camundongo peroxidase e proteína G peroxidase.

<sup>20</sup> Large Volume DAKO LSAB+Kit, Peroxidase K0690

<sup>21</sup> SIGMA; Cat. P-8170

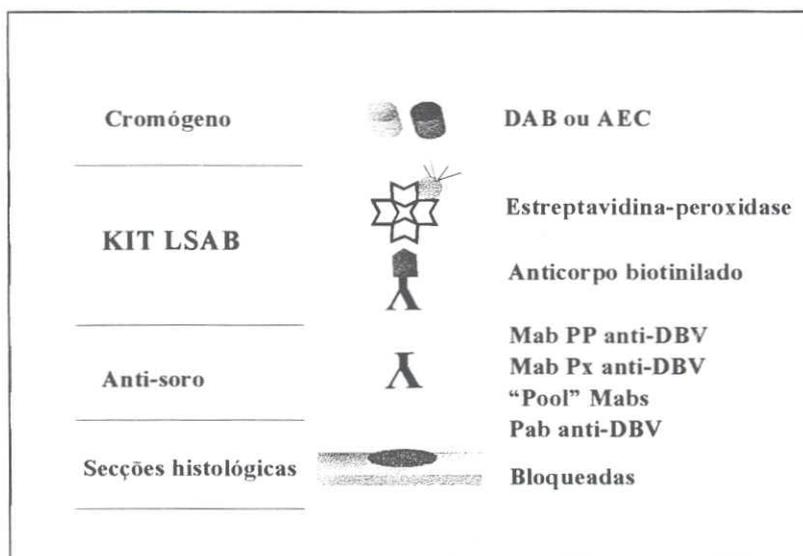


Figura 4: Representação esquemática da reação de imunohistoquímica utilizando o kit comercial LSAB peroxidase.

### 3.4 Observação e Registro dos Resultados

As comparações entre fixadores e bloqueadores, substratos DAB e AEC no ensaio de IPM foram realizadas pela observação ao microscópio óptico (M.O.) de luz invertida Leitz Diavert (ocular projetiva = 3,3 vezes) e M.O de luz invertida Olympus IX 50 - S1F (ocular projetiva = 5,5 vezes) e registros foram feitos através de câmera fotográfica Olympus PM-6 (Filme Kodak Pro-Image, asa 100). A leitura das lâminas de IHQ foi feita em M.O. de luz invertida/fluorescência Olympus BH2 - RFCA (ocular projetiva = 5,5 vezes) e registros foram realizados através de câmera fotográfica Olympus PM-10AD (Filme Kodak Pro-Image, asa 100). O cálculo da ampliação das imagens foi feita pela multiplicação da objetiva x valor da ocular projetiva x razão da ampliação (RA = ampliação do filme/ampliação do negativo).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPM)

O cultivo primário de PFB foi extremamente sensível ao vírus da DBV e apresentou facilidade de cultivo com bom crescimento da quarta à

décima segunda passagem. As células de cultivo primário de PFB tiveram suas passagens monitoradas constantemente para certificar-se da ausência de contaminação por este agente viral, resultando em grande atraso na padronização da técnica de IPM, além de gastos com técnicas mais refinadas, como a RT-PCR. Quando alguma contaminação era detectada as células de cultivo primário eram descartadas, o que acarretava a produção de novos lotes dessa célula, com novo monitoramento e que poderiam apresentar os mesmos riscos de contaminação dos lotes anteriores.

As culturas de células mais adequadas para a propagação do VDBV são aquelas derivadas de tecidos bovinos. Os cultivos primários podem ser empregados mas podem estar contaminados, principalmente, pelas cepas NCP de VDBV devido à grande prevalência desses agentes nos rebanhos. Linhagens celulares contínuas apresentam menor susceptibilidade ao vírus, mas são mais seguras e consistentes em seu crescimento (Carbrey et al., 1971).

Em relação aos métodos de fixação, o calor a 80°C foi considerado o melhor método, seguido pela fixação em acetona a 20% em PBS. Ambos os métodos mantiveram a estrutura celular, o que

não ocorreu com os outros dois fixadores, a formalina a 3% e o paraformaldeído a 4% em PBS. Na Tabela 1 é mostrado o resultado da fixação da monocamada de células de PFB. Observou-se que o calor preservou bem a estrutura celular, provocando apenas um leve encolhimento das células. Com a fixação pela

acetona, a única alteração visível foi um arredondamento das células. Os outros dois fixadores praticamente destruíram a monocamada de células e provocaram um alongamento intenso da região citoplasmática e nuclear.

Tabela 1: Classificação dos métodos de fixação utilizados na reação de imunoperoxidase segundo critério de manutenção da estrutura celular.

Fixador	Calor a 80°C	Acetona a 20% em PBS	Formalina a 3% em PBS	Paraformaldeído a 4% em PBS
Manutenção da estrutura celular	++	++	+	+

++ = preservação da estrutura celular com poucas alterações

+ = preservação precária com modificação intensa na estrutura celular

A fixação é um processo que tenta preservar as células em seu estado nativo em relação ao tamanho, morfologia e a localização dos constituintes químicos (Lillie, 1947). Além disso, a fixação deve prevenir a perda do antígeno, permeabilizar a célula para permitir acesso livre aos anticorpos e manter o antígeno de forma que ele possa ser reconhecido eficientemente pelo anticorpo. Em geral, os métodos de fixação podem ser divididos em duas classes: solventes orgânicos ou reagentes coagulantes e reagentes de "cross-linking" ou não coagulantes. Os primeiros, tais como metanol, etanol e acetona, removem lipídeos dos tecidos e distorcem severamente a estrutura terciária das proteínas, causando a sua precipitação e, por isso, também são usualmente chamados de agentes precipitantes (Polak & Van Noorden, 1986; Harlow & Lane, 1988). Aparentemente, a dissolução de lipídios de membrana pela fixação pelo álcool facilita a penetração do anticorpo, amplificando a imunomarcagem (Elias, 1990). Os não coagulantes, como o formaldeído, formam pontes intermoleculares que criam uma rede de proteínas antigênicas ligadas. O mecanismo exato pelo qual o formaldeído atua como agente fixador não está totalmente estabelecido, mas envolve a reação cruzada de sítios reativos dentro da mesma proteína e entre diferentes proteínas via pontes de metileno (Ramos-Vara & Beissenherz, 2000). Essas reações modificam as estruturas terciária e quaternária das proteínas mas não as estruturas primárias e secundárias. Portanto, ambas as classes de fixadores podem alterar ou mascarar muitos epitopos (Harlow &

Lane, 1988; Elias, 1990). Assim, a fixação deve ser estudada particularmente para os antígenos e anticorpos primários que estão sendo pesquisados, de forma que o regime de fixação aplicado evite o aparecimento de reações falso-negativas (Elias, 1990).

Pelos resultados obtidos neste experimento, o calor apresentou os requerimentos necessários ao que se propõe a fixação, como discutido acima. Além disso, o calor apresentou-se como o método de fixação mais rápido e, visando utilizá-lo em procedimentos de rotina, pode ser considerado como o mais vantajoso. Segundo Lillie (1947) e Thompson (1966), o calor é um fixador que preserva a morfologia dos componentes do tecido, além de ser um método rápido de fixação, congruente com os achados deste estudo. A fixação pelo calor geralmente é utilizada quando se deseja evitar a introdução de substâncias químicas no material a ser fixado. O calor atua como um fixador por coagular as proteínas (Lillie, 1947; Thompson, 1966) e, portanto, também poderia alterar vários dos epitopos conformacionais do VDBV. Entretanto, a partir dos resultados obtidos, sugere-se que, mesmo ocorrendo alguma alteração em um ou vários dos epitopos do VDBV, naqueles epitopos para os quais os anticorpos utilizados eram específicos, não houve alteração conformacional por este método de fixação ou a modificação foi insuficiente para resultar em dano estrutural.

O método de fixação pela acetona a 20% em PBS, apesar do ótimo resultado obtido, não foi escolhido por dois motivos principais: o primeiro foi devido ao tempo de fixação que, quando comparado à fixação pelo calor, aumentou em torno de 3h e o segundo foi atribuído aos efeitos desnaturantes desse fixador conhecidos por afetar severamente alguns dos epitopos conformacionais do vírus da DBV, principalmente quando em uso de anticorpos monoclonais. Elahi et al. (1997) discutem estes efeitos em seu trabalho, propondo a utilização da acetona para estudos de variação antigênica do VDBV.

Neste estudo, a formalina e o paraformaldeído não preservaram bem a estrutura celular, o que contradiz os trabalhos descritos na literatura. Segundo Harlow & Lane (1988), a fixação com reagentes não coagulantes preserva melhor a estrutura celular do que solventes orgânicos, mas poderia reduzir a antigenicidade de alguns componentes celulares. Elahi et al. (1997) reafirmam em seu experimento o enunciado acima e recomendam o uso da formalina para o diagnóstico da DBV. Em geral, a fixação química é considerada como um procedimento complexo que depende das propriedades intrínsecas do fixador, pH, osmolaridade, temperatura, duração da fixação e tipo de tecido ou célula a ser fixada (Thompson, 1966; Elias, 1990). A má preservação observada na monocamada de células pelos métodos acima citados foi, possivelmente, gerada por uma variação do pH das soluções de formalina e paraformaldeído utilizadas para valores distantes da neutralidade, o que poderia ter afetado a estrutura da monocamada de células.

Poucos trabalhos discutem sobre os métodos de fixação utilizados comumente nos ensaios baseados em cultivo de células para a detecção do VDBV. Smith et al. (1988) compararam uma solução fixadora tamponada contendo formalina e acetona e somente acetona. Os autores concluíram que a imunomarcação foi melhor quando somente a acetona foi utilizada e que a formalina poderia bloquear, alterar ou destruir o epitopo para o qual o anticorpo monoclonal utilizado era específico. Cay et al. (1989) utilizaram o calor a 80°C e a acetona a 20% em solução tampão sem, entretanto, discutir sobre a ação destes fixadores nas células. Saliki et al. (1997) discutiram em seu trabalho sobre o uso da acetona em várias concentrações em monocamadas de células crescidas em suporte plástico ou em lâminas de vidro. Os pesquisadores reafirmaram que a acetona, ou outros solventes orgânicos como o metanol, são requeridos para a obtenção de ótimos resultados em ensaios de marcação celular. Entretanto, encontraram que um simples ciclo de secar-reidratar-secar é suficiente para a fixação de células em suporte plástico e poderia-se utilizar a acetona preferencialmente para a fixação celular em superfícies de vidro.

Dentre os métodos de bloqueio testados e combinados aos diferentes fixadores, diferença visível ocorreu somente na fixação pelo calor, utilizando-se a soro albumina bovina (SAB) a 4% em PBS como bloqueador (Tabela 2). Esta combinação manteve a estrutura celular bem preservada e resultou em menor marcação de fundo

Tabela 2: Classificação dos métodos de bloqueio utilizados na reação de imunoperoxidase em comparação com o controle não bloqueado.

Solução de Bloqueio	Soro Albumina Bovina A 4% em PBS	Gelatina a 1% em PBS	Leite em pó desnatado a 5% em PBS
Redução da Coloração de fundo	+++	++	+

+++ = 20% de redução da coloração de fundo

++ = 10% de redução da coloração de fundo

+ = sem redução da coloração de fundo

A marcação inespecífica é um dos muitos fatores que interferem com a interpretação de resultados em ensaios de marcação celular e é definida como qualquer marcação detectada, ou na amostra teste ou em controles, que não esteja especificamente relacionada com a reação com o anticorpo primário. A marcação inespecífica pode ser o resultado de uma série de reações, tais como, reatividade cruzada do anticorpo secundário à IgG endógena ou outras proteínas no tecido ou monocamada de células, ligação não imunológica da peroxidase ao colágeno, atividade de peroxidase endógena, interações iônicas da avidina aos ânions do tecido, ligação da avidina à biotina endógena, ligação não específica da Ig total aos receptores Fc, presença de pigmentos endógenos e de aldeídos livres e interações iônicas e hidrofóbicas entre anticorpo e antígeno (Elias, 1990). Para algumas dessas situações, o uso de agentes bloqueadores não específicos é um meio efetivo de reduzir as ligações inespecíficas e os mais comumente utilizados são a albumina do ovo, soro albumina bovina (SAB), gelatina, leite em pó e soro fetal bovino (SFB) (Harlow & Lane, 1988; Elias, 1990). Neste estudo, das soluções de bloqueio utilizadas na monocamada de PFB fixada pelo calor, a SAB a 4% em PBS reduziu visivelmente a coloração de fundo gerada pela ocorrência de ligação inespecífica quando em uso do Pab anti-VDBV de origem caprina e conjugado anti-cabra peroxidase.

