

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

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO GENITAL DO HERPESVIRUS BOVINO 1 (HVB 1)
PELOS MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IMUNOFLOURESCÊNCIA DIRETA

Cyro de Lima Galvão

Belo Horizonte
Minas Gerais
1984

Cyro de Lima Galvão

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO GENITAL DO HERPESVIRUS BOVINO 1 (HVB 1)
PELOS MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Belo Horizonte
Minas Gerais
1984

Galvão, Cyro Lima, 1936-

G182d Diagnóstico da infecção genital do Herpesvírus bovino 1 (HVB 1) pelos métodos de isolamento e da imunofluorescência direta. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG , 1984.

42p. ilustr.

Tese, Mestre em Medicina Veterinária. 1. Rinotraqueíte, bovinos - Diagnóstico. 2. Herpesvírus - HVB1- Diagnóstico. 3. Imunofluorescência. 4. Herpesvírus - Isolamento. I. Título.

CDD - 636.208 969 2

Aprovada em: 26/10/84

Ronaldo Reis

PROF. RONALDO REIS

- Orientador -

Rômulo Cerqueira Leite

PROF. RÔMULO CERQUEIRA LEITE

Aurora Maria Guimarães Gouveia

PROF. AURORA MARIA GUIMARÃES GOUVEIA

À minha esposa Oceania que,
com sacrifício e abnegação
foi o grande estímulo desta
minha jornada.

Aos meus filhos Marcus Vi-
nicius e Aline.

Ao meu pai, minha homenagem
póstuma.

À minha querida mãe, Antônia.

AGRADECIMENTOS

Pelo apoio, estímulo e colaboração prestados, o autor registra os seguintes nomes:

JOSÉ OLINO ALMEIDA DE ANDRADE LIMA - Diretor Técnico da EPABA - Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia;

RONALDO REIS - Professor Titular da disciplina de Doenças a Vírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, Orientador;

RÔMULO CERQUEIRA LEITE - Professor Assistente da disciplina de Doenças a Vírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG;

AURORA MARIA GUIMARÃES GOUVEIA - Professora Assistente da disciplina de Doenças a Vírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG;

MASSAMI NAKAJIMA - Médico Veterinário do LANARA - Laboratório Nacional de Referência Animal;

ROMÁRIO CERQUEIRA LEITE - Professor Assistente da disciplina de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG;

ANTÔNIO CERQUEIRA LEITE - Médico Veterinário, estudante de Pós-Graduação;

DORACY DE FÁTIMA REIS - Bióloga, Laboratorista da Escola de Veterinária da UFMG;

e a todos aqueles que de alguma maneira possibili-

taram a realização deste trabalho, meus agradecimentos sinceros.

Um agradecimento especial aos colegas de Mestrado BENEDITO LUIZ FIGUEIREDO, BENVINDO DE ALMEIDA AGUIAR, ERNESTO RODRIGUES SALAS e PEDRO MOACIR PINTO COELHO MOTA, pelos agradáveis momentos de convivência e pelo saudável espírito de companheirismo que demonstraram.

Este trabalho contou com o suporte financeiro das seguintes Instituições:

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DA BAHIA.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA.

FUNDAÇÃO DE ESTUDO E PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA.

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR.

RESUMO

Foram examinados para herpesvírus bovino 1 (HVB 1), 315 materiais de campo procedentes de rebanhos distribuídos em onze municípios do Estado de Minas Gerais. Havia histórico de problemas na esfera reprodutiva.

Investigaram-se 230 amostras de raspado prepucial, 47 de muco cérvico-vaginal e 38 de raspado vulvo-vaginal.

Isolou-se HVB 1 em 51,4% dos materiais investigados em cultivo de células MDBK. A identificação do agente foi feita com a prova de soroneutralização.

Pelo teste da imunofluorescência direta, foi possível detectar-se HVB 1 em 40,0% dos materiais examinados.

A imunofluorescência mostrou-se menos sensível mas de especificidade idêntica ao do método de isolamento do vírus no diagnóstico da doença.

A sensibilidade da linha MDBK para investigar material de campo, foi considerada satisfatória.

SUMÁRIO

| | Página |
|------------------------------------|--------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 5 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 11 |
| 4. RESULTADOS..... | 20 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 26 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 31 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 33 |

1. INTRODUÇÃO

O herpesvírus bovino 1 (HVB 1), agente etiológico da rinotraqueíte infecciosa bovina - vulvovaginite pustulosa infecciosa (IBR-IPV), é responsável por graves danos à economia pecuária. Na França, PIERSON & VAIR (1965) estimaram perdas de 51 dolares por animal afetado, especialmente nas explorações leiteiras, onde a enfermidade provoca uma acentuada queda na produção de leite e, em certos casos, inúmeros abortos. Estudo mais recente, na Grã-Bretanha (WISEMAN et alii, 1979), utilizando gado de corte, durante seis semanas, estimou em 36 libras o custo médio de cada animal submetido a risco de infecção em focos de IBR-IPV.

STEDDOM (1895) descreveu, pela primeira vez, a forma genital (IPV) da doença na América do Norte e KOKLES (1967), na Europa, relatou que lesões similares eram observadas no gado, especialmente na Alemanha, a partir de metade do século passado. Ficou assim demonstrado que essa forma clínica já existia em ambos os continentes antes do surgimento da forma respiratória (IBR), só descrita nos Estados da Califórnia e Colorado (U.S.A) por SCHROEDER & MOYS (1954) e MCKERCHER et alii (1955).

Pouco depois, GILLESPIE et alii (1959) e MCKERCHER et alii (1959) compararam cepas de vírus de ambas as formas clínicas e concluíram tratar-se de um só agente etiológico, já

que eram idênticas na morfologia, na ação sobre cultivos celulares, na patogenicidade para bezerros e na patologia, além de também iguais nas provas de imunidade cruzada em bezerros e nos testes de reciprocidade sorológica, resultando daí uma denominação combinada de IBR-IPV.

Mais recentemente, o HVB 1 tem sido também associado a manifestações oculares, reprodutivas, nervosas, digestivas, cutâneas e formas subclínicas, ocorrendo separadamente ou de modo simultâneo.

Infecções experimentais de HVB 1 foram descritas em cabras (McKERCHER et alii, 1959), suínos (WOODS et alii, 1968; NELSON et alii, 1972) e furões (SMITH, 1978).

Não obstante ser um vírus que se propaga essencialmente em bovinos, alguns autores notificaram a presença de HVB 1 em suínos (ONSTAD & SAXEGAARD, 1967; SAXEGAARD & ONSTAD, 1967; DERBYSHIRE & CAPLAN, 1976), em cabras (MOHANTY et alii, 1972), búfalos (ST. GEORGE & PHILPOTT, 1972), gnú (KARSTAD et alii, 1974), mink e furões (PORTER et alii, 1975).

O aparecimento da infecção natural depende de uma enorme variedade de fatores, tais como a cepa de vírus, a dose e a via de inoculação, o estado imunitário do animal exposto e também das influências ambientais.

A doença é facilmente transmitida em razão de grandes quantidades de partículas víricas eliminadas pelas secreções respiratórias, oculares e genitais de animais infectados.

DAVIE & DUNCAN (1974) admitem que o HVB 1 perpetua-se na população bovina por contato direto e ainda, possivelmente, pela infecção latente que se reativa de forma ocasional; dessa maneira, a maioria dos animais com anticorpos humorais específicos para HVB 1 seriam portadores potenciais da IBR-IPV, capazes de excretar o vírus após sua reativação provavelmente associada com "stress" de movimentação, transporte, alimentação ou parto.

No Brasil, o primeiro isolamento de HVB 1 ocorreu no Estado da Bahia, quando ALICE (1978), examinava raspados das

pústulas de vacas que apresentavam lesões vulvo-vaginais semelhantes às da IPV. Nessa mesma época, MUELER et alii (1978), em São Paulo, também isolaram e identificaram o HVB 1 que era contaminante de uma cultura de células renais de feto bovino.

O teste sorológico mais difundido para mensurar níveis de anticorpos humorais anti-HVB 1 é o da soroneutralização (SN) pelo método beta (HOUSE & BAKER, 1971) e, mais recentemente, o da microssoroneutralização (MSN) segundo JENNEY & WESSMAN (1978), através dos quais a prevalência mundial da IBR-IPV tem sido estimada entre 15% e 60%.