O Mab Panpestivírus anti-VDBV DE9 (Mab PP), diluído 40 vezes e o conjugado anti-camundongo peroxidase, diluído 200 vezes, forneceram uma marcação específica melhor do que as outras diluições, com pouca marcação inespecífica ou de fundo. Para o anticorpo policlonal anti-VDBV de origem caprina a melhor diluição obtida foi de 1:300, com o conjugado anti-caprino peroxidase diluído em 1:50.

Vários ensaios utilizam anticorpos anti-VDBV para o diagnóstico etiológico da DBV e a qualidade destes anti-soros é importante para o sucesso da técnica aplicada para a detecção deste agente. O soro policlonal é obtido por meio da hiperimunização de animais experimentais e sua produção e utilização podem ser comprometidas por uma série de fatores. Um dos principais fatores é o grau de purificação do VDBV utilizado na imunização dos animais e este

processo, no caso do VDBV, é devido principalmente à sua natureza associada à célula. Assim, pode-se encontrar anticorpos contra antígenos celulares no soro hiperimune, o que acarretará uma reação inespecífica intensa nos ensaios imunológicos. Essas reações podem ser reduzidas pelo crescimento do vírus em células derivadas da espécie utilizada para a produção do anti-soro para VDBV. Outro problema é a qualidade do soro obtido que pode depender da cepa viral e do programa de imunização utilizado (Deregt et al., 1990). Por outro lado, anticorpos monoclonais (Mabs) contra os pestivírus, têm sido amplamente utilizados, tanto em estudos de variação antigênica (Pellerin et al., 1994; Ridpath et al., 1994; Donis, 1995; Edwards & Paton, 1995) como para o diagnóstico destes agentes. Dentre eles, os gênero-específicos, não neutralizantes, usualmente dirigidos contra a proteína não estrutural p125/80 e os espécie-específicos, frequentemente neutralizantes, dirigidos contra a principal glicoproteína do envelope viral, a gp53/E2 (Edwards, 1990; Nettleton & Entrican, 1995; Deregt et al., 1998; Graham et al., 1998). Tanto o anticorpo policlonal quanto o monoclonal utilizados identificaram o VDBV produzindo boa marcação citoplasmática específica para este agente. Entretanto, como já era esperado, a reação de imunoensaio com o anticorpo policlonal gerou uma marcação inespecífica mais intensa quando comparada à reação com o anticorpo monoclonal.

Os anticorpos monoclonais possuem como vantagem uma alta especificidade, seletividade refinada, homogeneidade química e suprimento contínuo (Polak & Van Noorden, 1986; Harlow & Lane, 1988; Smith et al., 1988; Elias, 1990; Kirkland & Mackintosh, 1993), o que diminui a ocorrência de reações inespecíficas. Porém, uma desvantagem potencial para uso em testes de diagnóstico é sua monoespecificidade. Esse problema pode ser resolvido utilizando-se um "pool" de Mabs, que juntos reagem com várias cepas e isolados de VDBV conhecidos (Deregt et al., 1990; Nettleton & Entrican, 1995; Deregt & Prins, 1998). Outra desvantagem é que os anticorpos monoclonais frequentemente demoram mais tempo e são mais onerosos para se produzir do que os anticorpos policlonais (Harlow & Lane, 1988). Neste experimento, apesar de produzir uma maior coloração de

função, o anticorpo policlonal reagiu bem com ambas as cepas de VDBV utilizadas, apresentando uma marcação específica bastante nítida, quando comparada com controles negativos. Neste caso, poderia-se optar pelo emprego do anticorpo policlonal em lugar do anticorpo monoclonal para testes de rotina utilizados para a prova de IPM para DBV, já que ambos apresentaram bons resultados. Isso teria como vantagem uma diminuição de custos na realização do teste, além da redução no tempo de produção e maior facilidade de obtenção dos anticorpos, contrário aos requisitos de produção dos anticorpos monoclonais, como discutido acima.

O resultado da reação de imunoperoxidase com o uso do anticorpo policlonal é mostrada na Figura 5, onde o citoplasma de células positivas aparece fortemente corado de vermelho (cromógeno AEC), com aspecto granular e o núcleo permanece claro. Na Figura 6 observa-se o controle negativo da reação anterior, onde por toda a monocamada as células não inoculadas aparecem com uma coloração fraca e homogênea. Com a utilização do cromógeno DAB o citoplasma das células infectadas tornou-se corado de marrom tendendo para o amarelo, enquanto o núcleo permaneceu claro (Figura 7) e o controle negativo de células não infectadas apresentou-se com coloração amarelada homogênea (Figura 8).

Reagentes marcados enzimaticamente são detectados por meio de cromógenos solúveis que precipitam após a ação do complexo enzima-substrato, produzindo um produto corado e insolúvel no sítio de localização da enzima. Uma série de cromógenos está disponível para cada enzima, incluindo a diaminobenzidina (DAB), o aminoetilcarbazol (AEC), o 4-cloronaftol (4-CN) e tetrametilbenzidina (TMB). O DAB é o cromógeno mais comumente utilizado e é um dos mais sensíveis para a peroxidase (Harlow & Lane, 1988; Elias, 1990). Nos ensaios realizados em secções de tecido, o AEC ou outro cromógeno podem ser utilizados quando a reação com o DAB produz muita coloração de fundo ou se a cor do cromógeno alternativo é a requerida para um determinado experimento (Harlow & Lane, 1988). Entretanto, segundo Elias (1990) os cromógenos alternativos têm sido menos eficientes do que o DAB por várias razões. O produto formado pela reação com o AEC, por exemplo, é solúvel em água, pode desbotar com o tempo e há suspeita deste ser carcinogênico. O 4-cloronaftol, além de solúvel em água, possui uma marcação nitidamente mais fraca do que o DAB e o AEC. Entretanto, neste experimento, o melhor resultado foi obtido pela reação com o AEC, devido ao contraste da cor vermelha do citoplasma com o núcleo claro, superior ao apresentado pela reação com o DAB que, além disso, produziu uma maior marcação de fundo.

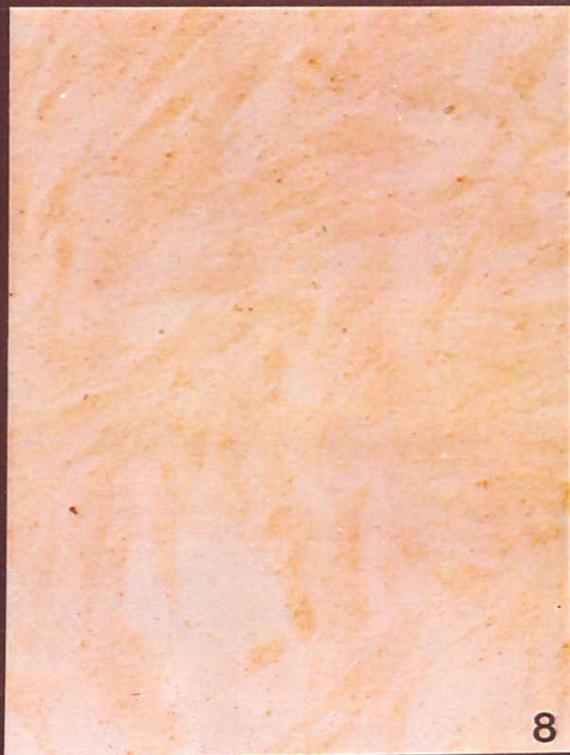
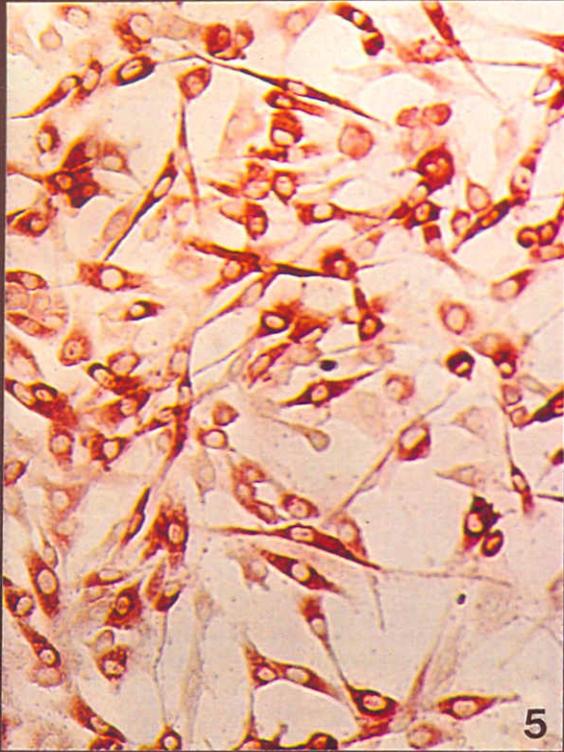
---

Figura 5 - Detecção do vírus da DBV (cepa CP/NADL) pela utilização de anticorpo policlonal e método de Imunoperoxidase em Monocamada de Células de cultivo primário de Pulmão Fetal Bovino. A marcação antígeno-específica citoplasmática apresenta-se de cor vermelha pelo cromógeno AEC. 240X.

Figura 6 - Controle negativo da reação de Imunoperoxidase em Monocamada de Células de cultivo primário de Pulmão Fetal Bovino. Utilização de anticorpo policlonal e cromógeno AEC. 240X.

Figura 7 - Detecção do vírus da DBV (cepa CP/NADL) pela utilização de anticorpo policlonal e método de Imunoperoxidase em Monocamada de Células de cultivo primário de Pulmão Fetal Bovino. A marcação antígeno-específica citoplasmática apresenta-se de cor marrom-amarelada pelo cromógeno DAB. 270X.

Figura 8 - Controle negativo da reação de Imunoperoxidase em Monocamada de Células de cultivo primário de Pulmão Fetal Bovino. Utilização de anticorpo policlonal e cromógeno DAB. 270X.



Os ensaios de imunoperoxidase, juntamente com as técnicas de imunofluorescência, fornecem um meio simples, rápido, eficiente e sensível para a detecção e identificação do VDBV (Saino et al., 1994). Apesar de seu valor inestimável para o diagnóstico desta enfermidade, a imunofluorescência apresenta desvantagens inerentes que limitam o seu uso, como por exemplo, a necessidade de um microscópio de fluorescência, perda da fluorescência após curta exposição à luz ultravioleta e preservação precária das preparações coradas (Ward & Kaeberle, 1984). Por sua vez, a imunoperoxidase apresenta algumas vantagens sobre a técnica de imunofluorescência como a utilização de microscópio de luz visível, tornando-se por isso um método mais barato, com grande facilidade de leitura e interpretação, além da preservação permanente do material corado (Ward & Kaeberle, 1984; Afshar et al., 1991; Haines & Clark, 1991; Saino et al., 1994; Castro et al., 1997).

Outra vantagem é que quando realizada em conjunto com o isolamento viral em monocamada de células semeadas em microplacas de 96 pocilhos, a imunoperoxidase pode ser utilizada para testar um grande número de amostras. Esta técnica, realizada em microplacas, tem sido empregada com sucesso para a identificação de animais PI em rebanhos sob o regime de programas de controle da DBV (Saino et al., 1994; Dubovi, 1996; Saliki et al., 1997; Deregt & Prins, 1998). A imunoperoxidase também pode ser utilizada como excelente ferramenta para a detecção do VDBV como contaminante do SFB, de cultivos celulares e sêmen. Vários autores discutem a importância do VDBV como contaminante comum do soro fetal bovino, linhas celulares e amostras de sêmen (Afshar et al., 1991; Oliveira et al., 1996; Castro et al., 1997; Zabal et al., 2000).

A reação de IPM padronizada neste trabalho mostrou-se bastante eficiente para a identificação de cepas clássicas sendo, então, utilizada na detecção de amostras provenientes de um animal inoculado experimentalmente e amostras de campo como apresentado a seguir.

#### 4.2 Imunoperoxidase em Monocamada de Células conjugada ao Isolamento Viral

Com relação ao aparecimento de sinais clínicos e alterações macroscópicas do animal inoculado experimentalmente febre foi o único sinal clínico observado durante o período de sete dias pós-inoculação do vírus. À necropsia, observou-se apenas aumento dos linfonodos mesentéricos e axilares.