Convencionalmente, o diagnóstico laboratorial do HVB 1 é feito pelo isolamento do vírus em cultivos celulares primários que revelam, ao microscópio, efeito citopático (ECP) característico e inclusões virais intranucleares do tipo A, de Cowdry. A identificação se faz, em seguida, examinando-se o agente isolado frente a soro hiperimune específico anti-HVB 1 em provas de SN ou de MSN.

Ainda que a maior sensibilidade para isolamento de HVB 1 seja das culturas primárias, especialmente as de células renais, seu uso torna-se bastante limitado por dificuldades na obtenção de feto bovino o que se viabiliza estudar, a nível local, o emprego da linha celular MDBK (MADIN & DARBY bovine kidney) como alternativa para o isolamento do vírus nas investigações de rotina.

A técnica da imunofluorescência direta (IFD) é também utilizada para detecção do HVB 1 em culturas de células infectadas (SCHIPPER & CHOW, 1968), em tecidos fetais e placentários (REED et alii, 1971) e em diversas secreções corpóreas (TERPSTRA, 1979).

Se, por um lado, o isolamento do HVB 1 em linhas celulares e sua posterior identificação pelos métodos de SN ou de MSN recebem críticas especialmente relacionadas com a sofisticação do método, nem sempre ao alcance da maioria dos laboratórios e com um período prolongado, de até 21 dias, para emissão dos resultados a técnica da IFD, em contra-partida

é criticada principalmente pela interpretação subjetiva dos resultados originando, em consequência, opiniões contraditórias quanto ao seu uso.

Em vista disso, o presente trabalho tem por finalidades:

a) avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica da IFD, quando comparada com os procedimentos convencionais para isolamento e identificação de HVB 1 em amostras de campo;

b) observar a eficiência da linha celular MDBK para o isolamento de HVB 1.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Patogenicidade

O herpesvírus bovino 1 (HVB 1) penetra no corpo do animal pela via respiratória ou pelo trato genital, ocasionando, respectivamente, a forma clínica IBR ou as formas IPV, nas fêmeas e IPB, nos machos.

A IBR é freqüentemente acompanhada por conjuntivite, provocando, algumas vezes, seqüelas caracterizadas por enterite, meningoencefalite ou aborto.

2.1.1. Fêmeas

A IPV manifesta-se pela formação de pústulas e descarga muco-purulenta no trato genital. A mucosa da vulva se apresenta com hiperemia e pontos escuros que evoluem para vesículas e pústulas passíveis de alcançarem também a mucosa vaginal; em alguns casos as pústulas coalescem, dando origem a uma membrana fibrinosa branco-amarelada que, ao se destacar da mucosa, resulta na formação de úlceras (McKERCHER, 1963). Esta forma clínica pode ser transmitida pela monta natural ou pelo contato focinho-vulva, conforme observaram KARHS & SMITH (1965), e a recuperação do animal geralmente se dá entre 2 - 3 semanas. Pode ocorrer, contudo, recrudescência intermitente do

HVB 1 em certos animais recuperados, com isolamento de vírus e ausência de doença clínica (SNOWDON, 1965). Deve-se ressaltar, entretanto, que nem toda lesão necrótico-pustulosa na mucosa da vulva e/ou vagina caracteriza a presença do HVB 1, já que vaginite necrótica pode ocorrer secundariamente a ferimentos de parto ou sadismo ou, ainda, por irritação devida a produtos cáusticos. Por outro lado, ocorrência de vaginite granular que se manifesta pela presença de lesões granulares na mucosa da vulva pode resultar em falso diagnóstico, tratando-se às vezes, de uma hipoplasia de folículos linfoides na mucosa, que origina lesões de cor pardacenta ou alaranjada menores que as da IPV; elas não aumentam de tamanho nos dias subseqüentes e não se associam a descarga muco-purulenta ou desconforto (KARHS, 1977).

2.1.2. Machos

A balanopostite pustulosa infecciosa (IPB) pode ocorrer em touros que cobrem vacas com IPV. A infecção adquirida caracteriza-se por uma severa balanopostite, cujas lesões são semelhantes àquelas da forma vulvo-vaginal; as úlceras de correntes induzem o aparecimento de infecção bacteriana secundária, resultando em descarga prepucial purulenta. O estado geral pode ser afetado por febre, depressão e inapetência, ocorrendo indisposição para a monta. Em casos não complicados, a cura se estabelece em 10-14 dias, ainda que a aptidão para a cópula e ejaculação só retornem em 4-5 semanas (KENDRICK & McENTEE, 1967)

Estudos sobre o efeito da inseminação de gado susceptível com sêmen contendo HVB 1 revelaram como possíveis seqüelas: endometrite e redução no período do estro (KENDRICK & McENTEE, 1967), assim como acentuado decréscimo na taxa de concepção (PARSONSON & SNOWDON, 1975).

Presume-se o aborto como consequência de uma infecção respiratória (IBR) natural ou do uso inadvertido de vacinas produzidas com vírus vivo modificado. Em ambos os casos, é

indispensável que a fêmea esteja susceptível no momento da infecção primária, quando então, por via hematogênica, o HVB 1 poderá ser transportado à placenta e posteriormente, através da veia umbelical, alcançar o feto, ocasionando sua morte (OWEN et alii, 1964); o aborto, portanto, é sempre decorrente da morte fetal.

Sob condições de campo, cerca de 25% das fêmeas prenhes entre 4 e 7 meses podem abortar durante um surto, mas, em geral, a morte do feto acontece no último trimestre da gestação. Experimentalmente, contudo, OWEN et alii (1964) e KAHRS et alii (1973) observaram que essa morte pode ocorrer em qual quer fase de prenhes e muitas vezes é provocada por uma infecção subclínica.

Fetos abortados por comprometimento com a doença revelam autólise, coloração amarronzada, tecidos friáveis, líquido nas cavidades torácica e abdominal, mas ausência de lesões macroscópicas. Ao microscópio, é possível observar-se, em tais fetos, necrose focal do fígado, rins e glândulas supra-renais, além de inclusões intra-nucleares, nestas últimas (KENNEDY, 1973). O intervalo entre a exposição do vírus e o aborto pode variar de 8 dias (SAUNDERS et alii, 1972; WILSON, 1974) a muitos meses (DELLERS, 1975) após a ocorrência do surto, já que um animal infectado adquire o estado de portador da doença, tornando-se apto a reexcretar o vírus em condições especiais.

2.2. Diagnóstico

2.2.1. Sorológico

Em virtude da ocorrência freqüente de formas fugazes e subclínicas da IBR-IPV, nem sempre é possível um diagnóstico direto do HVB 1, por detecção de vírus. Quando isso acontece, o procedimento adequado é o uso de hemossoros pareados, colhidos com intervalos de 2-3 semanas em bovinos suspeitos, empregando-os em provas sorológicas que permitam salien-

tar uma elevação pronunciada no nível de anticorpos humorais.

O emprego desse modelo sorológico para diagnosticar HVB 1 deveu-se a MOHANTY & LILLIE (1965), os primeiros a padronizarem, para esse fim, a clássica técnica de SN. Considerada muito específica sofreu, ao longo do tempo, certas modificações que permitiram melhorar também sua performance quanto à sensibilidade (HOUSE & BAKER, 1971; HUCK & WOODS, 1972; FAYE et alii, 1976; BITSCH, 1978).

A segunda prova de maior uso em inqueritos sorológicos é da HA passiva e seus adeptos consideram-na mais sensível, mais rápida e menos onerosa do que a SN. Contudo, também foi necessário introduzir certas modificações na técnica, para que se alcançasse o atual nível de confiabilidade (WHITMAN & HETRICK, 1965; VENGRIS & MARÉ, 1971; ZYAMBO et alii, 1973a; ZYAMBO et alii, 1973b; DANNACHER et alii, 1979).

Outros testes sorológicos foram igualmente aplicados ao diagnóstico indireto do HVB 1 com resultados nem sempre satisfatórios. WELLEMANS & LEUNEN (1973) compararam três desses métodos e concluíram que o teste da imunofluorescência indireta (IFI), de emprego particularmente fácil, era mais sensível do que a SN e mais específico do que o teste da fixação do complemento (FCI); ESTELA (1967), CHARTON et alii (1975), DARCEL (1977) e LE JEUNE et alii (1977) aplicaram a técnica da imunodifusão (ID) considerando-a de execução simples e mais econômica, demonstrando boa correlação com a SN.

Resultados encorajadores foram conseguidos com a prova da ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e da imunoperoxidase por HERRING et alii (1980) e EDWARDS et alii (1983), respectivamente, que concordaram, entretanto, com a necessidade de novas investigações, a nível de campo, para melhor avaliação dos resultados.

2.2.2. Viroológico

Os materiais apropriados ao diagnóstico viral do

HVB 1 são fragmentos de tecidos e órgãos, exsudatos, secreções diversas e conteúdo prepucial. Exsudatos e secreções geralmente são colhidos pelo emprego de "swabs" mas, no caso de muco cêrvico-vaginal (MCV), outros métodos de colheita são também aplicados, como o uso da pipeta especial descrita por BARTLETT (1949) e o do tampão de gaze relatado por MEDEIROS & FIGUEIREDO (1971). Para colheita do conteúdo prepucial, a técnica preferida, no presente, é a de BARTLETT (1949).

Para isolamento do vírus, CARBREY et alii (1971) utilizaram com sucesso as linhagens celulares BT (Bovine Turbinate Cell Line) e EBTr (Embryonic Bovine Tracheal Cell Line) enquanto CANCELLOTTI & TURILLI (1975) trabalharam com a linha AU-BEK derivada de cultura primária de células renais de feto bovino. Contudo, o procedimento convencional requer o isolamento do vírus, preferencialmente em cultivos celulares primários de rim ou testículo de feto bovino, usualmente de difícil obtenção (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977).

Mais recentemente, HOMAN & EASTERDAY (1980/1981), cultivaram "in vitro" seções de glânglios trigêmeos de bovinos e co-cultivaram com a linha celular MDBK outras seções do mesmo tecido, conseguindo isolar o HVB 1 latente em animais sem doença clínica.

O segundo passo, após isolamento do agente, é promover sua identificação pelo emprego da SN. HOUSE & BAKER (1971) consideraram o método alfa da SN (vírus variável-soro constante) mais sensível que o beta (vírus constante-soro variável), admitindo contudo o uso deste último, em certos casos, pela sua maior versatilidade e menor custo operacional, aspectos que também induziram a aplicação da microtécnica (SULLIVAN & ROSENBAUM, 1967) nos estudos de SN do HVB 1 (ROSSI & KIESEL, 1971; DANNACHER & MARTEL, 1978; JENEY & WESSMAN 1978).

O teste da imunoflorescência direta (IFD) é o segundo procedimento indicado para detecção do HVB 1. É um método rápido e de fácil manipulação, requerendo, não obstante, microscópio especial para observação e interpretação dos exa-

mes.

GRATZEK et alii (1966) foram pioneiros no uso da IFD e da microscopia eletrônica (ME) para um estudo comparativo do HVB 1 replicado em cultivos celulares primários de testículo bovino.

SCHIPPER & CHOW (1968) e NETTLETON et alii (1983), empregaram a IFD para detecção do HVB 1 em esfregaços de secreções nasais e oculares, usando também impressões de tecidos diversos colhidos de animais naturalmente infectados com cepas de IBR.

REED et alii (1971) e POSPISIL et alii (1979) usaram a IFD para detectar HVB 1 em rebanhos com histórico de abortos esporádicos, nascimentos prematuros e neonatos debilitados, examinando cotilédones placentários assim como órgãos de fetos e de neonatos que não haviam ingerido o colostro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Constituiu-se de cinco fetos mestiços da raça Nelore, com 1-2 meses de concepção, 47 mucos cêrvico-vaginais (MCV), 38 raspados vulvo-vaginais (RVV), 230 raspados prepuciais (RP) e 52 hemossoros de bovinos etariamente aptos para reprodução, mas que pertenciam a rebanhos com histórico de baixa fertilidade, repetição de cios, abortos esporádicos, nascimentos prematuros e neonatos debilitados.

Localizados no Estado de Minas Gerais, os rebanhos receberam, para efeito descritivo, as classificações A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e L representando, respectivamente, onze municípios: Bambuí, Guarani, Ibirité, João Pinheiro, Luz, Nepomuceno, Pedro Leopoldo, Piranguinho, Pirapora, Santo Antônio do Monte e Unaí.

Os rebanhos eram controlados para brucelose, leptospirose, tricomonose e campilobacteriose.

3.1.1. Fetos

Foram recebidos no laboratório, sob refrigeração, examinados por necrópsia, colhendo-se no ato, peças de pulmão, fígado, rim e baço.

Para isolamento de vírus, macerava-se aproximadamente 1 grama de cada peça, em "pool", ao qual se acrescentava solução salina fosfatada (PBS) pH 7,2 suplementado com 0,3% de albumina bovina* (AB), fração V, para obter-se uma suspensão final a 20% centrifugada, em seguida, por 20 minutos a 1500 g, a 4°C. O material sobrenadante era tratado com antibióticos (1000 UI de penicilina G potássica**, 1000µg do sulfato de estreptomicina** e 50µg de anfotericina - B*** por ml) durante 30 minutos a 4°C, sendo usado imediatamente ou estocado a -80°C.

Para detecção de vírus por imunofluorescência direta (IFD), os fragmentos colhidos eram seccionados (3-4 micra de espessura) em micrótomo de congelamento, depois do que se montavam dois cortes do tecido por lâmina. A fixação era feita em acetona, por 15 minutos, à temperatura ambiente e o material corado em seguida ou estocado a 4°C ou -20°C, dependendo do tempo de duração da estocagem.

3.1.2. Raspado vulvo-vaginal (RVV); muco cêrvico-vaginal (MCV)

As 38 amostras de RVV eram constituídas de pústulas e exsudato vulvo-vaginal. Foram colhidas usando-se cotonelete**** estéril, que era depois introduzido em tubo contendo 2 ml de PBS + AB e mantido sob refrigeração até chegar ao laboratório, preferencialmente no mesmo dia.

O MCV (47 amostras) foi colhido com pipeta semelhante às utilizadas em inseminação artificial; a ela se acoplava uma pera de borracha para sucção do muco, logo transferido a

* Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri (USA)

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

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

**** Johnson & Johnson S/A, Jaguariuna, São Paulo (Brasil)

tubo contendo 2 ml de PBS + AB e transportado em recipiente refrigerado.

No mesmo dia da colheita, o material chegava ao laboratório onde era submetido a uma agitação vigorosa em aparelho Vortex*, para dispersar o muco ou exsudato; no caso do cotonete, sua remoção era efetuada e o volume inicial completado com PBS + AB. A suspensão era tratada com antibióticos, separada em duas alíquotas, uma das quais, para isolamento de vírus, podia ser estocada a -80°C até o momento do uso. Da segunda alíquota, 0,025 μl eram depositados sobre lâmina de teste múltiplo para IF (contendo oito anéis delimitadores de áreas), usada no exame de toxoplasma**; utilizava-se um anel para cada material, que depois secava a 37°C , por 10 minutos, procedendo-se posteriormente a fixação em acetona, por 15 minutos; a lâmina era usada em seguida ou estocada a -20°C para uso oportuno.

3.1.3. Raspado prepucial (RP)

Colheram-se 230 amostras, com uso de pipeta preconizada por BARTLETT (1949). O material era vertido para 10 ml de salina a 0,85%, tamponada, pH 7,2, que se transportava sob refrigeração.

No laboratório, separava-se uma alíquota de 2ml, tratando-a com a mesma concentração de antibióticos para isolamento de vírus, sendo o restante do material centrifugado (4°C) a 120 g por 10 minutos; o sobrenadante era novamente centrifugado a 10.000 g, por 30 minutos e o sedimento, diluído para fornecer uma suspensão de células adequadas ao teste de IFD, executado como descrito em 3.1.2.

* Biomatic, Porto Alegre, Rio Grande do Sul (Brasil)

** Inlab, São Paulo, São Paulo (Brasil)

3.1.4. Soros

Examinaram-se, para soro-conversão, 26 hemossoros pareados, colhidos com intervalos de trinta ou sessenta dias nos mesmos bovinos que forneceram material para isolamento de vírus. Os soros foram clarificados por dois ciclos de centrifugação a 1000 g, durante 20 minutos, inativados em banho maria (BM) a 56°C por 30 minutos e estocados a -20°C até o momento do uso.