A Tabela 3 apresenta os resultados do isolamento viral para os fragmentos de órgãos do animal infectado experimentalmente e feto 1, utilizando-se a IPM padronizada para a identificação viral. Foram recuperadas somente cepas NCP a partir dos órgãos do animal infectado experimentalmente e feto 1. De quatro repetições, o fígado, baço e esôfago obtiveram quase a totalidade de pocilhos positivos na segunda e quarta passagens. O pulmão, traquéia e linfonodo axilar apresentaram números entre dois e quatro de pocilhos positivos para as passagens realizadas. Finalmente, o intestino e linfonodo mesentérico apresentaram somente um ou dois pocilhos positivos. Nas amostras do feto 1, o VDBV foi identificado na segunda passagem/AEC, com um pocilho positivo e na quarta passagem/AEC e DAB, com quatro pocilhos positivos, mas não foi identificado na segunda passagem/DAB.

Os resultados de terceira passagem para as amostras provenientes de fragmentos de órgãos do animal infectado experimentalmente e feto 1 foram inconclusivos devido à ocorrência de um precipitado por toda a monocamada de células, impossibilitando a leitura das placas. A causa deste precipitado não foi identificada, porém, esse fenômeno foi observado apenas nesta reação, não se repetindo em nenhum dos outros experimentos realizados de segunda e quarta passagens.

O IV, revelado por IPM, das amostras de órgãos do animal inoculado experimentalmente detectou com sucesso o antígeno viral da DBV. Em um experimento de infecção experimental em bovinos pela cepa NCP/VDBV, Marshall et al. (1996) isolaram o vírus da DBV 10 dias pós-inoculação em vários órgãos, como por exemplo, timo, baço, íleo, fígado, pulmão, rim, linfonodo mesentérico, entre outros.

Tabela 3: Resultado do Isolamento Viral de segunda e quarta passagens em monocamada de cultivo primário de Pulmão Fetal Bovino das amostras provenientes do animal inoculado experimentalmente e feto 1.

Amostras	Órgãos	2 <sup>a</sup>		2 <sup>a</sup>		4 <sup>a</sup>		4 <sup>a</sup>	
		Passagem DAB*	#	Passagem AEC*	#	Passagem DAB	#	Passagem AEC	#
1	Fígado	P	4	P	4	P	4	P	4
2	Pulmão	P	2	P	2	P	4	P	4
3	Baço	P	4	P	4	P	4	P	4
4	Esôfago	P	3	P	4	P	4	P	4
5	Lfn Axilar	P	4	P	4	P	2	P	2
6	Lfn Mesentérico	P	2	P	1	P	1	P	1
7	Intestino	P	1	P	2	P	2	P	2
8	Traquéia	P	4	P	2	P	2	P	2
9	Grupo de órgãos Feto 1	N	0	P	1	P	4	P	4
10	Grupo de órgãos Feto 1	N	0	P	1	P	4	P	4

Lfn = linfonodo

N = negativo

P = positivo

# = número de pocilhos positivos (1 a 4)

\* DAB e AEC = cromógenos

Os títulos virais mais altos foram encontrados no timo, linfonodo mesentérico, medula óssea, íleo e pulmão. Spagnuolo-Weaver et al. (1997), em estudo de infecção experimental aguda, recuperaram ambos os biótipos de VDBV de uma gama de tecidos tão cedo quanto 12 horas até oito dias pós-inoculação e um maior número de amostras continha o biótipo NCP.

Nos experimentos desenvolvidos por Brusckhe et al. (1998), animais livres de VDBV inoculados experimentalmente com cepa NCP apresentaram o vírus da DBV em órgãos linfóides bem como no pulmão, intestino, fígado, entre outros. Do

quinto ao sétimo dia pós-inoculação foi possível isolar o antígeno viral de praticamente todos os órgãos amostrados. Especialmente no sétimo dia pós-inoculação, foram encontrados altos títulos virais, principalmente, no íleo, incluindo placas de Peyer e tecidos linfóides. Altos títulos virais também foram encontrados em outras partes do intestino, no baço, pulmão, timo e fígado nesse mesmo dia. Portanto, no que se refere à distribuição do vírus em tecidos e órgãos do animal inoculado experimentalmente detectado pelo IV e revelado pela IPM, os resultados obtidos neste experimento condizem com os achados na literatura.

O método de IV em cultura de células, revelado pelo ensaio de IPM, identificou de maneira eficaz o VDBV a partir do agrupamento de órgãos do feto 1 proveniente de um caso de aborto e os resultados foram congruentes com os achados na literatura. Smith et al. (1988) isolaram o VDBV de 10 em 44 casos de aborto fetal bovino, sendo que sete dessas amostras isoladas eram NCP. Nos estudos de Baszler et al. (1995), o VDBV foi isolado de cinco em cinco casos de aborto bovino a partir de múltiplos órgãos fetais. Muñoz et al. (1996) isolaram o VDBV de amostras de baço, rim, pulmão e fígado de fetos, aparentemente saudáveis, coletados em abatedouro com rigoroso controle sanitário na Argentina e encontraram uma alta prevalência de infecção fetal pelo vírus da DBV. Além disso, a maioria dos casos positivos foi observada no primeiro ou segundo subcultivo. Thür et al. (1997) também utilizaram um agrupamento de órgãos para o isolamento viral do VDBV e demonstraram que, principalmente nos casos de fetos autolisados, a sensibilidade do IV poderia ser aumentada utilizando-se órgãos separadamente e não um grupo de órgãos. Os isolados do presente estudo foram identificados como amostras NCP, que é um achado comum para isolados de VDBV a partir de fetos (Muñoz et al., 1996).

Nesse estudo, os resultados do IV do feto 1 identificados por DAB mostraram um exemplo onde o agente infeccioso não foi detectado na segunda passagem e sim na quarta, o que pode ter ocorrido devido a um longo período entre a morte fetal e a coleta do material ou às condições inadequadas de acondicionamento e transporte da amostra. Já para os resultados referentes ao bezerro inoculado experimentalmente, o IV foi eficaz em todas as passagens testadas, o que pode ser explicado pelo tempo transcorrido entre a inoculação e o sacrifício, período em que segundo a literatura poderia-se encontrar, na maioria dos órgãos do animal, um alto título viral. Esses resultados mostram a importância de se conhecer o histórico da amostra e da doença no rebanho, além dos cuidados necessários à coleta e envio de material para o laboratório.

O método de isolamento viral pode ser influenciado por fatores como a susceptibilidade do cultivo celular à infecção, o meio de cultura, o formato e protocolo do teste. É um método oneroso e demorado, podendo requerer vários

dias ou mesmo semanas para ser realizado, mas pode ser aplicado a um grande número de amostras quando realizado em micropalacas (Brock, 1995; Sandvik, 1999). Essa técnica também pode apresentar resultados negativos em alguns casos, devido à ausência do vírus infeccioso na amostra submetida (Haines et al., 1992). Isso poderia ocorrer em situações onde o vírus foi inativado devido a condições inadequadas de transporte, amostras tóxicas ou contaminadas, uso incorreto de desinfetantes durante a coleta de sangue, entre outros (Horner et al., 1995; Laamanem et al., 1997), como discutido no parágrafo anterior.

### 4.3 Imunohistoquímica (IHQ)

#### 4.3.1 Reação de Imunohistoquímica

##### 4.3.1.1 Componentes da Reação

Nas Tabelas 4 e 5 estão representadas as variações dos parâmetros utilizados na reação de imunohistoquímica (IHQ) para a padronização da técnica e a comparação entre resultados obtidos foi realizada segundo um sistema subjetivo de classificação de 1 a 4 cruzes.

Como descrito para o ensaio de imunoperoxidase em cultura de células (4.1), os anticorpos monoclonais forneceram melhores resultados quando comparados ao uso do anticorpo policlonal. Apesar de ocorrer, a marcação inespecífica foi bastante discreta quando utilizou-se anticorpos monoclonais. Apesar da intensa coloração de fundo, o anticorpo policlonal utilizado neste experimento produziu uma boa marcação.

Como já discutido anteriormente, os anticorpos policlonais aplicados a vários tipos de ensaios imunológicos apresentam algumas desvantagens. Haines et al. (1992) complementam aquelas informações dizendo que a principal desvantagem do uso dos anticorpos policlonais é que a sua quantidade finita restringe a habilidade da padronização de testes entre laboratórios e dentro de um mesmo laboratório durante um período de tempo. Além dos antígenos celulares contra os quais os anticorpos policlonais podem ser dirigidos, deve-se ter em mente que podem ocorrer, também, reações contra outros patógenos para os quais os animais tenham sido expostos.

Tabela 4: Classificação\* da reação de imunohistoquímica utilizando-se anticorpo policlonal, kit comercial LSAB e revelação pelos cromógenos DAB e AEC.

Diluição	Tempo/ Temperatura bloqueio	Tempo/Temperatura incubação anticorpo 1º	KIT LSAB		Tempo de incubação/ cromógeno
			DAB	AEC	
1:300	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	Nd	Nd	10 - 15'
1:600	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	Nd	Nd	10 - 15'
1:1500	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	Nd	Nr	10 - 15'
1:2500	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	Nd	Nr	10 - 15'
1:3200	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	Nd	Nd	10 - 15'
1:3600	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	++	+	12'
1:3600	30'/37°C	40'/temp.ambiente	++	Nr	12'
1:3600	30'/37°C	12h/4°C	+	Nr	12'
1:3600	1h/37°C	12h/4°C	+	Nr	12'
1:3600	1h/37°C	12h/4°C	+	Nr	10'
1:4000	30'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	++	Nr	7'
1:4000	30'/37°C	40'/temp.ambiente	++	Nr	12'
1:4000	30'/37°C	12h/4°C	+	Nr	12'
1:6000	30'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	+	Nr	7'
1:6000	1h/37°C	12h/4°C	+	Nr	10'
1:8000	30'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	+	Nr	7'
1:8000	1h/37°C	12h/4°C	+	Nr	10'
1:16000	30'/37°C	40'/temp.ambiente	+	Nr	10'
1:32000	30'/37°C	40'/temp.ambiente	Nd	Nr	10'

\* Segundo critério de 1 a 4 cruzes:

+ - marcação inespecífica difusa/forte; marcação específica multifocal forte

++ - marcação inespecífica difusa/fraca; marcação específica multifocal forte

+++ - marcação inespecífica focal/fraca; marcação específica multifocal forte

++++ - marcação inespecífica focal/quase inexistente; marcação específica multifocal forte

Nd = não detectado ou por grande marcação inespecífica ou por ausência de marcação.

Nr = não realizado

A maioria dos trabalhos atuais de detecção do VDBV em IHQ utilizam-se de anticorpos monoclonais, geralmente, um "pool" de anticorpos monoclonais que, como já mencionado, eliminaria o problema de sua mono-especificidade (Baszler et al., 1995; Marshall et al., 1996; Spagnuolo-Weaver et al., 1997; Liebler-Tenorio et al., 2000; Stoffregen et al., 2000), além da utilização de anticorpos monoclonais para estudos de epitopos altamente conservados do VDBV (Haines & Ellis, 1994).

Não houve diferenças na distribuição do antígeno viral da DBV quando utilizou-se ou anticorpos

policlonais ou monoclonais. Hewicker et al. (1990) também não encontraram diferenças óbvias em relação à distribuição do VDBV no sistema nervoso central de animais PI quando comparada àquela encontrada em estudo prévio com anticorpo policlonal. Haines et al. (1992) compararam o uso de anticorpo policlonal e monoclonal em ensaio de imunohistoquímica para a detecção do VDBV em 45 casos de doença das mucosas e observaram que houve idêntica distribuição de marcação imunohistoquímica em todos os casos testados.

Tabela 5: Classificação\* da reação de imunohistoquímica utilizando-se os anticorpos monoclonais Mab PP e Mab Px, "pool" de monoclonais, kit comercial LSAB e revelação pelos cromógenos DAB e AEC.