3.1.5. Vírus de referência

Cepa IBR-LA, cedida pela Universidade de Davis, Califórnia, foi usada para produção de soro hiperimune e como antígeno em provas sorológicas.

3.1.6. Soro hiperimune

Produzido em coelhos adultos, machos, infectados com a cepa viral de referência. O inóculo era preparado usando-se $10^{8.5}$ DICC 50/ml da cepa IBR-LA, emulsionada em partes iguais com adjuvante completo de Freund. Os animais, sangrados previamente, sofriam o seguinte esquema de hiperimunização: 1º dia, 1 ml do vírus puro por via intravenosa (IV) e 2 ml de emulsão viral por via intramuscular (IM), em dois sítios diferentes: 15, 30 e 45 dias depois da primeira inoculação (DPI), repetiam-se as doses IV e IM; no quinquagésimo quinto dia DPI extraia-se o sangue total por punção cardíaca e o soro processado como em 3.1.4, era titulado na linha MDBK cultivada em microplaca.

3.1.7. Cultivos celulares

3.1.7.1. Meios de cultivo

Para crescimento da linha celular, utilizou-se o

MEM-Eagle* filtrado e suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado, tendo em vista os achados de GIBBS & RWEYEMAMU (1977). Para evidenciação do vírus, o meio de manutenção (MM) utilizado foi idêntico ao de crescimento, exceto que continha 0,3% de albumina bovina (AB) em lugar do SFB. Na microssoro - neutralização a AB era substituída por soro de galinha (SG) a 2% (ALICE et alii 1960 - 61; DANNACHER & MARTEL, 1978), ou SFB.

3.1.7.2. Linha celular

Usou-se a linhagem de células MDBK (MADIN & DARBY bovine kidney), cedida pelo Centro Panamericano de Febre Afetosa - Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil.

Os monoextratos celulares, cultivados em frasco de vidro, pyrex, semelhante àquele utilizado para diluição de leite, eram lavados com solução salina fosfatada (PBS) pH 7,2 e incubados a 37°C, por cinco minutos, com solução de tripsina versene (STV), preparada com tripsina** a 0,5% e EDTA-ácido etilenodiaminotetracético***. A suspensão celular assim obtida, era diluída na concentração de 3×10^5 células/ml em meio de crescimento e logo distribuída em tubos de ensaio 16 mm x 150 mm e tubos Leighton com lamínulas, em volumes respectivos de 1 ml e 1,5 ml. Os tubos de cultivo mantidos em estufa a 37°C eram usados 48-72 horas após, quando se apresentavam com 70% de confluência celular.

3.2. Métodos

* GIBCO Laboratories, Grand Island, New York (USA)

** DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan (USA)

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

3.2.1. Isolamento e identificação sorológica do virus

Para pesquisa de virus, usavam-se três tubos de cultivo celular MDBK, um dos quais era do tipo Leighton, lavados com PBS por duas vezes, após o que eram inoculados com 0,2 ml do material de campo previamente preparado e incubados a 37°C durante 60 minutos; findo esse período os tubos recebiam 1 ml do meio de manutenção (MM), retornavam à estufa e eram observados ao microscópio por três dias consecutivos, para constatação de efeito citopático (ECP) característico.

Os tubos considerados positivos eram submetidos a três ciclos de congelamento (-80°C) e descongelamento (37°C), centrifugando-se a suspensão celular resultante e usando-se o sobrenadante para titulação do virus em tubos de cultivo ou microplacas* de fundo plano. Os tubos negativos sofriam idêntico ciclo de tratamento, e a suspensão celular, não centrifugada, era inoculada em novos tubos de cultivo por mais quatro passagens seriadas, após o que, persistindo o resultado negativo, descartava-se o material. Ao fim de cada passagem, as células cultivadas sobre lamínulas, no tubo de Leighton, eram fixadas em acetona e usadas para IFD. Quando se iniciou a pesquisa realizavam-se, pelo menos, quatro passagens seriadas do material colhido e, cada uma, era incubada por 7-8 dias, para a observação de ECP. Posteriormente, experimentaram-se também períodos de 2, 3, 4 e 5 dias de incubação, utilizando-se igual número de tubos.

A titulação do virus foi feita com diluições decimais da suspensão viral, inoculadas sobre células cultivadas em tubos ou microplacas de fundo plano. No primeiro caso, usava-se 0,1 ml do inóculo em três tubos de cultivo, por diluição, incubando-os a 37°C por 30 minutos; acrescentavam-se, em seguida, 0,9 ml de MM suplementado com 2% do soro de galinha

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

e os tubos retornavam à estufa, procedendo-se a última leitura microscópica 72 horas após. Calculava-se o título infectante do vírus, pelo método de REED & MUENCH (1938).

No caso da microplaca, utilizou-se a técnica descrita por JENNEY & WESSMAN (1978), para identificar as cepas virais isoladas, substituindo-se o SFB pelo soro de galinha: distribuíam-se 0,025 μ l do diluente MEM-Eagle, sem soro, em fileiras quintuplas, com auxílio de micropipetas* simples ou micropipeta de canais múltiplos**; em seguida, distribuía-se cada diluição do vírus (0,025 μ l) em cinco poços contíguos, permanecendo a microplaca à temperatura ambiente, por 60 minutos, acrescentando-se a cada poço 0,05 μ l da suspensão celular (600.000 células/ml) em meio de crescimento, suplementado com 5% do soro de galinha. A microplaca era mantida a 37°C em incubador contendo 5% de CO₂, a leitura microscópica se fazia 72 horas após e calculava-se o título infeccioso do vírus.

O teste da soroneutralização (SN) foi executado de maneira similar. No caso da técnica em tubos de cultivo, mesclavam-se 200 DICC_{50/0,1ml} (doses infecciosas 50% em cultivo de células) da suspensão viral com igual volume de diluições duplas do soro (método beta); a mistura soro-vírus, contendo 100 DICC_{50/0,1ml}, era incubada a 37°C, por 30 minutos e os procedimentos seguintes eram idênticos aos descritos para a titulação em tubos, exceto que se usavam apenas dois tubos de cultivo, por diluição.

Na microssoroneutralização (MSN), para identificação do vírus, usava-se soro hiperimune de título conhecido em volumes de 0,025 μ l, acrescentando-se igual volume do vírus isolado contendo 200 DICC_{50/0,025 μ l} e incubava-se a mistura, por 60 minutos, à temperatura ambiente. Depois disso, procedia-se de maneira idêntica àquela descrita para a microtitulação, exceto que eram usados apenas dois poços por diluição. E

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

** EFLAB OY, Helsinkí (Finlândia)

ram mantidos controles do meio de crescimento, da suspensão celular e uma titulação do soro hiperimune frente ao vírus de referência.

Na soroconversão, o procedimento foi inverso: utilizaram-se 26 hemossoros bovinos, pareados, diluídos ao dobro, adicionando-se igual volume da cepa IBR de referência contendo, na mistura final, 100 DICC_{50/0,025}µl. Usavam-se controles do meio de crescimento, da suspensão celular e da DICC₅₀, acompanhados por uma titulação do vírus. Os títulos neutralizantes eram expressos como a recíproca da maior diluição do soro que neutralizava 100 DICC₅₀ do vírus de referência. A soroconversão era considerada positiva, quando a diferença de títulos entre os soros correspondia, pelo menos, a quatro diluições logarítmicas.

Fez-se também uma pequena amostragem de frequência sorológica do HVB 1 colhendo-se, ao acaso, 58 soros nos rebanhos que forneceram MCV/RVV.

3.2.2. Imunofluorescência

Para detectar-se a presença do HVB 1, foi utilizada a técnica da imunofluorescência direta (IFD) descrita por SILIM & ELAZHARY (1983).

3.2.2.1. Material examinado

Pulmão, fígado, rim e baço de fetos abortados, exsudato e muco cérvico-vaginal (MCV), e raspado prepucial.

3.2.2.2. Preparação do conjugado

Produzido com soro hiperimune de coelho, segundo a técnica recomendada por GOLDMAN (1966).

3.2.2.3. Coloração das lâminas

3.2.2.3.1 Imunofluorescência direta

O material fixado em acetona foi corado com anticorpos fluorescentes e incubado em câmara úmida, por 30 minutos a 37°C. A lâmina posteriormente lavada com PBS pH 7,2 por três períodos de 15 minutos era enxaguada rapidamente em água destilada, contra-corada por 5 minutos com solução a 0,005% de Azul de Evans em PBS e enxaguada por três vezes em PBS; após secar a 37°C, era montada com glicerina tamponada pH 8,5 e examinada. Usavam-se, como controles de especificidade, materiais reconhecidamente positivos para HVB 1, tratados com soro normal e soros hiperimunes anti-HVB 1 e anti-VDB (vírus da diarréia bovina).