Anticorpo primário	Diluição	Tempo/ Temperatura bloqueio	Tempo/Temperatura incubação anticorpo 1º	KIT LSAB		Tempo de incubação/ cromógeno
				DAB	AEC	
Mab PP	1:30	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	+	+	10 - 15'
	1:50	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	++	++	12'
	1:100	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	+++	++	10 - 15'
	1:100	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	+++	Nr	7'
	1:200	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	+	+	10 - 15'
	1:200	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	+	Nr	7'
	1:300	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	Nd	Nr	10 - 15'
	1:400	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	Nd	Nr	10 - 15'
Mab PX	1:100	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	++	Nr	10'
	1:400	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	++++	+++	10'
	1:400	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	++++	+++	12'
	1:400	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	++++	Nr	7'
	1:600	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	++	Nr	7'
	1:1000	10'/temp.ambiente	40'/temp.ambiente	++	+	10'
Pool Mabs	1:200	30'/37°C	40'/temp. ambiente	+++	++	10'
PP e Px	1:200	10'/ emp.ambiente	40'/temp.ambiente	++	Nr	10'

\*Segundo critério de 1 a 4 cruces:

- + - marcação inespecífica difusa/forte; marcação específica multifocal forte
- ++ - marcação inespecífica difusa/fraca; marcação específica multifocal forte
- +++ - marcação inespecífica focal/fraca; marcação específica multifocal forte
- ++++ - marcação inespecífica inexistente; marcação específica multifocal forte
- Nd = não detectado ou por grande marcação inespecífica ou por ausência de marcação.
- Nr = não realizado

Entretanto, a mínima marcação de fundo produzida pelos Mabs, além de outras vantagens já discutidas sobre o seu uso, proporcionou facilidade na leitura das lâminas, com excelente definição da morfologia dos tecidos analisados, amplificada pela contra-coloração com Hematoxilina de Mayer. Segundo Elias (1990) e Haines & Ellis (1994), os contra-corantes utilizados nas marcações imunoenzimáticas

permitem um exame simultâneo da histopatologia e da distribuição do antígeno, eliminando muito da subjetividade de interpretação da marcação e aumentando a fidedignidade dos resultados.

Comparando-se o Pab e Mabs utilizados nos ensaios de IPM e IHQ padronizados neste experimento, observou-se que ambos

funcionaram igualmente bem para a IPM, enquanto a reação de IHQ somente mostrou-se satisfatória quando em uso de Mabs (Tabelas 4 e 5). Isso poderia ser explicado principalmente pela complexidade estrutural das secções de tecidos quando comparadas às monocamadas de células. O Pab poderá causar reação inespecífica tanto em secções de tecidos e órgãos quanto em monocamada de células. Porém, a probabilidade de encontrar um número e uma variedade maior de receptores inespecíficos nos tecidos é certamente maior, devido à sua complexidade estrutural, levando, então, a um maior número de ligações inespecíficas e maior coloração de fundo.

Para a reação com os conjugados anti-camundongo peroxidase (diluições 1:100 e 1:200) e anti-cabra peroxidase, utilizado na diluição de 1:200, ou ocorreu intensa marcação inespecífica ou não houve detecção do antígeno. A reação do Pab diluído em 1:3600 e conjugado proteína G peroxidase diluído em 1:400 resultou em marcação inespecífica difusa, forte e marcação específica multifocal, forte. Para as demais diluições da proteína G, ou ocorreu intensa marcação inespecífica ou não houve detecção do antígeno.

Os resultados da reação de IHQ com o kit comercial LSAB mostraram-se superiores aos resultados obtidos com os conjugados anti-cabra, anti-camundongo-peroxidase e proteína G - peroxidase. Estes resultados não foram representados em tabelas.

Os métodos indiretos em imunohistoquímica foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a sensibilidade da marcação de modo que pequenas quantidades de antígeno pudessem ser detectadas (Haines & Clark, 1991). A principal vantagem da detecção indireta é que uma série de reagentes marcados pode ser utilizada para um número de anticorpos primários, como por exemplo, anticorpos anti-imunoglobulina, proteína A ou G (Harlow & Lane, 1988). Segundo Haines & Clark (1991), desde que, aproximadamente, cinco a sete anticorpos secundários irão unir-se a cada anticorpo primário, poderia-se obter uma amplificação de cinco a sete vezes o sinal visível.

Os métodos de amplificação que resultam em um aumento ainda maior do sinal são aqueles

que utilizam as interações entre a avidina e a biotina. A marcação imunológica resultante da interação avidina/biotina baseia-se na alta afinidade da vitamina biotina pela glicoproteína avidina ou estreptavidina, hoje a mais utilizada. Neste estudo, utilizou-se o Kit LSAB que emprega o método LAB em que o anticorpo secundário biotilado reage com várias moléculas de estreptavidina conjugada à peroxidase. Segundo o fabricante, este kit aumenta em até oito vezes a sensibilidade alcançada pelo complexo AB que possui uma sensibilidade até 1000 vezes maior do que aquela dos métodos diretos de marcação imunoenzimática (Haines & Clark, 1991). Elias (1990) comenta que os métodos LAB são mais sensíveis do que o ABC ou PAP.

Ao contrário da reação de IPM, o DAB apresentou melhores resultados que o AEC no ensaio de IHQ. Segundo Elias (1990), a eficiência de detecção é definida pela marcação facilmente distinguida da coloração de fundo na mais alta diluição do anticorpo primário. Neste experimento, quando realizou-se uma comparação entre a marcação pelo DAB e o AEC na maior diluição do Mab PP e Mab Px, obteve-se uma maior eficiência de detecção com a utilização do DAB que gerou uma marcação específica onde o contraste com a cor azul do contra-corante facilitou a visualização do antígeno ao M.O., o que não ocorreu com o AEC (Tabela 3). Neste caso, o precipitado vermelho resultante da reação do complexo enzima-substrato-AEC misturou-se à coloração difusa e inespecífica por todo o tecido dificultando a leitura das lâminas.

Segundo o critério de avaliação utilizado, as variações de tempo e temperatura de incubação com o anticorpo primário de 40 minutos à temperatura ambiente, bloqueando-se por 10 minutos à temperatura ambiente proporcionaram os melhores resultados para a reação de IHQ com o anticorpo primário Pab anti-VDBV de origem caprina.

Há na literatura alguma discussão sobre os benefícios obtidos pelo aumento do tempo e temperatura de incubação do anticorpo primário na amplificação de marcação específica (Elias, 1990). Grande número de pesquisadores têm utilizado a incubação prolongada, geralmente de 12 a 24 horas, com o anticorpo primário a 4°C,

obtendo sempre um aumento significativo da intensidade da marcação. Entretanto, alguns investigadores ou não detectaram diferença alguma entre a imunomarcação por 3h à temperatura ambiente comparada com 24h a 4°C ou verificaram um leve aumento na marcação de fundo após longos períodos de incubação. Apesar da concordância geral de que a incubação prolongada em baixas temperaturas permite maior diluição do anticorpo primário (o que reduziria a ocorrência de coloração de fundo), a tendência é de redução do tempo de incubação ao máximo e utilização de temperaturas mais altas como 37°C ou 42°C (Elias, 1990), principalmente pela rapidez do diagnóstico. Também, pode-se estender a incubação de reagentes secundários utilizados nos métodos LAB, ABC e PAP.

Neste experimento, o tempo e temperatura de incubação do anticorpo primário, Pab anti-VDBV de origem caprina, sofreu uma variação de 40 minutos à temperatura ambiente para 12h a 4°C. Observou-se que com o aumento do tempo de incubação do anticorpo primário, em sua maior diluição funcional e em baixa temperatura, ocorreu um aumento da marcação de fundo, favorecendo, portanto, a tendência comum da redução do tempo de incubação e aumento de temperatura. Padronizou-se esse mesmo tempo e temperatura de incubação para os anticorpos monoclonais Px e PP, obtendo-se ótimos resultados (Tabela 5).

Para o "pool" de Mabs, a alteração do tempo e temperatura de bloqueio de 10 minutos à temperatura ambiente para 30 minutos a 37°C proporcionou uma diminuição da marcação inespecífica e, portanto, uma melhor visualização da marcação específica (Tabela 5).

A solução de soro albumina bovina (SAB) a 4% em PBS, utilizada na reação de IPM para o bloqueio de ligações inespecíficas, foi aplicada à reação de IHQ com algumas variações de tempo e temperatura de incubação que podem ser observadas nas Tabelas 4 e 5. Observou-se que para o "pool" de Mabs, o aumento do tempo e temperatura de incubação com o agente bloqueador de 10 minutos à temperatura ambiente para 30 minutos a 37°C reduziu eficientemente a marcação de fundo da reação. Elias (1990) recomenda uma solução de SAB a 3% em TBS por pelo menos 1h a 37°C ou 10%

de albumina do ovo por 30 minutos. O uso de agentes bloqueadores foi discutido para a reação de IPM e os fundamentos são os mesmos aplicados para a IHQ.

#### 4.3.2 Achados Histopatológicos

As alterações histológicas mais comumente encontradas nos tecidos provenientes de animal com doença das mucosas foram necrose de regiões de mucosa com presença de infiltrado inflamatório constituído predominantemente por neutrófilos e linfócitos. Nas áreas de necrose, também foram comumente observadas células em apoptose e degenerações caracterizadas pela presença de núcleos picnóticos e em cariorréxia. Ocorreu intensa hiperemia nos diversos tecidos amostrados, além de hemorragia e edema de áreas de submucosa. Alterações vasculares foram frequentes e houve presença de infiltrado inflamatório perivascular.

As alterações observadas no intestino caracterizaram um quadro de enterite ulcerativa aguda. A mucosa intestinal apresentou-se difusamente afetada pela presença de infiltrado inflamatório constituído principalmente por neutrófilos e em menor número por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Ocorreu intensa necrose das vilosidades e criptas intestinais (Figura 9), hiperemia bastante acentuada, além de hemorragia e edema na submucosa. Os folículos linfóides ou placas de Peyer sofreram severa hipotrofia com total destruição dos centros germinativos. Na musculatura da parede intestinal observou-se hiperemia e infiltrado inflamatório perivascular com presença de linfócitos e plasmócitos. Ocorreu, ainda, dilatação de vasos linfáticos na musculatura da parede intestinal.

O esôfago apresentou alterações condizentes com o quadro de esofagite ulcerativa aguda com necrose de mucosa e presença de infiltrado inflamatório constituído predominantemente por linfócitos e polimorfonucleares neutrófilos. A mucosa, submucosa e camadas mais profundas apresentaram intensa hiperemia. Glândulas mucosas mostraram-se degeneradas. Observou-se também alterações vasculares, com destruição do endotélio, presença de plaquetas e material fibrinóide no lúmen do vaso. Na Figura 10, uma visão geral da secção de esôfago com as principais alterações descritas acima.

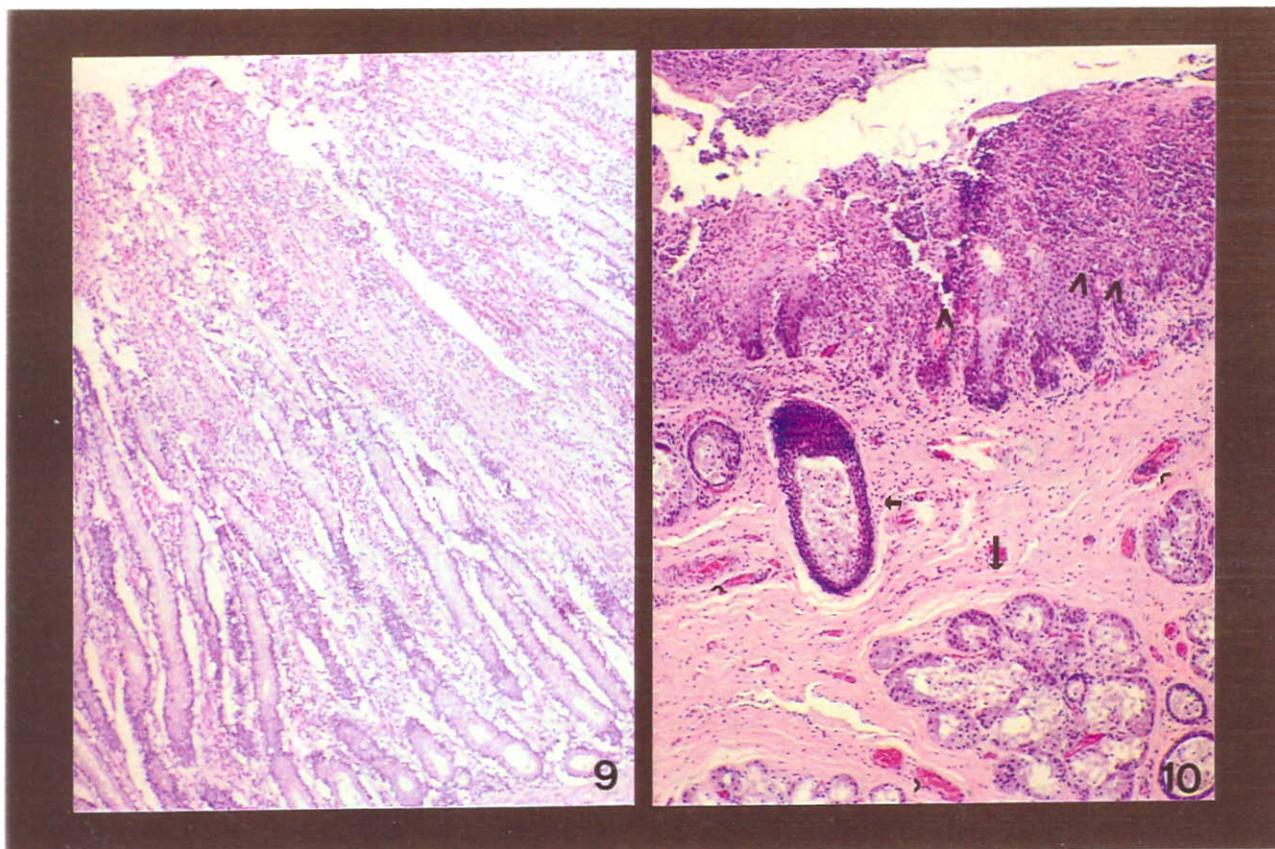


Figura 9 - Secção de intestino mostrando necrose de vilosidades intestinais. Coloração por Hematoxilina-Eosina - HE. 54,1X

Figura 10 - Visão geral de secção de esôfago com alguns processos histopatológicos. Coloração por Hematoxilina-Eosina - HE. Pontas grandes de setas (>): região de necrose no epitélio pavimentoso estratificado; pontas pequenas de setas (>): hiperemia; seta de cauda longa (⇨): glândulas esofágicas; seta de cauda curta (⇦): ducto de glândula esofágica. 54,1X

Na orofaringe ocorreu um processo inflamatório agudo, fibrinonecrótico do epitélio, com presença predominante de linfócitos e neutrófilos. Observou-se intensa hiperemia nas camadas mucosa e submucosa. Glândulas mucosas, às vezes dilatadas, apresentaram-se bastante degeneradas, o que possibilitou a fusão de algumas destas para formar cavidades preenchidas por debris celulares.