3.2.2.3.2 Inibição da imunofluorescência

Os materiais que apresentavam fluorescência positiva, eram fixados em acetona por 15 minutos à temperatura ambiente, incubados em câmara úmida a 37°C por 30 minutos com soro hiperimune anti-HVB 1 e corados como descrito anteriormente.

3.2.2.4. A avaliação da sensibilidade e da especificidade da IFD foi feita segundo os critérios descritos por THORNER & REMEIN (1961)

3.2.2.5. Microscopia

Utilizou-se microscópio Zeiss, binocular, "Standard WL"*, objetiva de imersão 40 x com diafragma, ocular 10 x, condensador de campo escuro a óleo, filtro excitador UG-2, filtros de barreira 0/41 e iluminação com lâmpada de mercúrio HBD-200 Osram.

* CARL ZEISS, Companhia Ótica e Mecânica Oberkochen (Alemanha Ocidental)

4. RESULTADOS

4.1. Diagnóstico

4.1.1. Frequência de isolamento e IFD

A pesquisa abrangeu rebanhos localizados em 11 municípios de Minas Gerais e o resultado final demonstrou infecção por HVB 1 em todos rebanhos examinados.

A Tabela I apresenta a localização dos rebanhos trabalhados, a amostragem, o tipo de material colhido e a detecção do vírus através do isolamento e da IFD.

Estudou-se um total de 315 amostras colhidas "in vivo", e a frequência geral de isolamento foi de 51,4% (162/315).

A frequência dos resultados obtidos pela IFD, no total das amostras, foi de 40% (126/315).

Das 230 amostras de raspado prepucial (RP) examinadas, 102 (44,3%) foram positivas quanto ao isolamento de vírus e apenas 72 (31,3%) foram detectadas pela IFD (rebanhos D, H, I, J).

As 47 amostras de MCV apresentaram 74,5% (35/47) de positivos pelo isolamento de vírus e 68,0% (32/47) pela IFD (rebanhos C, E e G).

Em 38 amostras de raspado vulvo-vaginal (RVV), con

TABELA I - Frequência do HVB 1 em raspado prepucial, muco cervico-vaginal e raspado-vulvo-vaginal, através das técnicas de isolamento e IFD em alguns rebanhos bovinos de Minas Gerais, 1983/84

| Municípios | Identificação do Rebanho | Número de Amostras | Tipo de Material | Isolamento | | I F D | |
|-----------------------|--------------------------|--------------------|------------------|------------|------|----------|------|
| | | | | Positivo | % | Positivo | % |
| Bambuí | A | 10 | RVV | 08 | 80,0 | 08 | 80,0 |
| Guarani | B | 11 | RVV | 06 | 54,5 | 06 | 54,5 |
| Ibirité | C | 10 | MCV | 08 | 80,0 | 08 | 80,0 |
| João Pinheiro | D | 63 | RP | 30 | 47,6 | 24 | 38,1 |
| Luz | E | 11 | MCV | 06 | 54,5 | 04 | 36,4 |
| Nepomuceno | F | 07 | RVV | 06 | 85,7 | 06 | 85,7 |
| Pedro Leopoldo | G | 26 | MCV | 21 | 80,7 | 20 | 76,9 |
| Piranguinho | H | 08 | RP | 07 | 87,5 | 06 | 75,0 |
| Pirapora | I | 149 | RP | 57 | 38,2 | 35 | 23,5 |
| Sto. Antônio do Monte | J | 10 | RP | 08 | 80,0 | 07 | 70,0 |
| Unaí | L | 10 | RVV | 05 | 50,0 | 02 | 20,0 |
| Total | | 315 | | 162 | 51,4 | 126 | 40,0 |

RVV = Raspado vulvo-vaginal

MCV = Muco cérvico-vaginal

RP = Raspado prepucial

tendo exsudato e vesículas, a frequência de isolamento representou 65,8% (25/38), enquanto que os resultados da IFD foram de 57,9% (22/38) nos rebanhos A, B, F e L.

A especificidade da fluorescência observada nos materiais foi confirmada pelas seguintes observações: soro normal de coelho não inibia a fluorescência em materiais reconhecidamente positivos para HVB 1; soro anti-HVB 1, de bovino convalescente de IBR-IPV, inibia a fluorescência em materiais comprovadamente positivos. Não se detectou fluorescência em culturas de células previamente infectadas com o vírus da diarréia bovina (VDB) ou da mamilite herpética (HVB 2), mas uma fluorescência evidente foi demonstrada em células infectadas com a amostra IPV-FM, isolada na Bahia.

As TAB. II e III apresentam os resultados da IFD, usando-se como referencial comparativo a técnica do isolamento de vírus em cultura de células, considerada universalmente como a de maior eficiência e confiabilidade para o diagnóstico do HVB 1. Para efeito de tabulação reuniram-se, em um só bloco, as amostras de MCV e RVV:

Cinco fetos necropsiados não revelaram qualquer normalidade macroscópica. Detectou-se HVB 1 no citoplasma das células intersticiais do tecido renal, através da IFB, em dois dos cinco fetos examinados, e os resultados se confirmaram pelo isolamento do vírus em cultivo celular, empregando-se suspensão, em "pool", dos fragmentos colhidos.

A IFD apresentou sensibilidade de 78% e especificidade de 100,0% (TAB. IV).

4.1.2. Replicação do HVB 1 "in vitro"

O isolamento do vírus foi feito em cultivo contínuo de células MDBK. O efeito citopático nas culturas inoculadas com amostras de campo foi observado entre 3-5 passagens consecutivas, incubadas por três dias cada.

TABELA II - Resultados obtidos pelo isolamento do vírus e IFD, nos raspados prepuciais colhidos em rebanhos bovinos de Minas Gerais, 1983/84

| IFD \ Isolamento | Positivo | | Negativo | |
|------------------|----------|------|----------|------|
| | Positivo | % | Negativo | % |
| Positivo | 72 | 31,3 | 0 | 0 |
| Negativo | 30 | 13,0 | 128 | 55,7 |
| Total | 102 | 44,3 | 128 | 55,7 |

TABELA III - Resultados obtidos pelo isolamento do vírus e IFD, nos mucos cêrvico-vaginais/raspados vulvo-vaginais colhidos em rebanhos bovinos de Minas Gerais, 1983/84

| IFD \ Isolamento | Positivo | | Negativo | |
|------------------|----------|------|----------|------|
| | Positivo | % | Negativo | % |
| Positivo | 54 | 63,5 | 0 | 0 |
| Negativo | 06 | 7,1 | 25 | 29,4 |
| Total | 60 | 70,6 | 25 | 29,4 |

TABELA IV - Avaliação de sensibilidade e especificidade da IFD

| IFD | HVB 1 isolado (doentes) | HVB 1 não isolado (não doentes) | Total |
|----------|----------------------------|------------------------------------|-------|
| Positivo | 126 | 0 | 126 |
| Negativo | 36 | 153 | 189 |
| Total | 162 | 153 | 315 |

4.1.3. Soroconversão

Nenhum dos soros pareados revelou qualquer elevação no título de anticorpos neutralizantes. Dos 52 soros positivos, 22 (42,3 %) apresentavam título de 1/4; 46,2% (24/52), tinham variações entre 1/8 e 1/32; título \geq 1/64, só foram encontrados em 11,5% (6/52) dos soros.

4.1.4. Frequência de anticorpos

A frequência encontrada para um total de 58 soros, colhidos nos rebanhos que forneceram MCV/RVV, foi de 75,9%.