As alterações presentes nas secções de língua caracterizaram um quadro de glossite ulcerativa aguda, com necrose de mucosa e presença de infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. Observou-se, também, intensa hiperemia em várias regiões da submucosa, além de algumas áreas de hemorragia.

As principais alterações histológicas encontradas nos controles positivos condizem com o quadro de MD descrito na literatura (Liebler-Tenorio et al., 1997; Tanyama et al., 1999). Bielefeldt-Ohmann (1995) discute as patologias das infecções por VDBV e apresenta as principais características das lesões macro e microscópicas ocorridas durante o curso da MD. Liebler-Tenorio et al. (2000) discutem e comparam as alterações teciduais e distribuição do VDBV em animais com MD aguda ou crônica. Segundo estes autores, porém, essa divisão propõe-se somente à interpretação de casos de campo, desde que deve-se considerar a variação individual de respostas contra a infecção dentro de cada grupo analisado.

Zhang et al. (1996) verificaram a indução de apoptose pelo vírus da DBV em cultivo celular e, para o inóculo, foi utilizado o par CP/NCP de VDBV isolado de um animal com MD. Os autores comprovaram que o biótipo CP é responsável pela apoptose em cultivo de células infectadas com ambas as cepas e que tal modelo é consistente com a patologia da doença, caracterizada, principalmente, pela destruição de folículos linfóides nas placas de Peyer e erosão do epitélio intestinal, que são uma consequência direta da infecção pelo vírus CP. Stoffregen et al. (2000) também observaram a presença de núcleos picnóticos em apoptose nos focos de necrose provocados pela síndrome hemorrágica induzida experimentalmente. Segundo Hopps (1966) em regiões de necrose podem aparecer várias alterações nucleares como a picnose, cariorexia e a cariólise.

Não foram observadas alterações histopatológicas nos órgãos do bezerro inoculado experimentalmente. Um leve processo de autólise ocorreu em secções de rim do feto 1, enquanto que para as secções de órgãos do feto 2 a autólise foi intensa e, praticamente, impossibilitou a sua identificação.

No teste de infecção experimental em bezerro realizada com as cepas clássicas NCP/NY-1 524 e CP/NADL 1422, ambas pertencentes ao genótipo I, não foram observadas lesões microscópicas nas secções histológicas analisadas. A maioria dos estudos sobre a patogenia das infecções agudas com cepas CP de VDBV e/ou cepas NCP de VDBV, tem sido realizada com isolados recuperados de animais com doença das mucosas ou animais PI (Spagnuolo-Weaver et al., 1997). Portanto, não foi possível comparar os resultados obtidos neste experimento com aqueles de infecção experimental encontrados na literatura. Entretanto, Baszler et al. (1995) encontrou ampla distribuição do antígeno da DBV na ausência de lesões teciduais em várias formas clínicas ocorrendo naturalmente, como infecção subclínica, síndrome respiratória, infecções concomitantes com outros patógenos, aborto e até mesmo doença entérica (doença das mucosas, diarreia aguda ou crônica, diarreia neonatal). Neste estudo, a ausência de lesões nos tecidos e órgãos do animal inoculado experimentalmente provavelmente ocorreu devido ao curto espaço de tempo entre a inoculação e o sacrifício.

#### **4.3.3 Distribuição do Antígeno em Controles Positivos**

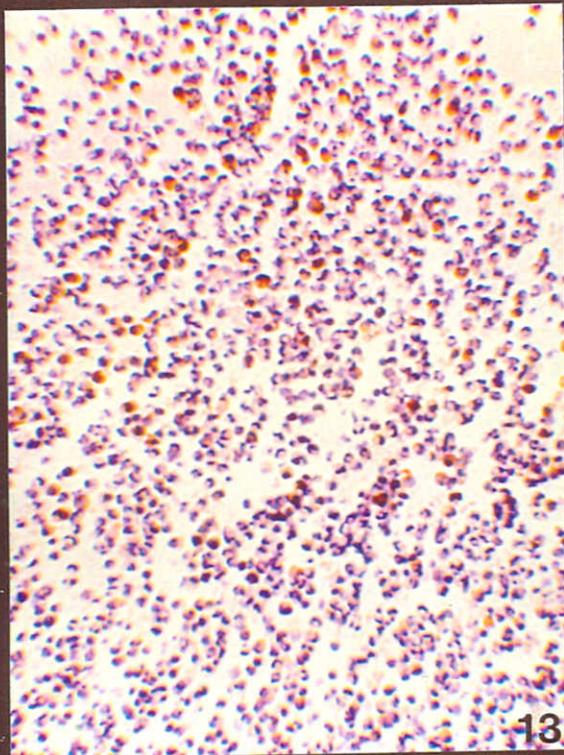
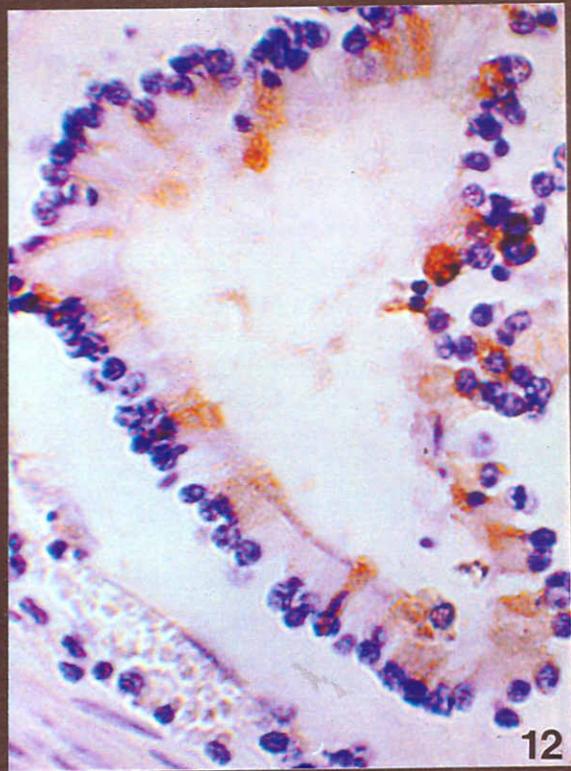
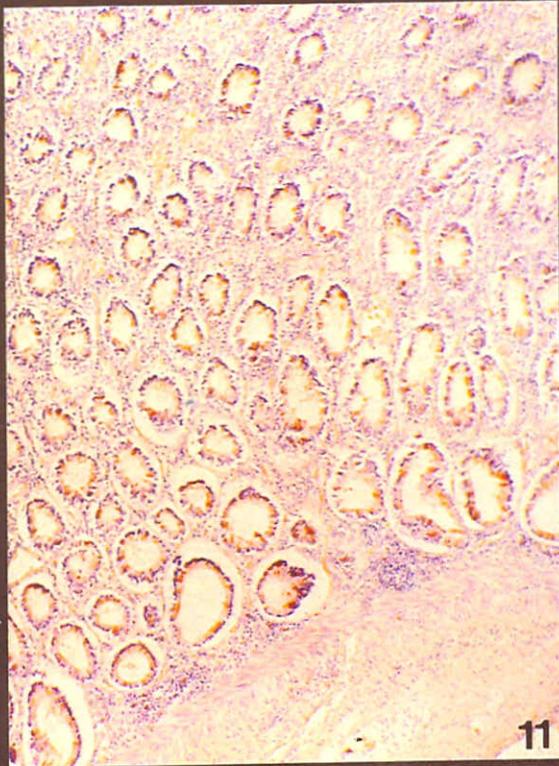
Nas secções do intestino a maior deposição do antígeno ocorreu no citoplasma das células epiteliais das criptas intestinais (Figuras 11 e 12) e no citoplasma das células de infiltrados inflamatórios (Figura 13) presentes, predominantemente, na mucosa. Nas regiões com intensa destruição da camada mucosa houve acúmulo de debris celulares que coraram-se intensamente. Células esparsas e pequenos grupos de células apresentaram-se coradas na lâmina própria em íntimo contato com as células epiteliais das criptas intestinais. Grupos esparsos de células do infiltrado inflamatório também atingiram a submucosa e apresentaram-se com alguns de seus constituintes corados. Nas camadas musculares interna e externa observou-se algumas células marcadas.

---

Figura 11 Detecção do antígeno viral da DBV pelo método de Imunohistoquímica no citoplasma de células epiteliais das criptas intestinais. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. 54,1X.

Figura 12 - Detalhe de cripta intestinal com células epiteliais marcadas. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. 541,2X.

Figura 13 - Marcação específica de células mononucleares em região de infiltrado inflamatório da mucosa intestinal. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. 270X.



Nas secções do esôfago, o antígeno estava presente nas células que compõem o epitélio pavimentoso estratificado na camada mucosa (Figura 14) e em células de infiltrados inflamatórios presentes em áreas de necrose desse epitélio. Na lâmina própria da camada mucosa observou-se algumas células mononucleares marcadas. Células de glândulas mucosas e o conteúdo dos ductos das glândulas mucosas também apresentaram coloração específica para o antígeno do VDBV (Figura 15). A distribuição do antígeno da DBV para a orofaringe seguiu o padrão descrito para o esôfago.

A língua apresentou marcação em células do epitélio pavimentoso estratificado e em células do infiltrado inflamatório aí presentes. Como ocorreu na mucosa intestinal, debris celulares coraram-se intensamente no ápice do epitélio pavimentoso estratificado. Células mononucleares nos botões gustativos marcaram-se fortemente. O tecido conjuntivo frouxo apresentou várias células mononucleares com o citoplasma marcado. No espaço intersticial entre os feixes musculares, observou-se células esparsas com o citoplasma corado e bastante granuloso.

Em várias regiões de imunomarcção observou-se uma granulação citoplasmática, como no ensaio de IPM (Figura 16). As principais células que apresentaram marcação específica foram os linfócitos, com marcação também em alguns macrófagos e plasmócitos. Em todas as secções analisadas houve marcação específica de células nos espaços perivasculares, células endoteliais de vasos sanguíneos e, principalmente, em células musculares lisas da parede de vasos sanguíneos (Figura 17).

A distribuição do VDBV no trato gastrointestinal superior e inferior do animal com MD (controles positivos) foi similar àquela apresentada em vários outros estudos de detecção imunohistoquímica do antígeno da DBV (Baszler et al., 1995; Bielefeldt-Ohmann, 1995; Taniyama et al., 1999; Liebler-Tenorio et al., 1997; Liebler-Tenorio et al., 2000; Stoffregen et al., 2000).

Quando presente, a marcação foi vista na região citoplasmática que é uma distribuição celular característica dos vírus RNA. Exceção ocorreu

nas áreas onde houve acúmulo de debris celulares devido à intensa destruição da camada mucosa. Nestas áreas, as células marcadas com morfologia intacta misturavam-se aos debris também marcados. Alguns autores destacam em seu trabalho a localização citoplasmática do antígeno viral da DBV (Bielefeldt-Ohmann et al., 1980; Booth et al., 1995; Marshall et al., 1996) e comentam que células contendo o antígeno viral da DBV e células adjacentes poderiam apresentar-se vacuolizadas ou necróticas (Marshall et al., 1996; Liebler-Tenorio et al., 1997). Além disso, neste trabalho observou-se um padrão granular de marcação citoplasmática em várias células positivas. Haines et al. (1992) perceberam esse padrão de focos citoplasmáticos grosseiramente granulares em células epiteliais das criptas intestinais e células da parede de vasos sanguíneos. Njaa et al. (2000) observaram um padrão de marcação citoplasmática variando de grosseiro a finamente granular em células epiteliais sebáceas, queratinócitos, células mononucleares na derme e células musculares lisas de vasos sanguíneos.

A alteração vascular na doença das mucosas caracteriza-se pela necrose da parede vascular, bem como pela presença de infiltrados perivasculares (Liebler-Tenorio et al., 2000). Nestas áreas, a ocorrência marcante do antígeno do VDBV é um achado comum na literatura (Haines et al., 1992; Baszler et al., 1995; Spagnuolo-Weaver et al., 1997; Liebler-Tenorio et al., 2000). Outros autores também encontraram essa mesma distribuição do vírus da DBV em animais PI (Grooms et al., 1996; Njaa et al., 2000) e com infecção aguda experimental (Fredriksen et al., 1999a, b). Thür et al. (1997) observaram esta marcação em tecidos de fetos abortados ou com morte perinatal.

Em pesquisas anteriores, sugeriu-se que esse amplo envolvimento de vasos sanguíneos em tecidos de animais com MD e persistentemente infectados com VDBV era devido às interações inespecíficas provenientes da ligação do anticorpo anti-VDBV com receptores Fc de células endoteliais e componentes elásticos das paredes de vasos sanguíneos, ficando o envolvimento dos mesmos limitado à marcação ocasional de células mononucleares na adventícia (Haines et al., 1992; Bielefeldt-Ohmann, 1995). Entretanto, estudos posteriores

verificaram que o VDBV é frequentemente encontrado em células musculares, bem como no endotélio de vasos sanguíneos (Haines et al., 1992; Fredriksen et al., 1999 a, b; Liebler-Tenorio et al., 2000). No que se refere à presença do antígeno nos vasos sanguíneos, em todo o material testado neste experimento, o VDBV localizou-se mais frequentemente em células musculares lisas da parede de vasos e menos comumente em células endoteliais, confirmando os achados presentes na literatura.

O tropismo do VDBV para tecidos linfóides, epiteliais e sistema nervoso central (SNC) tem sido amplamente demonstrado (Booth et al., 1995; Grooms et al., 1998; Fredriksen et al., 1999; Njaa et al., 2000). Fray et al. (1998) também confirmaram uma grande afinidade do vírus da DBV pelo sistema reprodutivo. Dentre os tecidos epiteliais, a mucosa intestinal possui forte tropismo para o antígeno da DBV (Hewicker et al., 1990; Spagnuolo-Weaver et al.,

1997; Thür et al., 1997). Neste estudo, a reação de IHQ em tecidos provenientes de animal com MD, possibilitou a verificação de dois sítios principais de localização do VDBV: tecido epitelial do trato gastrointestinal superior e inferior e tecido linfóide associado à mucosa intestinal. Também, pôde-se observar que as principais células-alvo do DBV são os linfócitos e macrófagos (Grooms et al., 1996; Marshall et al., 1996; Njaa et al., 2000).

Geralmente, há uma correlação espacial entre o acúmulo do antígeno viral da DBV e lesão tecidual em casos experimentais e naturais de doença entérica (Baszler et al., 1995). Observou-se neste experimento que as células do infiltrado inflamatório marcadas concentraram-se principalmente na mucosa intestinal intensamente destruída. Em outras regiões do trato gastrointestinal também foi possível verificar essa correlação.

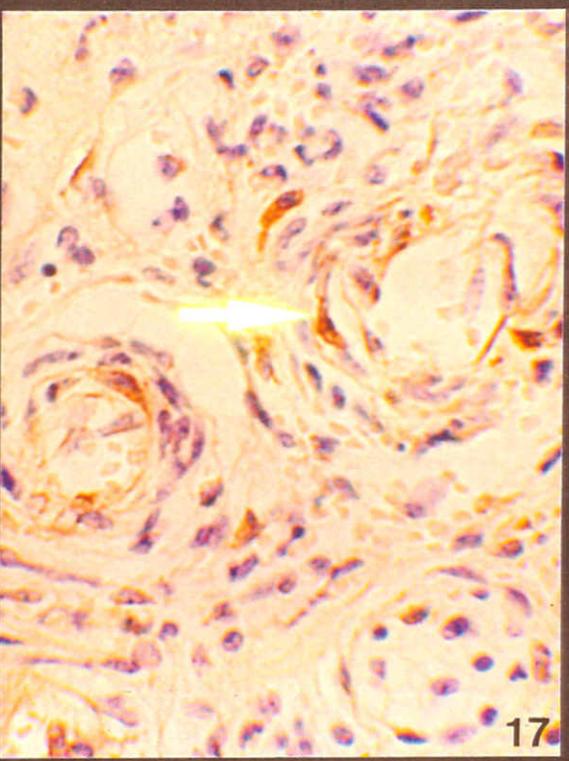
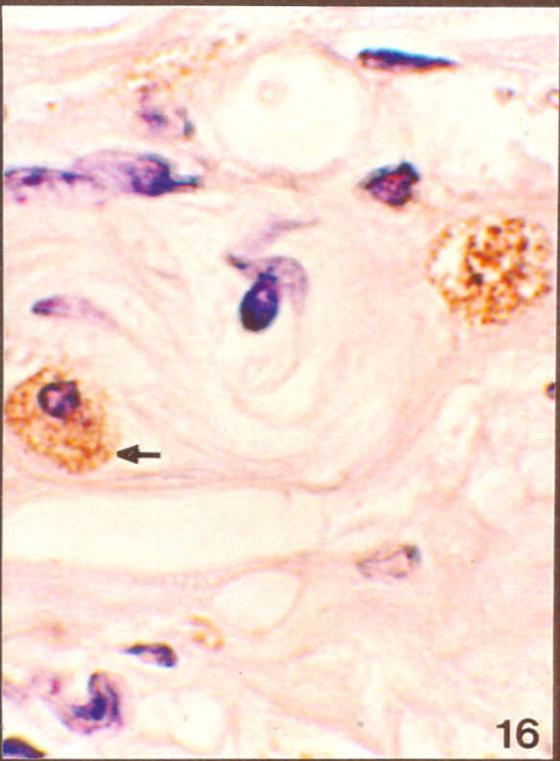
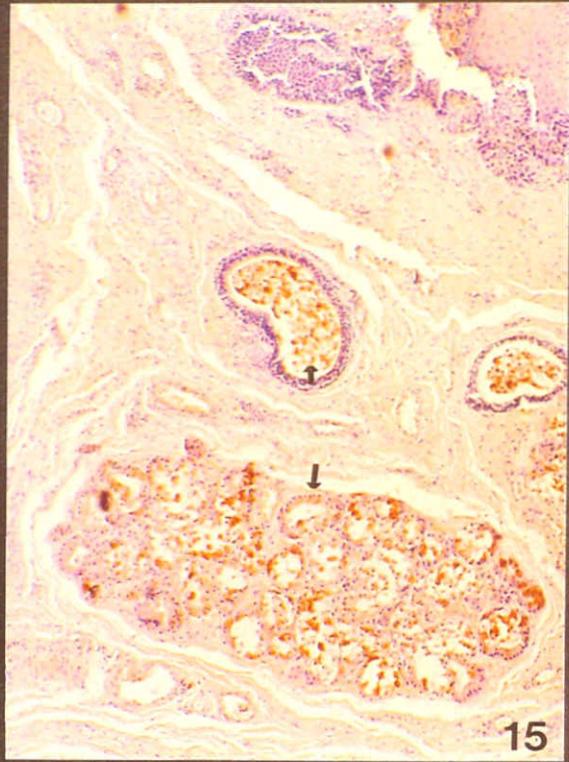
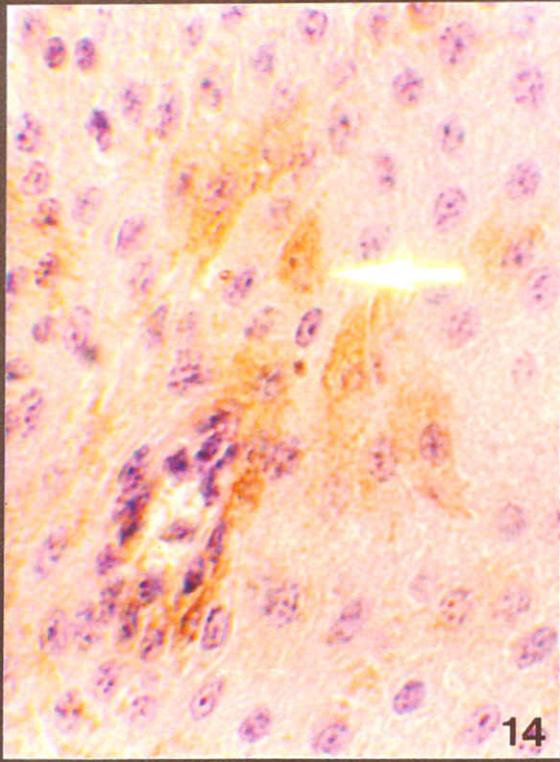
.....

Figura 14 - Secção do esôfago mostrando marcação específica para o antígeno da DBV em células epiteliais da mucosa esofágica. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. Seta indicando célula com marcação específica. 541,2X.

Figura 15 - Glândulas esofágicas e seus ductos com marcação específica para o antígeno da DBV. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. Seta cauda longa (⇨): glândula esofágica; seta cauda curta (♠): conteúdo do ducto de glândula esofágica mostrando marcação específica. 54,1X.

Figura 16 - Granulação citoplasmática característica de imunomarcação específica em secção de língua. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. Seta indicando granulação presente no citoplasma da célula. 1353X.

Figura 17 - Marcação específica de células musculares lisas da parede de vasos sanguíneos na região da submucosa intestinal. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. Seta indicando célula muscular marcada especificamente. 541,2X.



#### 4.3.3.1 Distribuição do Antígeno em Amostras do Inóculo Experimental e de Fetos Suspeitos

Na Tabela 6 é mostrado o resultado obtido pela reação de IHQ para as amostras do bezerro infectado experimentalmente e fetos suspeitos 1 e 2. Na reação de imunohistoquímica para as amostras testadas utilizou-se o "pool" de Mabs na diluição de 1:200 e Kit LSAB/DAB.

A distribuição do VDBV nas secções de órgãos do bezerro inoculado experimentalmente foi observada nas células epiteliais das criptas intestinais e em células do espaço perivascular da submucosa intestinal. Algumas células apareceram marcadas na muscular externa. No linfonodo, linfócitos ocasionalmente presentes no seio subcapsular, além de algumas células distribuídas na cápsula de tecido conjuntivo denso que envolve o órgão, apresentaram marcação específica. No baço, macrófagos e

linfócitos também apresentaram o antígeno da DBV. Células epiteliais de revestimento de brônquios e de bronquíolos estavam marcadas para o VDBV. Células musculares da parede de vasos no pulmão e coração, além de células endoteliais de vasos no coração (Figura 18), também apresentaram-se marcadas para o antígeno da DBV. Dentre todos os órgãos, o intestino foi o que apresentou uma marcação específica mais intensa.

Para o feto 1, a imunolocalização do VDBV no pulmão e coração foi a mesma anteriormente descrita. Nos rins, os túbulos e glomérulos renais apresentaram-se marcados para o antígeno viral. As secções de órgãos do feto 2 testadas pela IHQ não forneceram resultados satisfatórios.

Para todas as reações testadas não houve marcação específica de controles negativos (Figuras 19 e 20).

Tabela 6: Resultado da reação de imunohistoquímica em órgãos do bezerro inoculado experimentalmente e fetos suspeitos para a DBV provenientes de aborto.