5. DISCUSSÃO

5.1. Frequência de isolamentos

A frequência de isolamentos foi considerada muito expressiva, especialmente nas fêmeas (70,6%), como demonstra a TAB.III; não foi encontrado, na literatura disponível, resultado similar que possibilitasse a comparação desses dados. Exceto para o rebanho C (TAB. I), as fêmeas que foram examinadas apresentavam histórico de repetição de cios, baixa fertilidade e abortos, o que provavelmente contribuiu para esse alto percentual de frequência (SPRADBROW, 1968; PARSONSON & SNOWDON, 1975). É possível também que o método da pipeta, empregado na colheita do MCV, tenha contribuído para aumentar as oportunidades de isolamento do vírus; salvo engano, é a primeira vez que se utiliza esse artifício visando ao isolamento do HVB 1, já que a literatura consultada se refere apenas ao "swab" como instrumento geral de colheita (CHOW et alii, 1964; McKERCHER & WADA, 1964; SNOWDON, 1965; NETTLETON et alii 1983).

Cerca de 40,4% (19/47) das fêmeas que forneceram MCV (TAB. I) apresentavam lesões de vulvo-vaginite, caracterizadas por hiperemia de intensidade variável na mucosa genital, acompanhada de pequenas vesículas (1-2 mm de diâmetro), de coloração acinzentada, transparentes, que não evoluíam para pústulas, mas, pelo contrário, regrediam a intervalos de tempo

bastante diversos. Não foi possível correlacionar a presença dessas vesículas com a frequência dos isolamentos, uma vez que o HVB 1 também se manifestou em algumas fêmeas destituídas de lesões. Contudo, diante da elevada frequência do agente nos rebanhos investigados, é mais provável suspeitar-se da origem viral, com lesões semelhantes as descritas por MCKERCHER (1963); KAHRS & SMITH (1965); DAVIES & DUNCAN (1974), que daquelas decorrentes da hipoplasia dos folículos linfóides (vulvo-vaginite granular), conforme descreveu KAHRS (1977).

As 38 fêmeas dos rebanhos A, B, F e L, estudadas através do raspado vulvo-vaginal (RVV), eram portadoras de lesões genitais características da forma clínica IPV, com vesículas que evoluíam para pústulas de cor amarelada e ocorrência de exsudato, inicialmente seroso, que mais tarde passava a muco-purulento (KENDRICK & McENTEE, 1967). Apesar do diagnóstico clínico, a frequência do HVB 1 foi mais baixa que no MCV, suspeitando-se do método empregado para colheita do material: quando se usou cotonete, o isolamento foi conseguido em 85,7% dos casos (rebanho F), enquanto o emprego do tampão de gaze, mais difícil de manipular, no laboratório, provocou menor rendimento da suspensão e, conseqüentemente, um aproveitamento menos eficaz das partículas nele contidas.

O conteúdo prepucial foi colhido de bovinos sem doença clínica aparente, não obstante pertencerem a plantéis que registravam baixo desempenho reprodutivo (PARSONSON & SNOWDON, 1975). Dos 102 bovinos, 44,3% revelaram positividade para o HVB 1 (TAB. II). Entretanto, a baixa frequência de isolamentos encontrada nos rebanhos D e I pode não ser real. É possível que o intervalo de tempo entre colheita e exame tenha sido excessivo (3-4 dias), contribuindo para um menor percentual de isolamento. A hipótese pode ser verdadeira, uma vez que conteúdos prepuciais dos rebanhos H e J, trabalhados no mesmo dia da colheita proporcionaram, em média, 83,3% (15/18) de isolamento. Na impossibilidade do uso imediato, o material deverá ser estocado a -80°C , para evitar-se possível redução da sua viabilidade. A simples decantação do material não centrifugado pa-

rece ter melhorado o desempenho quanto à recuperação do vírus. De igual maneira, o artifício de congelar e descongelar a amostra, por três ciclos consecutivos, revelou-se indispensável à liberação do HVB 1, considerado altamente associado à célula.

Os fetos foram abortados após 1-2 meses da concepção, concordando com as observações experimentais de OWEN et alii (1964), SAUNDERS et alii (1972), KAHRS et alii (1973), WILSON (1974) e DELLERS (1975), segundo as quais a morte fetal pode ocorrer em qualquer fase da prenhez. Ao exame macroscópico, os fetos não apresentavam nenhuma anormalidade, diversamente das observações de KENNEDY (1973), que encontrou lesões macro e microscópicas quando examinou fetos abortados provenientes de surtos da IBR-IPV.

A sensibilidade da linha celular MDBK foi satisfatória, mas, lamentavelmente, não se conseguiu dispor de outras culturas contínuas, para comparação, como as de CARBREY et alii (1971) e CANCELOTTI & TURILLI (1975). A manutenção das culturas pelo MEM-Eagle baseou-se no conhecimento de que os aminoácidos, particularmente leucina e arginina presentes neste meio, aumentam a produção de vírus nos cultivos celulares (GIBBS & RWEYEMAMU, 1977).

O período de incubação das amostras testadas, reduzido de sete para três dias, proporcionou resultados análogos, ainda que um diagnóstico negativo só fosse emitido após cinco passagens seriadas. Há fortes indícios de que a rapidez na produção de efeito citopático (ECP) esteja mais relacionada com o número de partículas virais contidas na amostra, do que com a sensibilidade da linha MDBK (HOMAN & EASTERDAY) (1980/1981). Isso tornou-se evidente neste ensaio, quando algumas amostras revelaram positividade já na segunda passagem, embora a maioria dos isolamentos só fosse conseguida entre a terceira e quinta passagens.

A frequência encontrada em 58 soros dos rebanhos A, B, C, D, E, F, G e L foi de 75,9% quando se empregou o método beta da SN sugerido por HOUSE & BAKER (1971) pela sua maior

versatilidade aplicando-o à microtécnica descrita por SULLIVAN & ROSENBAUM (1967) para estudos sorológicos do HVB 1 (ROSSI & KIESEL, 1971; DANNACHER & MARTEL, 1978; JENNEY & WESSMAN, 1978).

A soroconversão, calculada sobre 26 animais do rebanho G, não resultou positiva. Os soros apresentavam títulos neutralizantes idênticos nas duas tomadas de sangue, executadas com intervalos de 30 ou 60 dias, significando que não havia infecção recente pelo HVB 1. Repetição da colheita de MCV nesses animais, proporcionou reisolamento do vírus em 69,0% (18/26), comprovando a reexcreção espontânea do vírus na cervice, por períodos variáveis. Esse resultado coincide com o de SNOWDON (1965), que recuperou HVB 1 de fêmeas, até 140 dias depois da infecção experimental.

5.2. Imunofluorescência direta

Das 162 cepas de vírus detectadas pelo método de isolamento, 126 (77,8%), foram igualmente positivas para IFD (TAB. II e III). Amostras negativas nos cultivos celulares, também o eram na IFD. O método mostrou-se eficiente para detecção de fluorescência em MCV, lavado prepucial e no tecido renal dos fetos bovinos (GRATZEK et alii, 1966; SCHIPPER & CHOW, 1968; REED et alii, 1971; POSPISIL et alii, 1979 e NETTLETON et alii, 1983).

POSPISIL et alii (1979) só encontraram sensibilidade para o teste da IFD quando as suspensões de vírus, preparadas a partir de "swabs", apresentavam títulos pelo menos iguais a 10^2 DICC_{50/0,1ml}; se os valores de vírus livre na mucosa examinada eram mais baixos, a fluorescência era negativa. Esses resultados assemelham-se aos encontrados no presente trabalho com relação à linha MDBK, obviamente menos sensível que culturas primárias: a fluorescência só era demonstrada quando também ocorria produção de ECP, geralmente entre a terceira e quarta passagens. Economicamente, portanto, a inoculação dos cultivos celulares, objetivando o uso da IFD, deixa de ser viável, pelo maior custo com o crescimento e manutenção da li

nha MDBK.

Considerando-se o grande número de fontes fornecedoras do material e a variabilidade das condições em que as amostras foram colhidas, os resultados são encorajadores e o método da IFD, mais simples e rápido, pode ser indicado para o diagnóstico do HVB 1, quando se examinam amostras de campo. Sugere-se, todavia, o uso concomitante do método de isolamento em, pelo menos, alguns dos materiais, para maior segurança dos resultados.

A Tabela III, apresenta uma sensibilidade de 78,0% e uma especificidade de 100,0%, quando se comparou a IFD com o isolamento do vírus, segundo os procedimentos descritos por THORNER & REMEIN (1961).

6. CONCLUSÕES

6.1. O isolamento é, sem dúvida, a melhor técnica para diagnóstico do HVB 1.

6.2. A IFD é menos sensível, mas sua especificidade é idêntica à do isolamento. Seu uso é satisfatório, como teste de triagem.