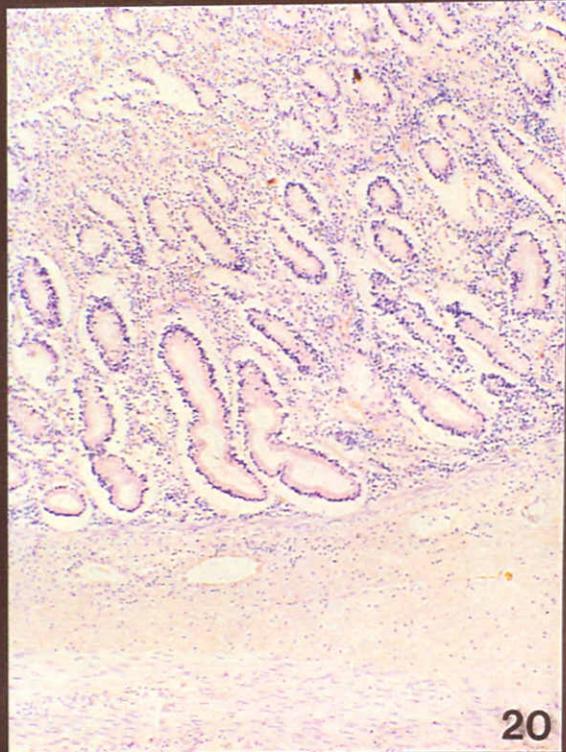
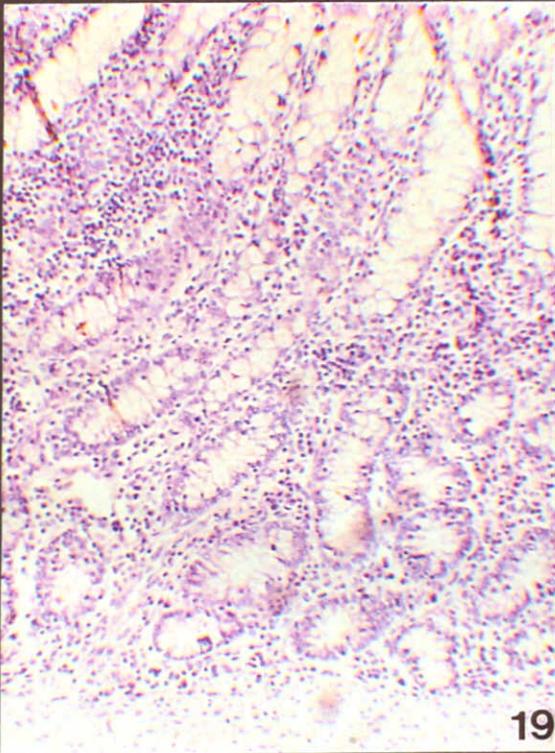
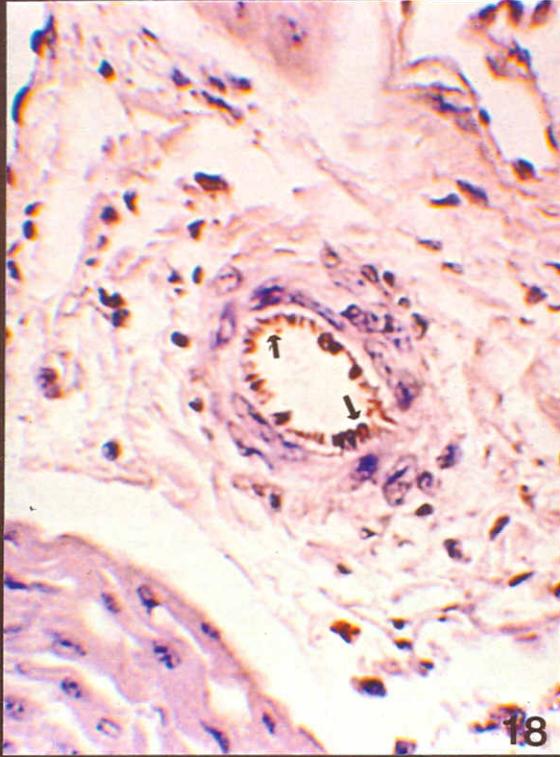
Órgãos	Bezerro inoculado	Feto 1	Feto 2	Imunolocalização
Intestino	P	X	X	Células epiteliais das criptas intestinais; células mononucleares no espaço perivascular de vasos da região submucosa e células mononucleares na muscular externa.
Linfonodo	P	X	X	Células mononucleares no seio subcapsular e cápsula de conjuntivo.
Língua	N	X	X	-----
Baço	P	X	Nd	Linfócitos e macrófagos na polpa vermelha
Pulmão	P	P	X	Células epiteliais de revestimento de brônquios e bronquíolos; células da parede de vasos.
Coração	P	P	X	Células mononucleares no espaço intersticial entre feixes de músculo cardíaco e células musculares e endoteliais de vasos.
Rim	X	P	Nd	Túbulos e glomérulos renais.
Órgão Linfóide	X	X	Nd	-----
Músculo/Glândulas	X	X	Nd	-----

X= não amostrado  
P = positivo

Nd = não determinado  
N = negativo



- 
- Figura 18 - Marcação específica de células endoteliais de vasos sanguíneo nos septos de conjuntivo presentes entre os feixes de músculo cardíaco. Secção de coração do bezerro inoculado experimentalmente. Setas indicando as células endoteliais marcadas. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. 541,2X.
- Figura 19 - Controle negativo da reação em secção de intestino na região de criptas intestinais. Foram mantidos os anticorpos primário e secundário. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. 135,3X.
- Figura 20 - Controle negativo da reação em secção de intestino. Visão geral do corte mostrando região mucosa, muscular da mucosa, submucosa e muscular externa. O anticorpo primário foi substituído por PBS. Cromógeno DAB; contra-coloração por Hematoxilina de Mayer. 54,1X.



A distribuição do antígeno da DBV nos órgãos do bezerro inoculado experimentalmente, sem ingestão de colostro e sacrificado no sétimo dia pós-inoculação foi consistente com alguns achados na literatura. Marshall et al. (1996) inocularam animais livres de VDBV com dois isolados de NCP/VDBV. Em dez dias pós-inoculação foi encontrado o antígeno da DBV distribuído, principalmente, em células mononucleares presentes nos linfonodos, folículos linfóides e tecido conjuntivo perifolicular de placas de Peyer no íleo e no timo. O antígeno específico também foi encontrado no citoplasma de algumas células mononucleares presentes na polpa vermelha do baço.

Em outro estudo, Spagnuolo-Weaver et al. (1997) verificaram a distribuição do VDBV em animais sem ingestão de colostro que foram inoculados experimentalmente com um isolado de VDBV recuperado de um caso agudo de diarreia. Ampla marcação específica foi observada no intervalo entre os dias três a oito pós-inoculação nas placas de Peyer do íleo e outras partes do trato gastrointestinal. Os linfonodos também foram alvo de intensa infecção pelo VDBV e os autores sugeriram a ocorrência do tropismo de diversos isolados de VDBV pelos sistemas gastrointestinal e linfóide.

Marshall et al. (1998) inocularam animais livres do vírus da DBV e de anticorpos contra o VDBV com a cepa clássica NCP/NY-1. Esses autores encontraram grupos de células positivas para DBV entre os queratinócitos nas tonsilas e em partes ulceradas e normais do esôfago, enquanto que no intestino delgado e linfonodos mesentéricos, o antígeno viral esteve presente somente em alguns macrófagos na lâmina própria e seios medulares, respectivamente. Diferente da maioria dos trabalhos já realizados com essa cepa e similares, o experimento acima citado resultou em doença sistêmica severa.

Poucos estudos de IHQ têm sido realizados para o diagnóstico da infecção por VDBV em fetos bovinos abortados. Segundo Haines & Ellis (1994), a marcação imunohistoquímica baseada na utilização de enzimas é um dos meios mais efetivos de diagnóstico de muitas causas importantes de aborto e infertilidade em ruminantes. Neste experimento foi possível obter o diagnóstico do VDBV utilizando a técnica de

IHQ somente em secções de órgãos do feto 1. Como nos estudos de Baszler et al. (1995), não houve associação entre localização do antígeno viral e mudanças histopatológicas em tecidos fetais. Também, a identificação do VDBV nos locais descritos para as secções do pulmão, coração e rim do feto 1, além do envolvimento de vasos sanguíneos foi consistente com outros trabalhos (Baszler et al., 1995; Thür et al., 1997; Fredriksen et al., 1999 a, b). Baszler et al. (1995) afirmou que o antígeno viral da DBV localizou-se, principalmente, no citoplasma de células mononucleares circulantes (fígado, pulmão e baço) e nos ductos coletores do rim. Thür et al. (1997) refere-se ao tropismo do VDBV pelo epitélio (trato gastrointestinal e respiratório, pele e glândulas), além de células da parede de vasos sanguíneos. Os estudos de Fredriksen et al. (1999a) mostraram que o antígeno da DBV estava presente tanto em células epiteliais como em células não epiteliais e Fredriksen et al. (1999b) confirmaram a predileção desse vírus pelas células endoteliais de vasos sanguíneos.

Não foi possível a obtenção de resultados na reação de IHQ para o feto 2 devido à presença de intensa reação inespecífica observada em todas as secções analisadas. Thür et al. (1997) dedicaram em seu experimento uma parte à interferência da autólise no diagnóstico imunohistoquímico em fetos bovinos e ovinos abortados. Em secções criostáticas de tecido, seus resultados mostraram que fetos com autólise, variando de moderada à severa, tiveram sua reação positiva restringida. Cortes de tecido fixados em formalina foram mais adequados para o exame histológico e análise imunohistoquímica, principalmente, as secções do cérebro, em contraposição com outros órgãos como os rins, intestino, baço e fígado, que são menos resistentes à autólise. Segundo estes autores, nesses tecidos a autólise intrauterina interferiu com o êxito da reação de IHQ para a detecção do VDBV em apenas poucos dias após a morte do feto e um dos motivos principais citados neste artigo e congruente com os achados no presente experimento é que a reação inespecífica aumenta em tecidos autolisados. A ocorrência de grande coloração de fundo em tecidos que sofreram autólise também foi citada como a causa da diminuição de sensibilidade de procedimentos imunohistoquímicos (Haines & Ellis, 1994).

Nas secções de tecido do feto 2, o processo autolítico não só interferiu com o exame histológico como também impossibilitou a detecção do VDBV por gerar marcação inespecífica. Portanto, levando-se em consideração a autólise e a resistência ou não de diferentes órgãos ao processo autolítico, o envio de amostras para análise imunohistoquímica deve-se basear em método criterioso de escolha do órgão e tipo de fixação utilizada. Elias (1990), aponta as diferenças existentes para cada órgão em seu conteúdo de enzimas responsáveis pela autólise. Além disso, alguns epitopos dos vírus são mais rapidamente destruídos pela autólise do que outros. Nesse caso, deve-se utilizar vários anticorpos monoclonais em estudos envolvendo fetos autolisados, além do uso de Mabs com ampla capacidade de reação para epitopos mais resistentes à autólise (Thür et al., 1997).

As técnicas estudadas neste experimento poderão ser utilizadas como importantes ferramentas de diagnóstico aplicadas aos procedimentos de rotina para a identificação do agente etiológico da DBV e conseqüentemente no controle desta enfermidade.

## 5. CONCLUSÕES

O método de Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPM) padronizado identificou com sucesso o VDBV a partir do Isolamento Viral, apresentando melhores resultados com a utilização do calor como agente fixador, a soro albumina bovina a 4% em PBS como bloqueador e a revelação com o cromógeno AEC. Anticorpos monoclonais ou policlonais puderam ser utilizados com êxito como anticorpos primários. O ensaio de IPM pode ser realizado em microplacas de 96 pocilhos, processando um grande número de amostras por vez.

A técnica de Imunohistoquímica (IHQ) padronizada identificou satisfatoriamente o VDBV em cortes histológicos e os melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se a combinação de anticorpos monoclonais e o kit comercial LSAB. A melhor revelação foi obtida com o uso do cromógeno DAB. A IHQ mostrou-se um método eficiente e mais rápido do que o teste clássico de IV. Pela IHQ foi possível relacionar as lesões com a distribuição do antígeno da DBV nos tecidos provenientes de novilha com doença das mucosas. A técnica de

IHQ também identificou satisfatoriamente o VDBV em amostras provenientes de animal experimentalmente infectado e de fetos abortados, desde que adequadamente conservados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSHAR, A; DULLAC, GC; DUBUC, C et al. Comparative evaluation of the fluorescent antibody test and microtiter immunoperoxidase assay for detection of bovine viral diarrhoea virus from bull semen. *Can. J. Vet. Res.*, v. 55, p. 91-93, 1991.

AMES, RA; BAKER, JC. Management practices and vaccination programs that help control DBV virus infection. In: Symposium on bovine viral diarrhoea. *Vet. Med.*, p. 1140-1149, 1990.

BAKER, JC. The Clinical Manifestations of Bovine Viral Diarrhoea Infection. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.*, v. 11, p. 425-445, 1995.

BASZLER, TV; EVERMANN, JF; KAYLOR, PS et al. Diagnosis of naturally occurring bovine viral diarrhoea virus infections in ruminants using monoclonal antibody-based immunohistochemistry. *Vet. Pathol.*, v. 32, p. 609-618, 1995.

BIELEFELDT-OHMANN, H; DALSGAARD, K. Indirect immunofluorescence using f(ab')<sub>2</sub> - immunoreagents for the demonstration of bovine viral diarrhoea virus (VDBV) antigen in lymphoid tissue. *Acta Vet. Scand.*, v. 21, p. 705-707, 1980.

BIELEFELDT-OHMANN, H. The pathologies of bovine virus diarrhoea virus infection: a window on the pathogenesis. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.*, v. 11, p. 447-476, 1995.

BOOTH, PJ; STEVENS, DA; COLLINS, ME et al. Detection of bovine viral diarrhoea virus antigen and RNA in oviduct and granulosa cells of persistently infected cattle. *J. Reprod. Fertil.*, v. 105, p. 17-24, 1995.

BROCK, KV. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.*, v. 11, p. 549-561, 1995.

- BRUSCHKE, CJM; WEERDMEESTER, K; VAN OIRSCHOT, JT et al. Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet. Microbiol.*, v. 64, p. 23-32, 1998.
- CANAL, CW; STRASSER, M; HERTIG, C et al. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (VDBV) and characterization of genomes of VDBV from Brazil. *Vet. Microbiol.*, v. 63, p. 85-97, 1998.
- CASTRO, MD; STOFFREGEN, WC; BRIGMAN, GP et al. A method to detect bovine viral diarrhoea virus contamination in cell cultures using immunoperoxidase staining. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 9, p. 427-431, 1997.
- CAY, B; CHAPPUIS, G; COULIBALY, Z et al. Comparative analyses of monoclonal antibodies against pestiviruses: report of an international workshop. *Vet. Microbiol.*, v. 20, p. 123-129, 1989.
- CARBREY, EA; BROWN, LN; CHOW, TL et al. Recommended standard laboratory techniques for diagnosing infectious Bovine Rhinotracheitis, Bovine Virus Diarrhoea, and Shipping Fever (Parainfluenza-3). *Proc. U. S. Anim. Health Assoc.*, v. 75, p. 629-648, 1971.
- CORTESE, VS; GROOMS, DL; ELLIS, J et al. Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. *AJVR*, v. 59, p. 1409-1413, 1998.
- DEREGT, D; MASRI, SA; CHO, HJ et al. Monoclonal antibodies to the p80/125 and gp53 proteins of bovine viral diarrhoea virus: their potential use as diagnostic reagents. *Can. J. Vet. Res.*, v. 54, p. 343-348, 1990.
- DEREGT, D; van RIJN, PA; WIENS, TY et al. Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (type 2) of bovine viral diarrhoea virus define three antigenic domains involved in neutralization. *Virus Res.*, v. 57, p. 171-181, 1998.
- DEREGT, D; PRINS, S. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase monolayer (micro-isolation) assay for detection of type I and type II bovine viral diarrhoea viruses. *Can. J. Vet. Res.*, v. 62, p. 152-155, 1998.
- DONIS, RO. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. In: BAKER, J C. & HOUE, H. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.*, v. 11, p. 393-423, 1995.
- DUBOVI, EJ. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. In: Symposium on bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Med.*, p. 867-872, 1996.
- EDWARDS, S. The diagnosis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v. 9, p. 115-130, 1990.
- EDWARDS, S; PATON, D. Antigenic differences among pestiviruses. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.*, v. 11, p. 564-577, 1995.
- ELAHI, SM; HARPIN, S; CORNAGLIA, E et al. Antigenic variation among bovine viral diarrhoea virus (VDBV) strains and the role of different cell fixation methods in immunoassays. *Can. J. Vet. Res.*, v. 61, p. 34-38, 1997.
- ELIAS, JM. **Immunohistopathology: a practical approach to diagnosis.** ASCP Press: Chicago, USA, 1990. 526p.
- FLORES, EF; GIL, LHGV; BOTTON, SA et al. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhoea virus (VDBV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v. 77, p. 175-183, 2000.
- FRAY, MD; PRENTICE, H; CLARKE, MC et al. Immunohistochemical evidence for the localization of bovine viral diarrhoea virus, a single-stranded RNA virus, in ovarian oocytes in the cow. *Vet. Pathol.*, v. 35, p. 253-259, 1998.
- FREDRIKSEN, B; PRESS, CMcL; LOKEN, T. Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, v. 64, p. 109-122, 1999a.
- FREDRIKSEN, B; PRESS, CM; SANDVIK, T et al. Detection of viral antigen in placenta and foetus of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Pathol.*, v. 36, p. 267-275, 1999b.

GRAHAM, DA; McLAREN, IE; GERMAN, A. Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing. *Vet. J.*, v. 156, p. 149-154, 1998.

GROOMS, DL; WARD, LA; BROCK, KV. Morphologic changes and immunohistochemical detection of viral antigen in ovaries from cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *AJVR*, v. 57, p. 830-833, 1996.

GROOMS, DL; BROCK, KV; WARD, LA. Detection of cytopathic bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle following immunization with a modified live bovine viral diarrhoea virus vaccine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 10, p. 130-134, 1998.

HAINES, DM; CLARK, EG. Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. *Can. Vet. J.*, v. 32, p. 295-302, 1991.

HAINES, DM; CLARK, EG; DUBOVI, EJ. Monoclonal Antibody - based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet. Pathol.*, v. 29, p. 27-32, 1992.

HAINES, DM; ELLIS, JA. Special tests for the diagnosis of infectious causes of reproductive failure in ruminants. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.*, v. 10, p. 561-585, 1994.

HARLOW, E; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor: NY, USA, 1988, 726 p.

HEWICKER, M; WOHRMANN, T; FERNANDEZ, A et al. Immunohistological detection of bovine viral diarrhoea virus antigen in the central nervous system of persistently infected cattle using monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.*, v. 23, p. 203-210, 1990.

HOPPS, HC. **Patologia.** Interamericana: México, 1966, p. 15, 16, 31, 32, 90.

HORNER, GW; THAM, K-M; ORR, D et al. Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription - polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Vet. Microbiol.*, v. 43, p. 75-84, 1995.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (VDBV) infections. *Vet. Microbiol.*, v. 64, p. 89-107, 1999.

KIRKLAND, PD; MACKINTOSH, SG. Bovine pestivirus infections: virology and serology. In: CORNER, LA; BAGUST, TJ (eds.). **Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases.** CSIRO: Melbourne, Australia, 1993. p. 3-16.

KREUTZ, LC; DONIS, R; GIL, LHV et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolate of bovine viral diarrhoea virus. *Bras. J. Med. Biol. Res.*, v. 33, p. 1459-1466, 2000.

LAAMAANEN, UI; NEUVONEN, EP; YLIVIUHKOLA, EM et al. Comparison of RT-PCR assay and virus isolation in cell cultures for the detection of bovine viral diarrhoea virus (VDBV) in field samples. *Res. Vet. Sci.*, v. 63, p. 199-203, 1997.

LEITE, RC. Controle de Diarréia Bovina a Vírus (DBV) e Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 23, p. 531-535, 1999.

LEMOS, RAA. **Diarréia Viral Bovina.** In: Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico. Departamento de Medicina Veterinária, Núcleo de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande - MS, Brasil, 1998. p. 226-258

LIEBLER-TENORIO, E.M; GREISER-WILKE, I; POHLENZ, JF. Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Arch. Virol.*, v. 142, p. 1613-1634, 1997.

- LIEBLER-TENORIO, EM; LANWEHR, A; GREISER-WILKE, I et al. Comparative investigation of tissue alterations and distribution of DBV - viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. *Vet. Microbiol.*, v. 77, p. 163-174, 2000.
- LILLIE, RD. **Histopathologic Technic and Practical Histochemistry**. NY. Country Life Press: Blakiston Company, Inc., 1947, cap. 3, p. 29-37, 47,48.
- LUNA, LG. **Afip Histologic Staining Methods**. NY. McGRAW-HILL: Am. Registry of Pathology, 1968, 258p.
- MARSHALL, DJ; MOXLEY, RA; KELLING, CL. Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Pathol.*, v. 33, p. 311-318, 1996.
- MARSHALL, DJ; MOXLEY, RA; KELLING, CL. Severe disease following experimental exposure of calves to noncytopathic bovine viral diarrhoea virus isolate New York-1. *Aust. Vet. J.*, v. 76, p. 428-430, 1998.
- MEYERS, G; THIEL, HJ. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.*, v. 47, p. 53 - 118, 1996.
- MUÑOZ, DP; LAGER, IA; MERSICH, S et al. Foetal infections with bovine viral diarrhoea virus in Argentina. *Br. Vet. J.*, v. 152, p. 175-183, 1996.
- NETTLETON, PF; ENTRICAN, G. Ruminant pestiviruses: a review. *Br. Vet. J.*, v. 151, p. 615-643, 1995.
- NJAA, BL; CLARK, EG; JANZEN, E et al. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 12, p. 393-399, 2000.
- OLIVEIRA, LG; ROCHE, PM; OLIVEIRA, EAS et al. Presença de pestivírus e anticorpos contra pestivírus em soros e cultivos celulares. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 48, p. 513 - 523, 1996.
- PELLERIN, C; HURK, JVD; LECOMTE, J et al. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, v. 158, p. 168-173, 1994.
- POLAK, JM; VAN NOORDEN, S. **Immunocytochemistry: modern methods and applications**. John Wright & Sons: Bristol, England, 1986. 703p.
- PROPHET, EB; MILLS, B; ARRINGTON, JB et al. **Afip Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Am. Registry of Pathology, 1992, 278p.
- RAMOS-VARA, JA; BEISSENHERZ, ME. Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 12, p. 307-311, 2000.
- RIDPATH, JF; BOLIN, SR; DUBOVI, EJ. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, v. 205, p. 66-74, 1994.
- SAINO, H; WATANABE, H; IKEHATA, T et al. Immunoperoxidase procedures for rapid detection of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus antigen. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 56, p. 805 - 807, 1994.
- SALIKI, JT; FULTON, RW; HULL, SR et al. Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle serum. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, p. 803-807, 1997.
- SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.*, v. 64, p. 123-134, 1999.
- SMITH, GH; COLLINS, JK; CARMAN, J et al. Detection of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in cell culture with an immunoperoxidase test. *J. Virol. Methods*, v. 19, p. 319-324, 1988.
- SPAGNUOLO-WEAVER, M; ALLAN, GM; KENNEDY, S et al. Distribution of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus antigens in tissues of calves following acute experimental infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 9, p. 287-297, 1997.

STOFFREGEN, B; BOLIN, SR; RIDPATH, JF et al. Morphologic lesions in type 2 VDBV infections experimentally induced by strain VDBV2-1373 recovered from a field case. **Vet. Microbiol.**, v. 77, p. 157-162, 2000.

TANIYAMA, H; HIRAYAMA, K; KAGAWA, Y et al. Immunohistochemical demonstration of bovine viral diarrhoea virus antigen in the pancreatic islet cells of cattle with insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Comp. Path.**, v. 121, p. 149-157, 1999.

THOMPSON, SW. **Selected Histochemical and Histopathological Methods**. CC. Thomas Publisher: Illinois, 1966, p. 3, 9-12.

THÜR, B; HILBE, M; STRASSER, M et al. Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. **AJVR**, v.58, p. 1371-1375, 1997.

TREMBLAY, R. Transmission of bovine viral diarrhoea virus. In: Symposium on bovine viral diarrhoea virus. **Vet. Med.**, p. 858 - 866, 1996.

VAN OIRSCHOT, JT; BRUSCHKE, CJM; van RIJN, PA. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. **Vet. Microbiol.**, v. 64, p. 169-183, 1999.

WARD, ACS; KAEBERLE, ML. Use of an immunoperoxidase stain for the demonstration of bovine viral diarrhoea virus by light and electron microscopies. **Am. J. Vet. Res.**, v. 45, p. 165-170, 1984.

ZABAL, O; KOBRAK, AL; LAGER, IA et al. Contaminación del suero fetal bovino con virus de la diarrea viral bovina. **Rev. Arg. Microbiol.**, v. 32, p. 27-32, 2000.

ZHANG, G; ALDRIDGE, S; CLARKE, MC et al. Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis. **J. Gen. Virol.**, v. 77, p. 1677-1681, 1996.