6.3. A linha de células MDBK presta-se à evidência do HVB 1.

6.4. O desempenho da amostragem para isolamento de vírus pode ser melhorado pelo uso de métodos de colheita adequados (pipeta de BARTLETT, pipeta de inseminação artificial e cotonete), pelo rápido remetimento do material refrigerado, pela não centrifugação da amostra, pela aplicação do processo de congelamento versus descongelamento durante três ciclos e, finalmente, pelo uso de meio de manutenção, contendo os aminoácidos leucina e arginina.

6.5. A frequência de isolamento no muco cêrvico-vaginal e raspado da vulva (70,6%) foi considerada altamente expressiva.

6.6. No conteúdo prepucial, a frequência foi menor (44,3%), provavelmente pelo uso inadequado da amostragem.

6.7. Testes positivos de isolamento e IFD, em animais sem doença clínica, demonstraram uma persistência viral subclínica. Provas de soroconversão negativas nesses animais,

confirmaram inexistência de infecção aguda no momento da amostragem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALICE, F.J.; GALVÃO, C.L.; DÓRIA, J.D.; RIBEIRO, M. A.D.; SANTOS, J. A. G. Prováveis enterovírus isolados de bovinos acometidos de distúrbios entéricos. Bol. Inst. Biol. Bahia, Salvador, 5(1):75-92, 1960-1961.
2. ALICE, F. J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), no Brasil. Rev. Brasil. Biol., Rio de Janeiro, 38(4):919-20, 1978.
3. BARTLETT, D. E. Procedures for diagnosing bovine venereal trichomoniasis and handling affected herds. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 114(866):293-305, 1949.
4. BITSCH, V. The P 37-24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. Acta. Vet. Scand., Copenhagen, 19(4):497-505, 1978.
5. CANCELLOTTI, F. & TURILLI, C. Isolation of IBR, PI-3 and BVD viruses on AUBEK cells. Vet. Italiana, Teramo, 26(1-2):3-9, 1975.
6. CARBREY, E. A.; BROWN, L. N.; CHOW, T. L.; KAHRIS, R.F.; McKERCHER, D. G.; SMITHIES, L. K.; TAMOGLIA, T. W. Recommended standard laboratory techniques for diagnosing infectious bovine rhinotracheitis, bovine virus diarrhea, and shipping fever (Parainfluenza-3). Proc. U. S. Anim. Health Assoc., Richmond, 75:629-48, 1971.

7. CHARTON, A.; FAYE, P.; LE LAYEC, C. Application de la méthode d'immuno-diffusion en gélose au diagnostic expérimental d'infections à Herpesvirus bovis chez les bovins (Rhinotrachéite infectieuse chez le veau, Balanoposthite chez le taureau). Bull. Acad. Vet. Fr., Paris 48(2-3) : 71-5, 1975.
8. CHOW, T. L.; MOLELLO, J. A.; OWEN, N. V. Abortion experimentally induced in cattle by infectious bovine rhinotracheitis virus. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 144(9): 1005-7, 1964.
9. DANNACHER, G. & MARTEL, J. L. Le titrage des anticorps contre le virus de la maladie des muqueses par une microméthode de seroneutralisation. Recl. Méd. Vet., Paris, 154(1):31-7, 1978.
10. DANNACHER, G.; PERRIN, M.; PERRIN, B. Utilisation d'une technique d'hémagglutination passive pour la détection des anticorps contre le virus de la rhinotrachéite bovine infectieuse. Recl. Méd. Vet., Paris, 155(7-8):633-7, 1979.
11. DARCEL, C. LE Q. Precipitins in bovine sera to infectious bovine rhinotracheitis virus antigens. Can. Vet. J., Ottawa, 18(9):259-62, 1977.
12. DAVIES, D.H. & DUNCAN, J. R. The pathogenesis of recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus induced in calves by treatment with corticosteroids. Cornell Vet., Ithaca, 64(3):340-66, 1974.
13. DELLERS, R. W. Infectious bovine rhinotracheitis induced abortion in cattle: virologic, pathologic, immunofluorescence and serologic investigations. Ithaca, Cornell University NY, 1975. 68p. (Thesis PhD).
14. DERBYSHIRE, J. B. & CAPLAN, B. A. The isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus from stilbirth in swine. Can. J. Comp. Med., Ottawa, 40(3):252-56, 1976.

15. EDWARDS, S.; CHASEY, D.; WHITE, H. Experimental infectious bovine rhinotracheitis: comparison of four antigen detection methods. Res. Vet. Sci., London, 34(1):42-5, 1983.
16. ESTELA, L. A. Application of agar gel technique in the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 28(127):1903-4, 1967.
17. FAYE, P.; CHARTON, A.; LE LAYEC, C.; SOLSONA, M. Technique simple de neutralization du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (virus IBR/IPV). Recl. Méd. Vet., Paris, 152(7-8):483-9, 1976.
18. GIBBS, E. P. J. & RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesvirus. Part 1. Vet. Bull., Farnham Royal, 47(5):317-43, 1977.
19. GILLESPIE, J. H.; McENTEE, K.; KENDRICK, J. W.; WAGNER, W. C. Comparison of infectious pustular vulvovaginitis virus with infectious bovine rhinotracheitis virus. Cornell Vet., Ithaca, 49(2):228-97, 1959.
20. GOLDMAN, M. Fluorescent antibody methods, New York, Academic, 1966. 303p.
21. GRATZEK, J. B.; KENKINS, R. A.; CHENNEKATU, P. P.; RAMSEY, F. K. Isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus associated with enteritis in cattle: comparative developmental study by fluorescent antibody tracing and electron microscopy. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 27(121):1573-82, 1966.
22. GRATZEK, J. B.; PETER, C. P.; RAMSEY, F. K. Isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus associated with enteritis in cattle: isolation, serologic characterization, and induction to the experimental disease. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 27(121):1567-72, 1966.
23. HERRING, A. J.; NETTLETON, P. F.; BURRELS, C. A micro-enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus.

- Vet. Rec., London, 107(7):155-6, 1980.
24. HOMAN, E. J. & EASTERDAY, B. C. Isolation of bovine herpesvirus-1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 41(8):1212-3, 1980.
 25. HOMAN, E. J. & EASTERDAY, B. C. Further studies on naturally occurring latent bovine herpesvirus infection. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 42(10):1811-3, 1981.
 26. HOUSE, J. A. & BAKER, J. A. Bovine herpesvirus IBR-IPV. The antibody virus neutralization reaction. Cornell Vet., Ithaca, 61(2):320-35, 1971.
 27. HUCK, R. A. & WOODS, D. G. Serum neutralization tests with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus. Br. Vet. J. London, 128(11):lxii-lxiii, 1972.
 28. JENNEY, E. W. & WESSMAN, S. J. Microtitration serology methods for bovine virology. In: SEROLOGIC MICROTITRATION TECHNIQUES. Ames, 1978, Ames, National Veterinary Services Laboratories, 1978, p.16-20.
 29. KAHRS, R. F. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 171(10):1055-64, 1977.
 30. KAHRS, R. F.; HILLMAN, R. B.; TODD, J. D. Observations on the intranasal vaccination of pregnant cattle against infectious bovine rhinotracheitis and parainfluenza-3 virus infection. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 163(4):437-41, 1973.
 31. KAHRS, R. F. & SMITH, R. S. Infectious bovine rhinotracheitis, infectious pustular vulvovaginitis, and abortion in a New York dairy herd. J. Am. Vet. Med. Assoc. Schaumburg, 146(3):217-20, 1965.
 32. KARSTAD, L.; JESSET, D. M.; OTEMA, J. C.; DREVEMO, S. Vulvovaginitis in wildbeest caused by the virus of infec -

- tious bovine rhinotracheitis. J. Wildl. Dis., Iowa, 10 (4):392-96, 1974.
33. KENDRICK, J. W. & McENTEE, K. The effects of artificial insemination with semen contaminated with IBR-IPV virus. Cornell Vet., Ithaca, 57(1):3-11, 1967.
34. KENNEDY, P. C. Comments on effects of infectious bovine rhinotracheitis virus on the fetus. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 163(7):854-6, 1973.
35. KOKLES, R. Die infektiöse rhinotracheitis und das coitallexanthem des rindes.In: ROHRER, H. Handbuch der Virusinfektion bei Tieren. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag, 1967. Band II, p.901-60.
36. LE JEUNE, J. M.; HART, L. T.; LARSON, A. D.; SEGER, C. L. Microimmunodiffusion test for detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine serum. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 38(4):459-63, 1977.
37. McKERCHER, D. G. Studies of etiologic agents of infectious bovine rhinotracheitis and Bläschenausschlag (Coital vesicular exanthema). Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 24(100):501-9, 1963.
38. McKERCHER, D. G.; MOULTON, J. E.; KENDRICK, J. W.; SAITO, J. K. Recent developments in upper respiratory disease of cattle. In: PROCEEDINGS ANIMAL HEALTH, 59, Chicago, 1955. Proceedings. Chicago, Annual Meeting Animal Health Association, 1955 p.151-72.
39. McKERCHER, D. G.; SAITO, J. K.; WADA, E. M.; STRAUB, O. Current status of newer virus disease of cattle. Proc. U.S. Livestock Sanit. Assoc., Chicago, 62:136-58, 1959.
40. McKERCHER, D. G. & WADA, E. M. The virus of infectious bovine rhinotracheitis as a cause of abortion in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 144(2):136-42, 1964.
41. McKERCHER, D. G.; WADA, E. M.; STRAUB, O. Distribution and

- persistence of infectious bovine rhinotracheitis virus in experimentally infected cattle. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 24(100):510-14, 1963.
42. MEDEIROS, P. M. & FIGUEIREDO, J. B. Vibriose bovina no Estado de Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 23:137-41, 1971.
43. MOHANTY, S. B. & LILLIE, M. G. A quantitative study of the infectious bovine rhinotracheitis neutralization test. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 26(113):892-6, 1965.
44. MOHANTY, S. B.; LILLIE, M. G.; CORSELIUS, N. P.; BECK, J. D. Natural infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in goats. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 160(6):879-80, 1972.
45. MUELLER, S. B. K.; IKUNO, A. A.; CAMPOS, M. T. G. R.; RIBEIRO, L. O. C. Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueite infecciosa dos bovinos de um rim de feto de bovino (IBR/IPV). Arq. Inst. Biol., São Paulo, 45(3):187-90, 1978.
46. NELSON, D. R.; MARE, C. J.; GLOCK, R. D. Infectious bovine rhinotracheitis (herpesvirus bovis) infection in swine. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 33(6):1209-15, 1972.
47. NETTLETON, P. F.; HERRING, J. A.; HERRING, A. J. Evaluation of an immunofluorescent test for the rapid diagnosis of field infections of infectious bovine rhinotracheitis. Vet. Rec., London, 112(13):298-300, 1983.
48. ONSTAD, O. & SAXEGAARD, F. Outbreaks of vaginitis and balanitis in swine. Clinical and pathological findings. Nord. Veterinaermed, Copenhagen, 19(1):49-53, 1967.
49. OWEN, N. V.; CHOW, T. L.; MOLELLO, J. A. Bovine fetal lesions experimentally produced by infectious bovine rhinotracheitis virus. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 25(109):1167-25, 1964.

50. PARSONSON, I. M. & SNOWDON, W. A. The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with IBR virus. Austr. Vet. J., Brunswick, 51(8):365-69, 1975.
51. PIERSON, R. E. & VAIR, C. A. The economic loss associated with infectious rhinotracheitis in a dairy herd. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 147(4):350-2, 1965.
52. PORTER, D. D.; LARSEN, A. E.; COX, N. A. Isolations of infectious bovine rhinotracheitis virus from mustelidae. J. Clin. Microbiol., Washington, 1(1):112-13, 1975.
53. POSPISIL, Z.; MENSIK, J.; KREJCI, J. Demonstration of infectious bovine rhinotracheitis virus in newborn colostrum-deprived calves with particular reference to its epizootiological significance. Zentrabl. Veterinaermed. Reihe B, Hamburg, 26(4):325-35, 1979.
54. REED, D. E.; BICKNELL, E. J.; LARSON, C. A.; KNUDTSON, W. U.; KIRKBRIDE, C. A. Infectious bovine rhinotracheitis virus-induced abortion: rapid diagnosis by fluorescent antibody technique. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 32(9):1423-6, 1971.
55. REED, L. J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg., Baltimore, 27(3):493-7, 1938.
56. ROSSI, C. R. & KIESEL, G. K. Microtiter tests for detecting antibody in bovine serum to parainfluenza-3 virus, infectious bovine rhinotracheitis virus, and bovine virus diarrhea virus. App. Microbiol., Washington, 22(1):32-6, 1971.
57. SAUNDERS, J. R.; OLSON, S. M.; RADOSTITS, O. M. Efficacy of an intramuscular infectious bovine rhinotracheitis vaccine against abortion due to the virus. Can. Vet. J. Ottawa, 13(12):273-78, 1972.
58. SAXEGAARD, F. & ONSTAD, O. Isolation and identification

- of IBR-IPV virus from cases of vaginitis and balanitis in swine and from healthy swine. Nord. Veterinaermed, Copenhagen, 19(1):54-7, 1967.
59. SCHIPPER, I. A. & GHOW, T. L. Detetction of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) by immunofluorescence. Can. J. Comp. Med., Ottawa, 32(4):412-5, 1968.
60. SCHROEDER, R. & MOYS, M. D. An acute respiratory infection of dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 125(933):471-2, 1954.
61. SILIM, A. & ELAZHARY, M. A. S. Y. Detection of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea viruses in the nasal epithelial cells by direct immunofluorescence technique. Can. J. Comp. Med., Ottawa, 47(1):18-22, 1983.
62. SMITH, P. C. Experimental infectious bovine rhinotracheitis virus infections of english ferrets (Mustela putorius furo L). Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 39(8):1369-72, 1978.
63. SNOWDON, W. A. The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. Aust. Vet. J., Brunswick, 41(5):135-42 1965.
64. SPRADBROW, P. B. Isolation of IBR virus from bovine semen. Aust. Vet. J., Brunswick, 44(9):410-12, 1968.
65. STEDDON, R. P. A cattle disease in Marshall County, Kansas. Separata de ANN. REPORT B. A. I. USA, 15., 1895 apud KENDRICK, J. W.; GILLESPIE, J. A.; McENTEE, K. In infectious pustular vulvovaginitis of cattle. Cornell, Vet. Ithaca, 48(4):458-95, 1958.
66. ST. GEORGE, T. D. & PHILPOTT, M. Isolations of infectious bovine rhinotracheitis from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. Aust. Vet. J., Brunswick, 48(3):126, 1972.

67. SULLIVAN, E. J. & ROSENBAUM, M. J. Methods for preparing tissue culture in disposable microplates and their use in virology. Am. J. Epidemiol., Baltimore, 85(3):424-37, 1967.
68. TERPSTRA, C. Diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis by direct immunofluorescence. Vet. Quartely, The Hague, 1(3):138-44, 1979.
69. THORNER, R. M. & REMEIN, Q. R. Principles and procedures in evaluation of secreening for disease. Washington, U. S. Government Printing Office, 1961. 24p.
70. VENGRIS, V. E. & MARÉ, C. J. A micro-passive hemagglutination test for the rapid detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. Can. J. Comp. Med., Ottawa, 35(4):289-93, 1971.
71. WELLEMANS, G. & LEUNEN, J. La rhinotracheite infectieuse des bovins (IBR) et sa serologie. Ann. Med. Vet., Bruxelles, 117(7):507-18, 1973.
72. WHITMAN, J. E. & HETRICK, F. M. An indirect hemagglutination test for detecting antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus. Cornell Vet., Ithaca, 55(4):613-22, 1965.
73. WILSON, T. E. Observations and comments on two outbreaks of abortion associated with IBR virus infection. Can. Vet. J., Ottawa, 15(8):227-9, 1974.
74. WISEMAN, A.; SELMAN, I. E.; MSOLLA, P. M. The financial burden of infectious bovine rhinotracheitis. Vet. Rec., London, 105(11):469, 1979.
75. WOODS, G. T.; MEYER, R. C.; SIMON, J. Experimental exposure of pigs to infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus. Can. J. Comp. Med., Ottawa, 32(4):480-2, 1968.
76. ZYAMBO, G. C. N.; DENNET, D. P.; JOHNSON, R. H. A passive hemagglutination test for the demonstration of antibody to infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular

vulvovaginitis virus. Aust. Vet. J., Brunswick, 49(9) : 409-12, 1973.

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